

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Új neuroendokrin szabályozó mechanizmusok vizsgálata
a humán bőrben**

Volascsekné Tóth Kinga Fanni

Témavezető: Dr. habil. Oláh Attila



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Bevezetés.....	8
3. Irodalmi áttekintés.....	9
3.1 A bőr.....	9
3.1.1 Az epidermisz, az epidermális keratinociták és az atópiás dermatitisz.....	10
3.1.2 A lipidbarrier és a faggyúmirigyek.....	12
3.2 A TRP csatornák.....	15
3.2.1 A TRPV család tagjai.....	16
3.2.2 A TRP(V) csatornák szerepe a bőrben.....	17
3.3 Egy sokoldalú szelektív szerotonin visszavételezést gátló (SSRI) farmakon: A fluoxetin (FX).....	21
3.3.1 A szelektív szerotonin visszavételezést gátló (SSRI) farmakonokról általában	21
3.3.2 Az SSRI-k farmakológiai tulajdonságai.....	21
3.3.3 A FX „nem konvencionális” hatásai.....	22
4. Célkitűzés.....	25
5. Anyagok és módszerek.....	26
5.1 A kísérletek során használt kezelőanyagok bemutatása.....	26
5.2 Sejtkultúrák.....	26
5.2.1 Az SZ95 humán, immortalizált szebociták.....	26
5.2.2 A primer normál humán epidermális keratinociták (NHEK) tenyésztése.....	28
5.2.3 „Human adult skin keratinocytes, low Ca ²⁺ , elevated Temperature”, azaz a humán epidermális keratinociták modellje, a HaCaT sejtvonal.....	30
5.3 A génexpresszió vizsgálata.....	31
5.3.1 Immunfluoreszcens jelölés.....	31
5.3.2 A TRPV3 expresszió kimutatása faggyúmirigyekben (immunhisztokémia)...	32
5.3.3 RNS tisztítás, reverz transzkripció és kvantitatív, valós idejű polimeráz lánreakció (Q-PCR).....	33
5.3.4 Western blot.....	34
5.4 Az intracelluláris lipidtartalom szemikvantitatív meghatározása (Nile Red jelölés)	37
5.5 Az életképesség vizsgálata (MTT-assay).....	38

5.6	<i>A sejtszám vizsgálata (CyQUANT-assay)</i>	39
5.7	<i>Fluo-4 AM-alapú fluoreszcens Ca²⁺-mérés</i>	39
5.8	<i>Szelektív géncsendesítés kis interferáló RNS segítségével (siRNS transzfekció)</i> ..	41
5.9	<i>Citokin array</i>	43
5.10	<i>A citokinek felszabadulásának vizsgálata (ELISA)</i>	44
5.11	<i>Az endotelin-felszabadulás vizsgálata (pán-endotelin ELISA)</i>	44
5.12	<i>A szebociták differenciációjának vizsgálata áramlási citometria segítségével</i>	45
5.13	<i>MitoSOX Red jelölés</i>	45
5.14	<i>RNA-Seq módszer</i>	46
5.15	<i>BioMAP[®] Diversity PLUS[®] profil analízis</i>	47
5.16	<i>Molekuláris dokkolás (molekulamodellezés)</i>	48
5.17	<i>PI3K aktivitás assay</i>	48
5.18	<i>Statisztikai analízis</i>	49
6.	Eredmények	51
6.1	<i>A TRPV3 aktiválása gátolja a lipogenezist és serkenti a gyulladásos mediátorok termelését humán szebocitákban</i>	51
6.1.1	<i>A TRPV3 jelen van humán faggyúmirigyeken</i>	51
6.1.2	<i>A TRPV3 a faggyúmirigyeken tapasztalható hasonló kifejeződési mintázatot mutat humán SZ95 szebocitákon</i>	52
6.1.3	<i>A TRPV3 aktivációja Ca²⁺-jelet indukál SZ95 szebocitákon</i>	53
6.1.4	<i>A TRPV3 agonisták koncentrációfüggő módon csökkentik a szebociták életképességét</i>	55
6.1.5	<i>A TRPV3-mediált Ca²⁺ jelátvitel gátolja a faggyúlipid-termelést</i>	56
6.1.6	<i>A karvakrol (részben TRPV3-függő módon) fokozza egyes gyulladásos citokinek kifejeződését és felszabadulását</i>	60
6.2	<i>A FX a PI3K útvonal indirekt gátlásával gyulladáscsökkentő hatást fejt ki humán epidermális keratinocitákon, és csökkenti a viszketésmediátor endotelinek felszabadulását</i> 63	
6.2.1	<i>14 μM-os koncentrációig a FX a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható humán keratinocitákon</i>	63
6.2.2	<i>A FX jelentősen csökkenti több gyulladásos citokin p(I:C) által indukált up-regulációját humán epidermális keratinocitákon</i>	64
6.2.3	<i>A FX csökkenti az IL-8 (CXCL8) p(I:C)-indukálta felszabadulását</i>	65
6.2.4	<i>A FX immortalizált (HaCaT) és primer humán epidermális keratinocitákon egyaránt kivédi a viszketést közvetítő endotelinek p(I:C) által indukálta felszabadulását</i> 67	

6.2.5	<i>A FX nem befolyásolja a p38 és az IκBα p(I:C)-indukált foszforilációját, és a reaktív oxigéngyökök mitokondriális termelésének (mtROS) emelkedését sem akadályozza meg</i>	69
6.2.6	<i>A 14 μM-ban alkalmazott FX és a PI3K-gátló GDC0941 biológiaiaktivitás-profilja figyelemre méltó hasonlóságot mutat</i>	71
6.2.7	<i>A GDC0941 utánozza a FX gyulladáscsökkentő és endotelin felszabadulást gátló hatását</i>	72
6.2.8	<i>Az in silico molekuláris dokkolási adatok azt sugallják, hogy a GDC0941 és a FX elfoglalhatják ugyanazt a kötőhelyet a PI3K-on</i>	75
6.2.9	<i>A FX kisebb gátlást gyakorol a PI3K aktivitására sejtmentes enzimaktivitást mérő teszt során, mint a GDC0941</i>	77
6.2.10	<i>A FX jelentősen módosítja a p(I:C) által kialakított génexpressziós mintázatot</i>	77
7.	Megbeszélés	80
8.	A disszertáció új eredményei és azok klinikai relevanciája	92
9.	Összegzés	93
10.	Summary	94
11.	Függelék	95
12.	Irodalomjegyzék	98
13.	Kulcsszavak	116
14.	Key words	116
15.	Köszönetnyilvánítás	117
16.	Saját közlemények jegyzéke	119

1. Rövidítések jegyzéke

2-APB	2-aminoetoxidifenil-borát (a TRPV3 nem-szelektív aktivátora)
5 α -DHT	5 α -dihidroteszteszteron
AA	arachidonsav
AD	atópiás dermatitisz
AEA	anandamid (arachidonol-etanolamid)
AMG9810	TRPV1 szelektív, kompetitív antagonistája ((2E)-N-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-3-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-2-propénamid)
AMP	antimikrobiális peptid
BCA	„bicinchoninic acid”
bFGF	bázikus fibroblaszt növekedési faktor
BSA	szarvasmarha szérumalbumin
CBD	(-)-kannabidiol
CD	„cluster of differentiation”
CDH1	kadherin-1, E-kadherin (epiteliális)
cDNS	komplementer DNS (dezoxiribonukleinsav)
CMF-PBS	Ca ²⁺ - és Mg ²⁺ -mentes, foszfátpufferelt sóoldat
COMT	katekol-O-metiltransferáz
CYP	citokrom P450 enzim
DAB	diamino-benzidin kromogén
DAPI	4',6- diamidino-2-fenilindol
Diff.	differenciált
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium”
DMSO	dimetil-szulfid
DNFB	2,4-dinitrofluorobenzén
dNTP	deoxinukleozid-trifoszfát
ECS	endokannabinoid rendszer
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	epidermális növekedési faktor
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
ERK	extracelluláris szignál által regulált kináz
FBS	magzati szarvasmarha szérum
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FM	faggyúmirigy
FX	fluoxetin
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
HC067047	„2-metil-1-[3-(4-morfolinil)propil]-5-fenil-N-[3-(trifluorometil)fenil]-1H-pirrol-3-karboxamid” TRPV4-szelektív antagonistája
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
HKGS	„Human Keratinocyte Growth Supplement”
HLA-DR	II. osztályú hisztokompatibilitási antigén
HRP	tormaperoxidáz
ICAM-1	intercelluláris adhéziós molekula-1
IFN	interferon

IL	interleukin
IP-10	interferon gamma-indukálható fehérje 10
I-TAC	interferon-indukálható T-sejt alfa kemoattraktáns
KC	keratinocita
LA	linolsav (PPAR aktivátor lipogén ágens)
LDLR	alacsony sűrűségű lipoprotein receptor
LPS	lipopoliszacharid
MACS	mágnesesen aktivált sejtszortírozás
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MBTPS2	membránhoz kötött transzkripció faktor proteáz-2
MCP-1	monocita kemoattraktáns protein-1
M-CSF	makrofág kolóniastimuláló faktor
MIG	interferon gamma által indukált monokin
MIP-1 α	makrofág gyulladásos protein-1 alfa
MITF	mikroftalmia-asszociált transzkripció faktor
MMP	mátrix metalloproteináz
mtROS	mitokondriálisan termelődő reaktív oxigéngyökök
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid
NaOH	nátrium-hidroxid
n.s.	nem szignifikáns
NF- κ B	„nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells”
NHEK	normál humán epidermális keratinocita
NK	negatív kontroll
NLRP3	NOD-, LRR- és pirin domént tartalmazó protein 3
NRIP1	„nuclear receptor interacting protein 1” (RIP140)
OD	optikai denzitás
ORSK	külső gyökérhüvely keratinocita
PAI-1	plazminogén aktivátor inhibitor-1
PAMP	patogén-asszociált molekuláris mintázat
PAR	proteáz-aktivált receptor
PBMC	perifériás vér monomorfonukleáris sejtek
PBS	foszfátpufferelt sóoldat
PBST	Tween20 [®] detergennsel kiegészített foszfátpufferelt sóoldat
PDGF-BB	trombocitából származó BB növekedési faktor
PDK1	foszfoinozidid-függő kináz 1 / PIP3-függő kináz 1
p(I:C)	poliinozin-policitidilsav
PI3K	foszfatidilinozitol-3-kináz
PKC δ	protein kináz C delta
PPAR	peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptor
PPIA	ciklofillin A (peptidil-prolil izomeráz A)
PRR	mintázatfelismerő receptor
RNA-Seq	RNS/transzkriptom szekvenálás
RNS45S	18S riboszomális RNS
ROS	reaktív oxigéngyök
RR	ruténium vörös (általános TRP csatorna gátló)

RT buffer	reverz transzkripció puffer
SAA	szérum amyloid A
scrRNS	a szelektív géncsendesítés során kontrollként alkalmazott, homológiát semmilyen ismert mRNS-sel sem mutató „scrambled” RNS konstrukt
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SERT	szerotonin transzporter
sIL	szolubilis interleukin
siRNS	a szelektív géncsendesítés során alkalmazott kis, interferáló RNS konstrukt
sPGE2	szolubilis prosztaglandin E2
SRB	szulforodamin B
SRB-Mphg	szulforodamin B csak makrofágokon mérve
SSRI	szelektív szerotonin visszavételezést gátló farmakon
ST	szerotonin
sTNF α	szolubilis tumornekrózis faktor alfa
TAC	„transit-amplifying” sejtek
TBST	Tris pufferelt sóoldat Tween20-szal kiegészítve
TCR	T-sejt receptor
TF	szöveti faktor
TGF- β	transzformáló növekedési faktor béta
TIMP	metalloproteinázok szöveti inhibitora
TLR	Toll-like receptor
TM	trombomodulin
TNF	tumornekrózis faktor
tPA	szöveti plazminogén aktivátor
TRP	tranzien receptorpotenciálú kationcsatorna
TRP-1	tirozinázhoz kapcsolódó protein-1
TRPA	a TRP csatornák „ankirin” alcsaládja
TRPC	a TRP csatornák „kanonikus/klasszikus” alcsaládja
TRPM	a TRP csatornák „melasztatin” alcsaládja
TRPML	a TRP csatornák „mukolipin” alcsaládja
TRPP	a TRP csatornák „policisztin” alcsaládja
TRPV	a TRP csatornák „vanilloid” alcsaládja
TSLP	„thymic stromal lymphopoietin”
uPA	urokináz típusú plazminogén aktivátor
uPAR	uPA receptor
VCAM-1	vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1
VEGFR2	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor 2
α -IgM	alfa immunglobulin M
α SM Actin	alfa simaizom aktin

2. Bevezetés

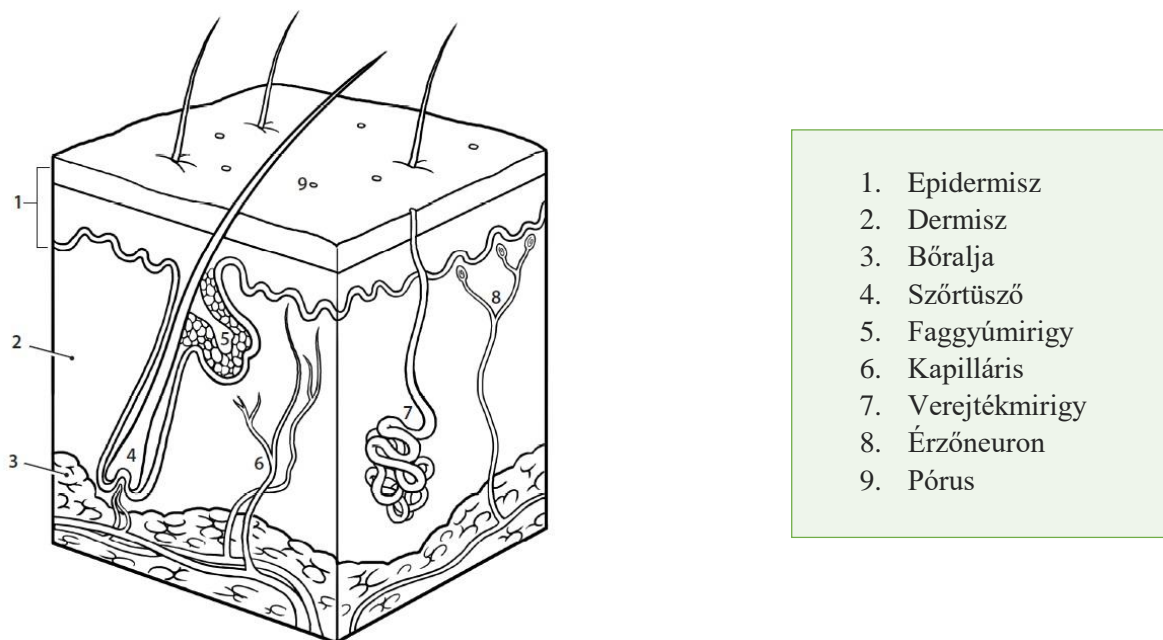
Az emberi test egyik legnagyobb szerve a bőr, mely kiemelkedő szerepet tölt be a szervezetünk védelmében. Összetett barrierrendszert képezve, az immunrendszerrel szoros együttműködésben egyaránt véd a környezetünkből érkező kémiai, fizikai/mechanikai és biológiai behatásokkal szemben. Munkacsoportunk hosszú évek óta foglalkozik a bőr (kór)élettani folyamataival, illetve azzal, hogy a bőrben fellelhető különböző sejttípusok hogyan járulnak hozzá a gyulladással és/vagy viszketéssel járó kórképek kialakulásához vagy éppen javulásához. Laboratóriumunk kutatásainak másik alappillére az endokannabinoid rendszer (ECS) vizsgálata. Az ECS egy összetett élettani szabályozó rendszer, melynek receptorai és endogén ligandjai a szervezetben szinte mindenhol, így a bőrben is megtalálhatóak. Az ECS „klasszikus” tagjai mellett a bőrben az ionotróp kannabinoid receptorként is funkcionáló tranziens receptorpotenciálú (TRP) ioncsatorna család tagjai is jelen vannak. Minthogy a közelmúltban kimutattuk, hogy a főként Ca^{2+} -ra permeábilis, hőérzékeny TRPV1, -2 és -4 ioncsatornák kifejeződnek a humán faggyúmirigyek sejtjeiben, az értekezés alapjául szolgáló egyik publikációban a negyedik „melegérzékeny” TRPV csatorna, a TRPV3 kifejeződését és szerepét vizsgáltuk meg humán szebocitákon.

Kísérleteink második felében egy, a kannabinoid rendszerhez közvetlenül nem kapcsolódó anyag, a klinikai gyakorlatban évtizedek óta biztonságosan alkalmazott antidepresszáns fluoxetin (FX) hatásait vizsgáltuk humán epidermális keratinocitákon, különös tekintettel a molekula lehetséges gyulladásgátló hatásaira, illetve a FX bőrgyógyászati repozícionálásának lehetőségére.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 A bőr

Testünket kívülről borító fő védelmi vonalunk és legnagyobb érzékszervünk a bőr, mely - az immunrendszerrel szoros együttműködésben - fontos szerepet játszik szervezetünk védelmében. A testünk és környezetünk közötti zavartalan kapcsolat fenntartásához elengedhetetlen a bőr épségének és funkciójának megléte. Bőrünk komplex barrier funkciói révén véd a különböző környezeti ártalmaktól, mechanikai és kémiai behatásoktól, potenciálisan patogén mikrobáktól, illetve a túlzott vízvesztéstől. Kültakarónk emellett részt vesz a hőszabályozásban, fontos az érzékelésben és a hormontermelésben is.^{1,2}



1. ábra A bőr felépítése (forrás: <https://www.education.com/worksheet/article/inside-out-anatomy-integumentary/>; letöltve és módosítva: 2020.01.23.)

Bőrünk felszíne felnőtt szervezet esetén mintegy 1,5-2 m² és a teljes testtömeg körülbelül 15 százalékát teszi ki, melyet természetesen a bőr alatti zsírszövet mennyisége és testfelszínünk mérete is befolyásol.³ A bőr három fő rétege (1. ábra) a felhám, vagyis az epidermisz, az irha, azaz a dermisz, valamint a bőralja, azaz a szubkutisz.⁴

3.1.1 *Az epidermisz, az epidermális keratinociták és az atópiás dermatitisz*

Az *epidermisz* többrétegű elszarusodó laphám, melynek sejtjei folyamatosan megújulnak, regenerálódnak. Négy fő sejtpopuláció, a keratinociták, a melanociták, a Langerhans-sejtek, illetve a Merkel-sejtek alkotják.⁵⁻⁸ A körülbelül 0,5-1 mm vastagságú felhám nagy hányadát a keratinociták építik fel, melyek elsődleges feladata a barrier kialakítása, ami a korábban is említett védelmet biztosítja a különböző fizikai, kémiai és biológiai hatásokkal szemben, illetve különböző citokinek, kemokinek és egyéb mediátorok felszabadításával fontos szerepet töltenek be a bőrt érintő gyulladásos folyamatok szabályozásában is.⁹

Az epidermiszt, mint a test és környezete közötti kapcsolódási pontot kis túlzással újabban „harmadik agynak” is szokták nevezni, mivel több receptort és érzékszervi információt feldolgozó rendszert tartalmaz, valamint számos hormont és neurotranszmittert is termel. E kissé provokatív nézet képviselői szerint az epidermális keratinociták tulajdonképpen „előemésztik” és (különböző mediátorok felszabadításával) „lefordítják” az információt a többi sejt (pl. az érzőidegek) számára, és hasonló logika mentén a potenciális kórokozók jelenlétére adott citokin/kemokin válaszuk segítségével a lokális immunfolyamatok elindulását és lefolyását is mélyrehatóan befolyásolják.^{10,11}

A bőr barrier funkcióinak (azaz a fizikokémiai, immunológiai és mikrobiológiai barrierék) épsége nélkülözhetetlen a szervezet túléléséhez. Ezek működési zavara, illetve károsodása olyan rendkívül gyakori betegségekhez vezethet, mint az ekcémaként is ismert atópiás dermatitisz (AD). A becslések szerint az AD a gyermekek ~15-30%-át, a felnőttek 2-10%-át és az idősek 1-3%-át érinti,¹²⁻¹⁵ így világszerte milliók életminőségét rontja jelentősen, és komoly terhet jelent mind az érintett egyének, mind a társadalom számára.¹²⁻

¹⁵ Közismert, hogy az AD tüneteinek kialakulását a fizikokémiai, mikrobiológiai és immunológiai barrier zavarai segítik elő.^{5,6} A folyamatban fontos szerepet játszik az

epidermális keratinociták differenciálódásának zavara és ezáltal a fizikokémiai barrier hibás működése, pl. genetikai hajlam (pl. filaggrin mutációk) vagy más tényezők miatt.^{12,13,16} Ezen túlmenően a bőr rendellenes lipidtermelése,^{17,18} a bőrfelszín fokozott pH-ja,¹⁹ a bőr mikrobióta kóros elváltozásai,²⁰ valamint a T_h2/T_h22-domináns immunválasz^{12,13} mind jelen vannak az AD-ben. Bár a betegség kiváltó oka nem teljesen világos, az epidermális keratinociták diszfunkciója minden bizonnyal központi szerepet játszik a folyamatban.

A fentiek mellett a közelmúltban ismertté vált az is, hogy a Toll-like receptor 3 (TLR3) expressziója szintén összefügg az AD tüneteinek súlyosságával. A TLR3 jelátvitelnek szerepe van továbbá az allergiás bőrgyulladás kialakulásában és a barrier diszfunkcióban egyaránt,²¹⁻²⁴ amelyek mind kapcsolatban állnak az AD tüneteivel.

Az epidermális keratinociták a környezetből érkező kórokozókat a sejtmembránban és a citoszolban kifejeződő mintázatfelismerő receptorok (PRR) révén képesek érzékelni. Ilyen mintázatfelismerő receptorok egyebek mellett a fentebb már említett Toll-like receptorok (TLR), melyeket a keratinociták felszínükön (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 és TLR6) vagy endoszómáikban (TLR3, TLR7 és TLR9) expresszálnak.²⁵⁻²⁹ A TLR-ok a különböző patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP-ok) ismerik fel, köztük a baktériumok sejtfalának fő alkotóját, a peptidoglikánt, a sejtfalban található endotoxin lipopoliszacharidot (LPS), a flagellin fehérjét, illetve különféle nukleinsavakat. Az ezektől a receptoroktól érkező szignálok a gyulladás típusától függően számos citokin (pl. interleukinok [IL-ok], tumornekrózis faktor [TNF]- α stb.) szekrécióját idézhetik elő. Az aktivált keratinociták a Langerhans- és dendritikus sejtek közreműködésével T_h1, T_h2 és T_h17 irányú immunválasz kialakítására egyaránt képesek.^{30,31}

Az antimikrobiális peptidek (AMP-k) a kórokozók közvetlen elpusztítása, a szervezet immunsejtjeinek toborzása és a citokintermelés szabályozása révén hozzájárulnak a mikrobákkal szembeni védelem kialakításához. A keratinociták természetes immunitásban

betöltött szerepét ilyen peptidek (pl. β -defenzinek vagy az LL-37 katelicidin) szükség szerinti szekréciója teszi teljessé.³² Az AMP-k diszregulációja több betegség patogenezisében is szerepet játszik: pikkelysömör esetén bizonyos AMP-k túltermelődése szerepet játszik a kóros immunválasz kialakulásában,³³ míg AD esetén a léziókban jellemzően alacsonyabb AMP szinteket írtak le, ami szerepet játszhat a mikrobióta kóros átalakulásában, illetve a bőrt érintő fertőzésekkel szembeni fogékonyságban.^{34,35}

A TLR aktiváció nemcsak AMP-k és különféle citokinek felszabadulásához vezethet, hanem más, a bőr (kór)élettani folyamatai szempontjából fontos, pl. viszketést előidéző mediátorok termelődését is kiválthatja. Ebből a szempontból kiemelkedően fontos a korábban már említett, keratinocitákban expresszálandó TLR3. A receptor poliinozin-policitidilsav (p(I:C)) általi aktiválása nemcsak gyulladáshoz vezet, hanem keratinocita eredetű viszketésmediátorok – köztük az endothelin-1 és a „thymic stromal lymphopietin” (TSLP) – felszabadulását is eredményezi.³⁶ Keratinocitákon végzett kísérleteink során ezért választottuk éppen a p(I:C) – TLR3 gyulladáshoz vezető modellt, hiszen a TLR3-nak szerepe lehet nemcsak az AD patogenezisében, hanem a viszketés kialakulásában az AD mellett egyéb viszketéssel járó kórképekben is.

3.1.2 *A lipidbarrier és a faggyúmirigyek*

A bőr felszínét borító lipidréteg, amely keratinocitáktól és faggyúmirigysejtektől egyaránt származhat, immunológiai szempontból igen fontos területet alkot. Az epidermális sejtek által termelt lipidek a faggyúmirigyekben gazdag bőrterületeken a bőrfelszín lipidjeinek csak jelentéktelen hányadát teszik ki. A faggyúmirigyek holokrin szekréciója révén termelt faggyú végül a bőr felszínére kerül, és bevonja a szőrzetet is. A hám eredetű lipidek elsősorban a sejtek közötti tereket töltik ki (közkeletű hasonlattal úgy fogják körbe a terminálisan differenciált hámsejteket, mint a habarcs a téglákat). A faggyúlipidek elsősorban apoláros lipidek (pl. trigliceridek, viaszészterek és szkvalén), míg az epidermális lipidek döntően ceramidok, szabadzsírsavak és koleszterin keverékei, melyek az

elszarusodott sejtburokkal együtt alkotják a barrier külső rétegét, biztosítva a bőr fizikai, biológiai és kémiai integritását.^{4,17,18,37}

A faggyúmirigyek az emlősök többségére, illetve bizonyos madárfajokra jellemző,³⁸ holokrin elválasztású mirigyek. A holokrin szekréció révén a mirigyet alkotó sejtek, a szebociták, differenciálódásuk során teljes egészükben a mirigy váladékává, azaz faggyúvá alakulnak.³⁹ A faggyúmirigyek az emberi bőrben a tenyér és a talp kivételével szinte mindenhol előfordulnak. Az esetek többségében, de nem kizárólag, szőrtüszőhöz kapcsolódnak. Szőrtüszőhöz kötött faggyúmirigyeket találunk a hajas fejbőr területén, illetve a genitáliákon, míg szabad faggyúmirigyek leginkább az arcon, az orr és a homlok területén helyezkednek el.⁴⁰ Specifikus, nem szőrtüszőkhöz kötött faggyúmirigyek a Fordyce-foltok, melyek az ajkak széleinél helyezkednek el, az emlőkön található Montgomery-mirigyek, a fitymán található Tyson-mirigyek, valamint a szemhéj Meibom-mirigyei. A szőrtüszőkhöz egyidejűleg akár több faggyúmirigy is kapcsolódhat. A faggyúmirigyek a szőrtüszőkkel, illetve a „szőrszálemelő” (*arrector pili*) izmokkal együtt alkotják a pilosebáceus egységet.^{41,42}

A faggyúmirigyek az embrionális fejlődés 13-16. hetében jelennek meg,⁴³ és a magzat bőrét az ún. *vernix caseosa*, vagyis a magzatmáz révén védőréteggel fedik be.^{44,45} Születés után a faggyúmirigyek aktivitása lecsökken, majd a pubertáskorban (döntően androgén hatásra) ismét fokozódik.⁴³ Az emberi szervezetben betöltött szerepük sokrétű. Elsődleges feladatuk kétségtelenül a főként neutrális lipidekből álló faggyú termelése, amely védelmet nyújt a bőrnek vízvesztés ellen.^{45,46} A szebociták által termelt faggyúlipidek emellett felelősek a bőrfelszín lipidjeinek háromdimenziós szerveződéséért, hozzájárulnak a barrier integritásához, és erős antimikrobiális aktivitást mutatnak.^{47,48} A faggyúmirigyek a fentiekén túl (egyebek mellett az androgének aktiválása és inaktiválása révén) a bőr endokrin homeosztázisában is fontosak.⁴⁹

A faggyúmirigyek rendellenes működéséhez leggyakrabban kapcsolható kórkép az akne, vagyis a pattanásosság. Az akne tulajdonképpen a pilosebáceus egység krónikus gyulladással megbetegedése,⁵⁰ amely leginkább pubertáskorban jelentkezik, de felnőtt korban is megfigyelhető.⁵¹ Patogenezisét tekintve komplex folyamatról van szó, amelynek kialakulásában négy fő tényező vesz részt, melyek a szeborrea, vagyis fokozott mennyiségű és megváltozott minőségű faggyú termelődése, a kivezetőcső abnormális keratinizációja, a patogén *Cutibacterium acnes* (korábbi nevén: *Propionibacterium acnes*) törzsek elszaporodása pilosebáceus egységben, valamint az ezzel párhuzamosan kialakuló kóros gyulladással járó folyamatok.^{51,52} A patogén *C. acnes* törzsek aktiválják a veleszületett immunrendszer szereplőit, és fokozzák egyes interferonok, különböző interleukinok (pl. IL-1 α és -1 β , IL-8 [CXCL8], IL-12), valamint mátrix metalloproteinázok termelését, amelyek (egyebek mellett) a kivezetőcső hiperkeratinizációját eredményezik, és (tovább) fokozzák a faggyútermelést is.⁵³⁻⁵⁵ A fentiek mellett az akne patogenezisében fontos szerepet játszanak az androgénhormonok is, hiszen a faggyútermelés fokozódása sok esetben összefügg a férfi nemi hormonok túltermelésével.⁵⁶

A pattanások jellegzetesen az arcon jelennek meg, ugyanakkor gyakoriak a háton és a mellkason is. Az akne megjelenési formái lehetnek a különféle nem gyulladással járó léziók, azaz a nyitott vagy zárt komedók (mitesszerek), valamint az általában papulák, pustulák, illetve ciszták formájában jelentkező gyulladással járó elváltozások.⁵⁷ Az akne sikeres kezelése gyakran különböző kezelési módok kombinált bevetését igényli. Az egyik lehetőséget a helyileg alkalmazott retinoidok (pl. adapalén) jelenthetik.⁵⁸ A retinoidok gyulladásgátló tulajdonságokkal is rendelkeznek, amelyet monoterápiaként vagy antibiotikumokkal együtt a gyulladással járó elváltozások kezelésére alkalmaznak.⁵⁹ Az antibiotikumokat (pl. klindamicin és eritromicin) helyileg vagy szájon át alkalmazva, elsősorban az enyhe- és közepesen súlyos akne kezelésére használják. Mivel a helyileg alkalmazott antibiotikumok a *C. acnes* esetében

is rezisztenciát válthatnak ki, egyéb antibakteriális hatású készítmények, pl. benzoil-peroxid hozzáadása is ajánlott a kezelés során.^{59,60} A drogériákban hozzáférhető akne elleni szerek és tisztító termékek gyakran szalicilsavat tartalmaznak, amely keratolitikus és gyulladásgátló hatása révén hatékony a komedók elleni küzdelemben, azonban kevésbé hatásos, mint a lokális retinoidok.⁶⁰

A jelenleg elérhető leghatékonyabb anti-akne készítmény a szájon át (is) szedhető izotretinoin, amely az akne súlyos, illetve visszatérő formáinak kezelésére szolgál.⁶⁰ Sajnálatos módon az izotretinoin potenciálisan teratogén (egyebek mellett az arc, a szem, a fülek, a koponya, a központi idegrendszer, a szív- és érrendszer, a csecsemőmirigy, illetve a mellékpajzsmirigyek fejlődésének rendellenességeit okozhatja), és számos egyéb mellékhatása is kialakulhat, így a terápia során folyamatos laboratóriumi ellenőrzés szükséges, amely magában foglalja a teljes vérkép, az éhgyomri lipidprofil, illetve a máj transzaminázok szintjének mérését is. Gyakori mellékhatásai közé tartozik a fejfájás, a bőr és a nyálkahártyák szárazsága, valamint bizonyos gyomor-bélrendszeri zavarok kialakulása, de egyes megfigyelések szerint ronthatja a fennálló depressziót, és növelheti az öngyilkosság kockázatát is, azonban ez utóbbiak esetén egyértelmű ok-okozati összefüggés még nem nyert bizonyítást.^{60,61}

Mindezek alapján érthető, hogy világszerte komoly igény mutatkozik olyan új terápiás megoldások azonosítására, amelyek a jelenleg elérhetőnél kedvezőbb mellékhatásprofil mellett lehetnek képesek hatékonyan enyhíteni az akne különböző formáinak a tüneteit.

3.2 A TRP csatornák

A TRP szupercsalád tagjai nem szelektív ioncsatornák, amelyek különböző kationok (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} és Ca^{2+}) mozgását tehetik lehetővé a sejtmembránon keresztül.^{62,63} A TRP-csatornákat elsőként a *Drosophila melanogaster trp* mutáns törzsében fedezték fel, ahol a vad típusú állatok sejtjeivel ellentétben a fotoreceptor sejtek fenntartott fényingerekre csak

átmeneti („tranziens”) potenciálváltozást mutattak.^{64,65} A TRP családba tartozó, közel 30, többnyire dominánsan Ca^{2+} -ra permeábilis kationcsatorna számottevő szekvenciahomológiát mutat, azonban szerkezeti sajátágaik alapján hét alcsoportjukat különíthetjük el. Ezek a klasszikus vagy kanonikus (TRPC), a vanilloid (TRPV), a melasztatin (TRPM), a policisztin (TRPP), a mukolipin (TRPML), az ankirin (TRPA) és a NOMPC csoportok („no mechanoreceptor potencial C”; ez utóbbit emlősökben eddig még nem azonosították).⁶⁶ A TRP csatornák nyitását és záródását nagyon sokféle hatás befolyásolhatja. Preklinikai és klinikai vizsgálatok bizonyították, hogy számos olyan környezeti inger, mint például vegyi anyagok, a hőmérséklet, a nyomás, az ozmolaritás vagy a pH változásai aktiválhatnak bizonyos TRP csatornákat, amelyek fontos szerepet játszanak egyebek mellett a látás, az ízlelés, a hallás, a szaglás, a tapintás, valamint a fájdalomérzet kialakulásában, illetve hozzájárulnak számos sejtelettani folyamat szabályozásához is.⁶⁷ Fontos hangsúlyozni, hogy az egyes TRP csatornák sok esetben több különböző aktivációs szignálra is érzékenyek lehetnek, és egyes szignálok (pl. egy bizonyos hőmérséklet-tartomány) több csatorna működését is befolyásolhatják.⁶⁸

3.2.1 A TRPV család tagjai

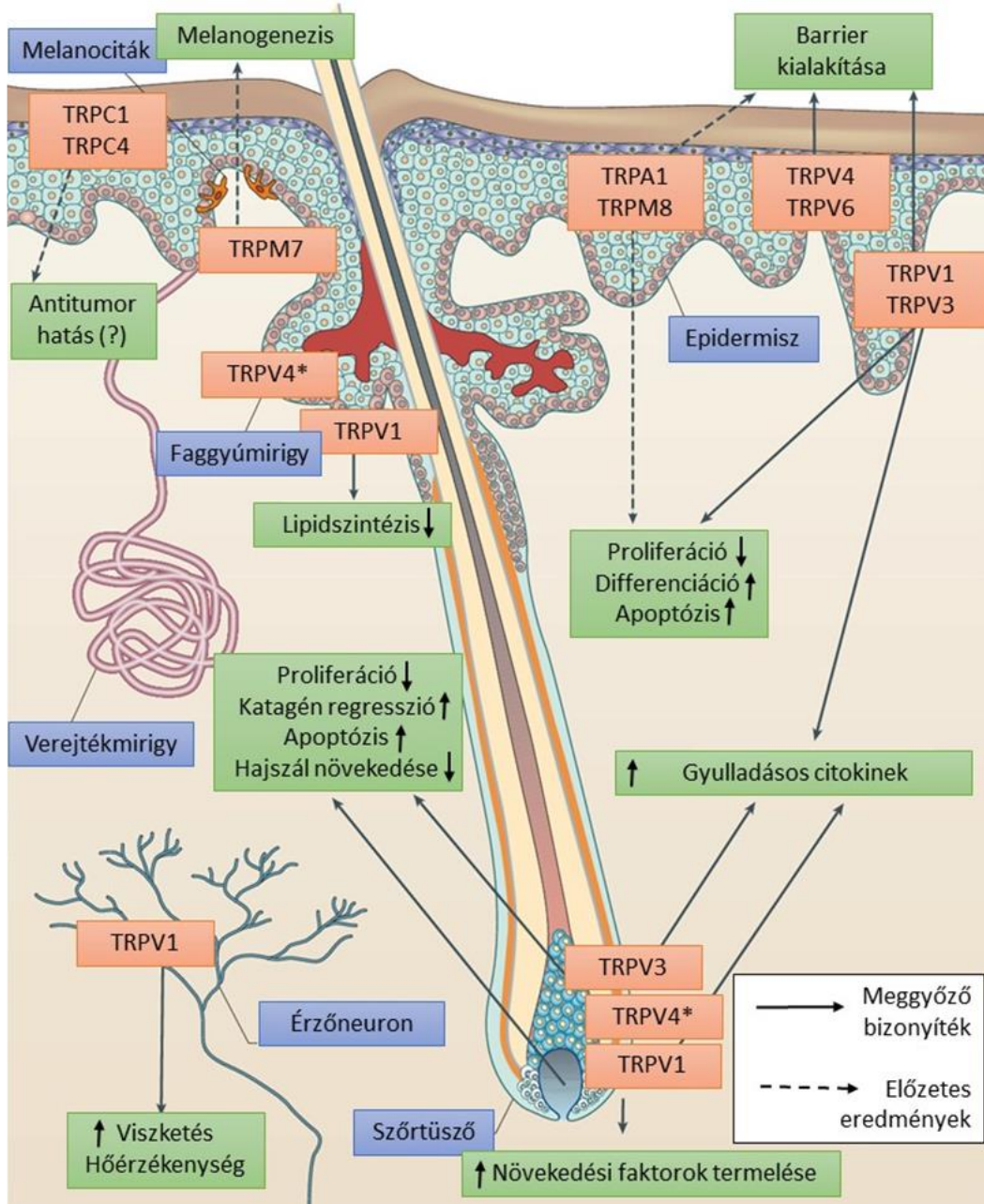
A TRPV család tagjai dominánsan Ca^{2+} -ra permeábilis kationcsatornák; a TRPV5 és a TRPV6 kivételével a többi TRPV csatorna aktivitása jellegzetes hőmérsékletfüggést mutat.⁶⁹ A TRPV1-et egyebek mellett a 43 °C feletti hő, valamint a csípőspaprikában is megtalálható és annak csípősségéért felelős kapszaicin,⁷⁰ a bizonyos helyi fájdalomcsillapítók hatóanyagaként⁷¹ is ismert kámfor,⁷² a feketeborsban megtalálható piperin,⁷³ a fokhagymában fellelhető allicin,⁷⁴ illetve az endokannabinoid anandamid (AEA)⁷⁵ is aktiválhatja. Mindemellett a TRPV1 a pH változásaira is érzékeny. 5,9-es pH érték alatt (ami kialakulhat pl. sérülésekkel asszociált szöveti acidózis esetén) a csatorna

hőaktivációjában eltolódás jön létre, ami azt eredményezi, hogy a TRPV1 már testhőmérsékleten is aktiválódik.⁶⁶

A TRPV alcsalád következő tagja a TRPV2 jellemzően magasabb, 52 °C feletti hőmérsékleten aktiválódik, viszont sem a pH-ban bekövetkező változások, sem a már korábban említett kapszaicin nem befolyásolja a működését.⁷⁶ A TRPV3 a neutrális, 33 °C feletti hőmérséklet mellett a mentol,⁷⁷ a karvakrol,⁷⁸ az eugenol⁷⁸ és a timol⁷⁸ alkalmazásával sejtkultúrákban közvetlenül is aktiválható, míg az arachidonsav (AA) szenzitizálja⁷⁹ a csatornát. A TRPV4 aktivitása szintén hasonló hőtartományban (~30 °C felett) növekszik meg, de emellett (többek között) ozmoszenzorként is viselkedik.^{80–83}

3.2.2 *A TRP(V) csatornák szerepe a bőrben*

A TRP csatornák a bőrben többféle sejttípusban többek közt a keratinocitákban, szenzoros neuronokban, melanocitákban, valamint különböző immunsejtekben is kifejeződnek, és szerepet játszanak számos élettani folyamat szabályozásában (2. ábra).⁸⁴ Fontosságukat jól jelzi, hogy egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy ezen TRP csatornák rendellenes működése olyan betegségek és (kór)állapotok kialakulásához vezethet, mint a krónikus fájdalom,^{84–87} a viszketés,^{84,88,89} különféle bőrgyulladás formák,^{90–92} vitiligo,⁹³ alopecia,^{94–96} a sebgyógyulás zavarai,⁹⁷ különböző bőrdaganatok^{98–100} vagy éppen a barrier károsodása.^{101–103}



2. ábra A TRP csatornák sokrétű szerepe a bőrben.

Forrás: Moran és mtsai., 2011¹⁰⁴

Kiegészítés az ábrán: *A TRPV4 expressziója a faggyúmirigyekben és a szőrtüszőkben:

Oláh és mtsai., 2014¹⁰⁵; Szabó és mtsai., 2019¹⁰⁶

A fentiekén túl munkacsoportunk az elmúlt években számos bőreléttani folyamatban vizsgálta a TRP csatornák funkcionális szerepét. Mikrodisszektált humán szőrtüsző szervkultúrákat, illetve primer külső gyökérhüvely keratinocitákat (ORSK) tanulmányozva munkacsoportunk tagjai megállapították, hogy a TRPV1 kapszaicin általi aktiválása a szőrtüsző regresszív, „katagén” hajciklusfázisának idő előtti kiváltásával dózisfüggő és

TRPV1-specifikus módon gátolta a szőrszál növekedését.⁹⁶ A hatás hátterében nagy valószínűséggel az ORSK-kon funkcionálisan aktív formában kifejeződő TRPV1 aktivációja és a hajciklus ismert negatív regulátorainak (IL-1 β , transzformáló növekedési faktor [TGF]- β 2) fokozott termelődése, valamint az ismert hajnövekedést elősegítő („pro-anagén”) faktorok (hepatocita növekedési faktor, inzulinszerű növekedési faktor-1, illetve őssejtfaktor) termelődésének csökkenése állt.⁹⁶ A TRPV1 hajciklusban betöltött szerepét munkatársaink TRPV1^{-/-} egerek segítségével is megerősítették.⁹⁵

A TRPV1 mellett munkatársaink a TRPV3 és -4 esetén is kimutatták, hogy aktivitásuk befolyásolja a szőrnövekedést. Eredményeik szerint a humán ORSK-k funkcionálisan aktív TRPV3-at és TRPV4-et expresszálnak, amelyek stimulálása megemelte az intracelluláris kalciumkoncentrációt, és elindította a szőrtüszők apoptózis-domináns korai katagén regresszióját.^{106,107}

Ezek az eredmények együttesen alátámasztják azt az elképzelést, hogy a TRPV1, -3 és -4 expressziója és jelátviteli mechanizmusai jelentős szerepet játszanak az emlős szőrnövekedés szabályozásában. A TRPV3 központi szerepét a folyamatban (valamint a viszketés és a lokális gyulladós folyamatok szabályozásában) ráadásul röviddel munkacsoportunk eredményeinek publikálását követően klinikailag is sikerült megerősíteni; kiderült ugyanis, hogy az egyebek mellett súlyos periorificiális és palmoplantáris hiperkeratózissal, bőrgyulladással, viszketéssel és kopaszsággal járó ritka genodermatózis, az Olmsted-szindróma hátterében is az esetek jelentős részében¹⁰⁸ a *TRPV3* funkcióyeréses mutációi állnak.^{109–112,123} Érdekes felfedezés azonban, hogy míg a *TRPV3* gén mutációit nemrégiben az autoszomális domináns vagy recesszív Olmsted-szindróma okaként azonosították, a *MBTPS2* (membránhoz kötött transzkripciós faktor proteáz-2) gén mutációit egy recesszív X-hez kapcsolt formában ismerték fel. Ily módon a genetikai vizsgálatok

elengedhetetlenek a *TRPV3* vagy *MBTPS2* mutáció kereséséhez és a differenciál diagnózis felállításához.¹⁰⁸

Amint a fenti tünetekből is jól látható, a *TRPV3* minden jel szerint a szőrnövekedés szabályozásán túl is fontos szerepet tölt be a bőr egyes (kór)élettani folyamataiban. Ezzel összefüggésben munkacsoportunk nemrégiben kimutatta, hogy a *TRPV3* stimulációja az NF- κ B útvonalon keresztül erős gyulladáshoz vezetett ki humán epidermális keratinocitákon,¹⁰⁹ és számos irodalmi, illetve saját adat szól amellett, hogy a *TRPV3* overexpressziója és túlműködése az epidermális keratinocitákon jelentősen hozzájárul az AD-ben jellemző bőrgyulladás és kényszerítő viszketés kialakulásához.^{110–113}

A szőrtüszők és az epidermális keratinociták mellett munkacsoportunk a *TRPV* csatornák humán sebociták biológiai folyamataira gyakorolt hatásait is behatóan vizsgálta. Bebizonyosodott, hogy a sebocitákon kifejeződő *TRPV1* kapszaicinnal történő aktiválása szelektíven gátolja a bazális, valamint az AA által indukált, aknét modellező, kórosan fokozott faggyúlipid-szintézist,¹¹⁴ és megállapítást nyert az is, hogy egy nem-pszichotróp fitokannabinoid, a (-)-kannabidiol (CBD) a *TRPV4*-et aktiválva normalizálja a pro-akne ágensek által indukált lipogenezist.¹⁰⁵ A molekuláris mechanizmus alaposabb vizsgálata utóbbi esetben arra is fényt derített, hogy a *TRPV4* aktivációja a lipogén extracelluláris szignál által regulált kináz (ERK)-1/2 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonal gátlása és a „nuclear receptor interacting protein”-1 (NRIP1) downregulációja révén alakult ki.¹⁰⁵

Bár a fentiek alapján elmondható, hogy egyes *TRPV* csatornák fontos szerepet játszanak a bőr és közelebbről a sebociták biológiai folyamatainak szabályozásában, a *TRPV3*-mal kapcsolatban, humán faggyúmirigyekben kísérleteink idején még nem álltak rendelkezésre kísérletes adatok. Mindezek fényében kísérleteink első felében arra

fókuszáltunk, hogy a bőrben már sokrétűen vizsgált TRPV3 kifejeződését és szerepét megvizsgáljuk a humán szebocitákon is.

3.3 Egy sokoldalú szelektív szerotonin visszavételezést gátló (SSRI) farmakon: A fluoxetin (FX)

3.3.1 A szelektív szerotonin visszavételezést gátló (SSRI) farmakonokról általában

A szelektív szerotonin visszavételezést gátló (SSRI) farmakonok a legszéleskörűbben felírt antidepresszánsok közé tartoznak, melyeket depresszióval, illetve szorongással járó betegségekben alkalmaznak. Érdekes módon, bár a depresszió „szerotonin hipotézise” még mindig általánosan elfogadottként él a köztudatban, újabb eredmények alapján egyesek megkérdőjelezik a szerotonindeficiencia kóroki szerepét a depresszióban.¹¹⁵

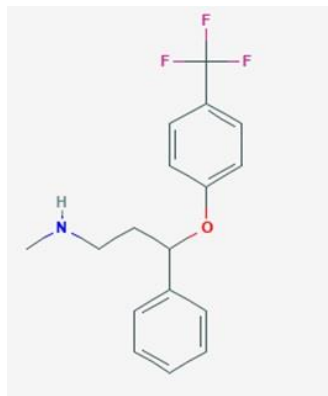
Az SSRI-k az első olyan gyógyszer-csoport, melyet racionális gyógyszertervezés révén hoztak létre, melynek lényege, hogy egy olyan molekulát terveznek, amely nagy valószínűséggel egy adott biológiai célpontra lesz hatással.¹¹⁶ Az SSRI-k, mint a nevük is mutatja, fő hatásuként a szerotonin transzporterekhez kapcsolódva gátolják a molekula sejtekbe történő visszavételezését, és így megemelik (vagy legalábbis szinten tartják) annak extracelluláris mennyiségét.¹¹⁷ A szerotonin így a szinaptikus részben marad, és képes kötődni a poszt-szinaptikus membránon elhelyezkedő szerotonin receptorokhoz.¹¹⁸

Habár az SSRI család tagjai a fentieknek megfelelően elsősorban a szerotonin transzportert gátolják, főként magasabb koncentrációkban alkalmazva befolyásolhatnak más (pl. dopamin és noradrenalin) transzportereket,¹¹⁹ és aktiválhatják a σ_1 és σ_2 receptorokat is.^{120,121}

3.3.2 Az SSRI-k farmakológiai tulajdonságai

Az egyes SSRI-kre adott válaszok számottevő egyéni variabilitást mutathatnak, amit egyebek mellett a szerotoninerg rendszer különböző tagjait kódoló gének polimorfizmusai okozhatnak.^{122,123} A klinikumban elsőként (1988-ban) elérhető SSRI az általunk is használt

fluoxetin (FX; 3. ábra) volt.¹²⁴ Orálisan alkalmazva szinte teljesen felszívódik.¹²⁵ Egyensúlyi koncentrációban alkalmazva a FX és aktív metabolitja, a norfluoxetin viszonylag hosszú idő (1-4, illetve 7-15 nap) alatt eliminálódik a szervezetből.^{126,127}



3. ábra A FX kémiai szerkezete

(forrás: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>; letöltve: 2020.02.26.)

A SSRI-k metabolizmusában a citokróm P450 (CYP) izoenzimek (pl. CYP2D6, CYP2C19, CYP3A, CYP2C9) játszanak fontos szerepet;^{128,129} a FX esetében ezek működése egy aktív metabolitot (a már korábban említett norfluoxetint) és több, jelen ismereteink szerint biológiailag inaktív egyéb bomlásterméket eredményez.¹³⁰ Más gyógyszerekkel való kölcsönhatásaiban a fentiek közül a CYP2D6 izoenzimet tartják legfontosabbnak.¹³¹

3.3.3 A FX „nem konvencionális” hatásai

A FX (és több további SSRI molekula) szakirodalomban régóta ismert „bőrreleváns” sajátossága, hogy hatékonyan enyhítik a kényszeres „börpizkálásban” megnyilvánuló pszichiátriai rendellenességek tüneteit, amelyet az egyébként egészséges bőr karcosítása, kaparászása, illetve harapdálása, és a bőr következményes sérülései jellemeznek.^{132,133} Ezen túlmenően fontos megemlíteni, hogy újabb eredmények alapján a FX különböző szervekben (így többek között a bőrben is) számottevő gyulladáscsökkentő hatást fejt ki,¹³⁴⁻¹³⁷ viszketéscsillapító hatása van,^{138,139} továbbá elősegíti a mikrodisszektált humán szőrtüszők (re)pigmentációját is.¹⁴⁰ A FX emellett fokozza mind rágcsáló melanoma sejtekben, mind pedig normál humán melanocitákban a melanintermelés kulcsenzimének, a tirozináznak a

kifejeződését és aktivitását, csakúgy, mint a mikroftalmia-asszociált transzkripciós faktor (MITF) és a tirozinázhoz kapcsolódó protein-1 (TRP-1) szintjét. A fentiekkel összhangban arra is fény derült, hogy szisztémásan alkalmazva C57BL/6 egerekben fokozta a szőrzet pigmentációját, amelyben a fenti fehérjék mellett, a tirozinázhoz kapcsolódó protein-2 (TRP-2) up-regulációja is szerepet játszott.¹⁴¹

Egyáltalán nem meglepő módon a különböző gyulladással és/vagy viszketéssel járó kórképekben, mint az AD, az érintett betegek életminősége a kórkép progressziójával és a viszketés fokozódásával jelentősen romlik.¹⁴² Ezzel kapcsolatban fontos megemlíteni, hogy az AD egy állatmodelljében, az ún. BALB/c egerekben az intraperitoneálisan alkalmazott FX (10 mg/kg) csökkentette a betegség tüneteit, az egerek vakarózását, valamint a szorongásos és depresszív viselkedésre jellemző tüneteket.¹⁴³ Hasonló eredményekre vezettek a 2,4-dinitrofluorobenzén (DNFB) topikális alkalmazásával kiváltott kontakt hiperszenzitivitást mutató egerekkel végzett kísérletek, amelyek során az intraperitoneálisan alkalmazott FX sikeresen csökkentette a bőrgyulladás tüneteit.¹³⁴

A hatás lehetséges mechanizmusának vizsgálatakor meg kell jegyezni, hogy a szerotonin különféle receptorai, valamint a szerotonintranszporterek jelen vannak a humán bőr különböző sejtfeleségeiben, ideértve a keratinocitákat, melanocitákat, dermális fibroblasztokat,¹⁴⁴ T-sejteket, Langerhans-sejteket,¹⁴⁵ hízósejteket,¹⁴⁶ valamint az érző neuronokat¹⁴⁷ is. Emellett több SSRI molekuláról is ismert, hogy immunmoduláló hatást is mutatnak,^{148,149} így például a FX-ről kimutatták, hogy szignifikánsan csökkenti a limfociták proliferációját.¹⁵⁰ Sőt, a közelmúltban végzett vizsgálatok azt is megállapították, hogy – valószínűleg közvetlen vírusellenes és immunregulációs hatásoknak köszönhetően – a FX alkalmazása kedvezően befolyásolta a SARS-CoV-2 fertőzés klinikai kimenetelét is.^{151,152}

Fontos megjegyezni, hogy a FX gyulladáscsökkentő hatása a legtöbb esetben valószínűleg független a klasszikus szerotoninerg jelpályától,¹⁵² és inkább más jelátviteli

útvonalakkal való kölcsönhatás révén alakulhat ki. Ilyen lehetséges alternatív útvonalak az NLRP3 inflammoszóma aktiváció,¹⁵³ a nitrogén-oxid termelés,¹⁵⁴ illetve a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) útvonal^{155–157} közvetett vagy közvetlen gátlása.

Bár természetesen az SSRI molekulák alkalmazása során is számolni kell különféle mellékhatások (pl. emésztési zavarok, csonttörésekre való hajlam,¹⁵⁸ aluszékonyság vagy éppen álmatlanság, fényérzékenység,¹⁵⁹ szexuális diszfunkció,¹⁶⁰ illetve paradox módon egyes esetekben fokozódó öngyilkossági hajlam¹⁶¹) kialakulásával, a FX klinikai alkalmazása során a többi SSRI molekulához képest kedvezőbb biztonságossági és mellékhatásprofil mutat.^{162,163} Emiatt, valamint a fentiekben említett gyulladásgátló, viszketéscsillapító és egyéb „nem klasszikus” hatások fényében nem meglepő, hogy már több esetben felmerült az indikációs területének kiterjesztése, azaz a „drug repurposing” gondolata.¹⁶⁴ A fentiekre figyelemmel jelen vizsgálatunkban a FX lehetséges gyulladásgátló hatásainak további feltárását tűztük ki célul humán epidermális keratinocitákon.

4. Célkitűzés

A fentiekben részletezett irodalmi adatok és korábbi eredményeink fényében a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Kifejeződik-e a TRPV3 humán szebocitákon, és ha igen, milyen szerepet játszik a sejtek jellemző biológiai folyamatainak (pl. faggyúlipid-szintézis), valamint immunfenotípusának szabályozásában?
2. Miként befolyásolja a FX a humán epidermális keratinociták gyulladásoz folyamatait, és mi lehet a hatás mechanizmusa?

5. Anyagok és módszerek

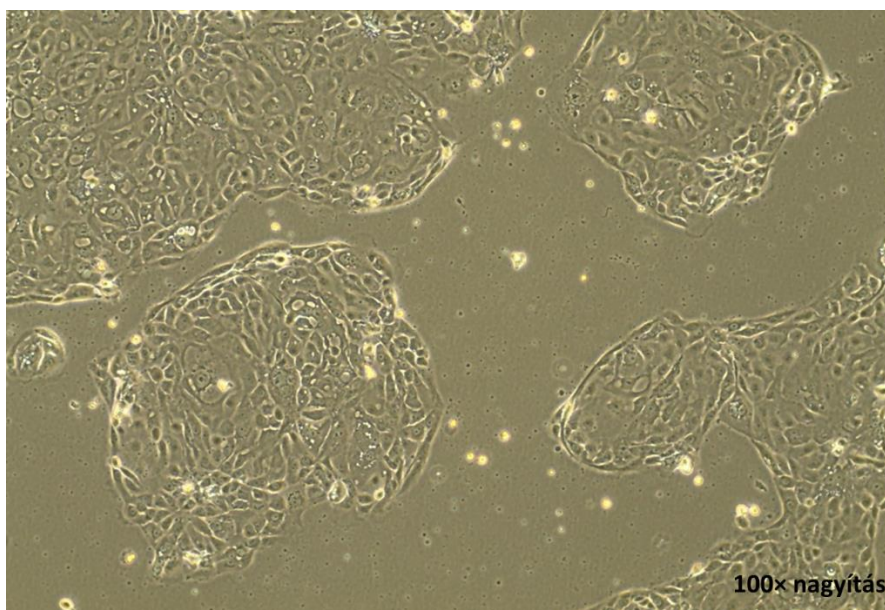
5.1 A kísérletek során használt kezelőanyagok bemutatása

A kísérletek során alkalmazott kezelőanyagokból első lépésben minden esetben ezerszeres töménységű törzsoldatokat készítettünk, melyeket a gyártók ajánlásának megfelelően fénytől védve, -20 °C-on tároltunk. A kísérlet során szükséges hígításokat közvetlenül a sejtek kezelése előtt készítettük el. A kontroll csoportok sejtjeit minden esetben az adott kísérletben alkalmazott anyag(ok) oldószerével kezeltük, így minden kezelés szigorúan azonos „oldószerhátteren” történt. A vizsgálatok alkalmával használt kezelőanyagok listáját az **1. táblázat** tartalmazza.

5.2 Sejtkultúrák

5.2.1 Az SZ95 humán, immortalizált szebociták

Mivel a primer humán szebociták fenntartása hosszú távon nem lehetséges (a nagyfokú spontán differenciációs hajlam miatt csupán 3-6 passzázsig tarthatók fenn), és nem áll rendelkezésre megfelelő állatmodell sem,^{165–168} a múlt század utolsó évtizedében nagy áttörést jelentett az első immortalizált szebocita sejtvonal, az SZ95 (4. ábra) létrehozása.¹⁶⁹



4. ábra SZ95 immortalizált szebocita sejtvonal (passzázs 46; saját készítésű kép, 2023.04.01.)

1. táblázat: A kísérletek során alkalmazott kezelőanyagok listája

Név (azonosító)	Rövid leírás	Oldószer*	Gyártó
2-APB	TRPV3 agonista	dimetil-szulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
AMG9810	TRPV1 antagonist	DMSO	Tocris (Bristol, Egyesült Királyság)
arachidonoil-etanolamid (anandamid; AEA)	eCB	abszolút etanol	Sigma-Aldrich
arachidonsav (AA)	gyulladásos lipidmediátor	abszolút etanol	Sigma-Aldrich
fluoxetin (FX)	SSRI antidepresszáns	DMSO	Sifavitor Srl (Milánó, Olaszország)**
GDC0941 (pictilisib)	PI3K inhibitor	DMSO	MedChemExpress (Sollentuna, Svédország)
HC067047	TRPV4 antagonist	DMSO	Tocris (Bristol, Egyesült Királyság)
karvakrol	TRPV3 agonista	DMSO	Sigma-Aldrich
linolsav (LA)	PPAR aktivátor	abszolút etanol	Sigma-Aldrich
poliinozin-policitidilsav (p(I:C))	TLR3 aktivátor	szűrt desztillált víz	InvivoGen (San Diego, Kalifornia, USA)
ruténium vörös (RR)	TRP csatorna antagonist	DMSO	Research Biochemicals International (Natick, Massachusetts, USA)
tesztoszteron (T)	androgénhormon	DMSO	Sigma-Aldrich

*A DMSO-t és az abszolút etanolt a VWR Internationaltól (Radnor, Pennsylvania, USA) vásároltuk.

**A FX-t nem közvetlenül a gyártótól szereztük be, hanem kollaborációs partnerünk (Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel; Bielefeld, Németország) biztosította a számunkra.

Christos C. Zouboulis és munkatársai egy 87 éves hölgy plasztikai műtétje során eltávolított arcbőről izolált faggyúmirigysejteket. Ezeket a sejteket SV-40 vírus nagy T-antigénjének kódoló régióját tartalmazó pBR-322-alapú plazmával transzfektálták. Az SZ95 sejttenyészetben a sejtek különböző méretűek lehetnek, polimorf megjelenésű, epiteliális jellegű sejtek, citoplazmájukban számos lipidcseppel, vakuólumokkal és sok organelummal, melyek a lipidszintézisben játszanak szerepet. Az SZ95 sebociták még hosszú, ötven passzázsig tartó tenyésztést követően is megtartották a primer faggyúmirigysejtekre jellemző tulajdonságaikat (markerexpressziós profil, faggyúlipid-összetétel stb.).¹⁷⁰

Az SZ95 sebocitákat Sebomed® Basal Mediumban (Merck-Millipore, Berlin, Németország) tenyésztettük. Ezt az alaplémediót egészítettük ki 10 V/V% hővel inaktivált magzati szarvasmarha szérummal (FBS; Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornia, USA), 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktoral és 1 mM CaCl₂-dal (Sigma-Aldrich), valamint MycoZap™ Plus-CL (1:500; Lonza, Bázél, Svájc) antibiotikum készítménnyel. Tenyésztés során a sejteket 5% CO₂ tartalmú, 37 °C hőmérsékletű termosztátban tartottuk, kétnaponta cseréltünk rajtuk tápoldatot és a 60-70%-os konfluencia elérésekor passzáltuk őket, hogy megelőzzük a konfluencia indukálta differenciáció beindulását. A tenyészetek esetleges *Mycoplasma* kontaminációját rendszeresen ellenőriztük MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Bázél, Svájc) segítségével, és minden esetben negatív eredményt kaptunk. A sejtek tenyésztését Dr. Szántó Magdolna, Dr. Oláh Attila, Galicz Anita és Volascsekné Tóth Kinga Fanni végezte.

5.2.2 A primer normál humán epidermális keratinociták (NHEK) tenyésztése

A primer humán epidermális keratinocitákat (NHEK) sebészeti beavatkozáson átesett, bőrgyógyászatiilag egészséges egyénekből izoláltuk. A kísérletekre a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal jóváhagyásával (azonosítók: IX-R-052/01396-2/2012, IF-1647-2/2016, IF-1647-9/2016, IF-778-5/2017, 61566-5/2021/EÜIG, DE RKEB/IKEB 4988-2018), a Helsink Deklaráció irányelveinek betartása mellett került sor. A donorok megfelelő tájékoztatást követően írásos beleegyezésüket adták mintáik kutatási célú felhasználásához. Az izolálásig a bőrmintákat DMEM-ben (Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tartottuk, amelyet 1%-os Pen/Strep oldattal egészítettünk ki (a penicillin végső koncentrációja: 100 NE/ml; a streptomycin végső koncentrációja: 100 µg/ml; Gibco Thermo Fisher Scientific) és Amphotericin B (végkoncentráció: 0,5 µg/ml; Gibco Thermo Fisher Scientific) legalább 2 órán keresztül 4 °C-on. Ezt követően a bőrminták 6 mm-es biopsziáit

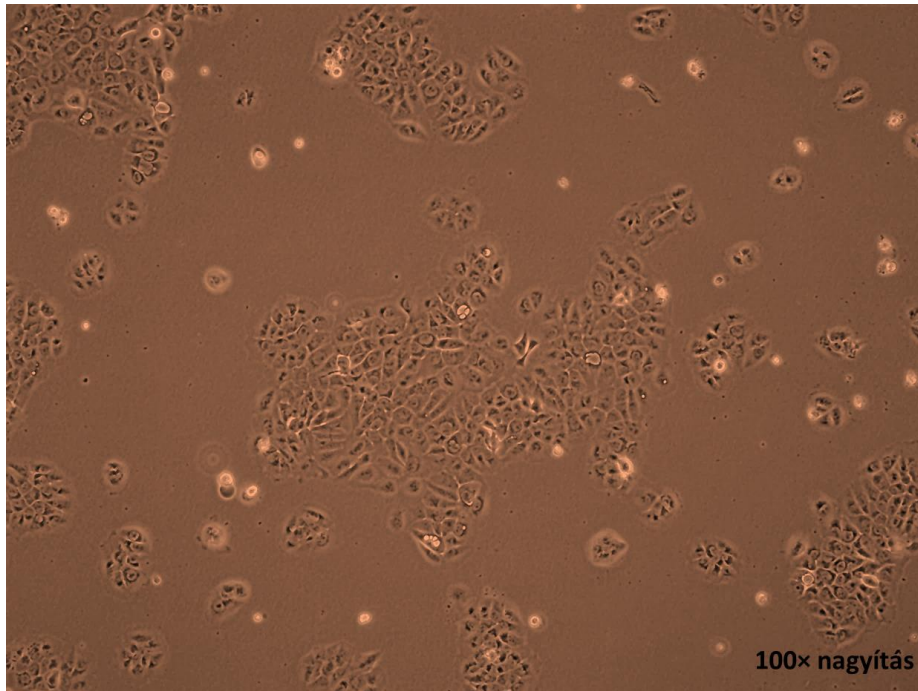
20 órán keresztül 4 °C-on 0,25%-os tripszinben (Gibco Thermo Fisher Scientific) enzimatikusan emésztettük, és a dermo-epidermális határt lekapartuk, hogy a bazális réteg sejtjeit megkapjuk. A tripszin inaktiválása Green's médiummal történt (300 ml DMEM; [Gibco Thermo Fisher Scientific], 150 ml HAM's F12 Nutrient Mix [Gibco Thermo Fisher Scientific], 50 ml FBS [Gibco Thermo Fisher Scientific], 5 ml Pen/Strep oldat [Gibco Thermo Fisher Scientific], 5 ml 4,86 mg/ml adenin [Sigma-Aldrich], 0,5 ml 5 mg/ml inzulin [Sigma-Aldrich], 1 ml 0,2 mg/ml hidrokortizon [Sigma-Aldrich], 0,5 ml 1,36 µg/ml trijód-tironin [Sigma-Aldrich] és 0,5 ml 10⁻⁷ M koleratoxin [Sigma-Aldrich]). A megfelelő mosást követően a sejtszuspenziót steril szűrő (pórusméret: 100 µm; Gibco Thermo Fisher Scientific) segítségével elválasztottuk a törmeléktől. A sejtszuspenziót centrifugáltuk, majd a sejtellehez friss Green's médiumot (humán rekombináns epidermális növekedési faktorral kiegészítve [0,5 ml 10 µg/ml; Sigma-Aldrich]) adtunk. Ezt követően a sejteket 50.000 sejt/ml sűrűségben T75-ös tenyészedényekbe helyeztük 10 ml kiegészített Green's médiumba (0. passzázs). A sejtek letapadását követően (azaz kb. az izolálás utáni 3-5. napon) a tápoldatot szérumentes EpiLife tápoldatra (Thermo Fisher Scientific) cseréltük, amelyet HKGS-kittel (humán keratinociták növekedését segítő készítmény; Gibco Thermo Fisher Scientific) egészítettünk ki, és az antibiotikumokat elhagytuk. Ezt követően a tápoldatot minden második napon lecseréltük, továbbá a sejteket 60-70%-os konfluenciánál passzáltuk. Az NHEK-eket 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú, párasított inkubátorban tenyésztettük, és a kísérletekhez csak a 4. passzázsszám alatti keratinocitákat használtuk. A donorokra vonatkozó anamnesztikus adatok a 2. táblázatban találhatóak. A sejtek izolálását és tenyésztését Szabó-Papp Judit, Galicz Anita, Ádám Dorottya, Barotáné Kovács Mónika és Volascsekné Tóth Kinga Fanni végezte.

2. táblázat Az NHEK donorok releváns anamnesztikus adatai

Azonosító	Nem	Életkor (év)	Régió	Passzázsszám	A 25/B ábrán szereplő színkód
17-26	Nő	48	Has	3	Black
17-62	Nő	42	Has	3	Red
17-48	Férfi	69	Has	3	Blue
17-43	Nő	41	N/D	3	Yellow
16-86	Nő	35	N/D	2	Purple

5.2.3 „Human adult skin keratinocytes, low Ca²⁺, elevated Temperature”, azaz a humán epidermális keratinociták modellje, a HaCaT sejtvonala

A humán immortalizált HaCaT keratinocitákat (5. ábra) 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú, párasított környezetben, DMEM tápoldatban (Gibco Thermo Fisher Scientific) tenyésztettük, amelyet 10% hőinaktivált FBS-sel (Gibco Thermo Fisher Scientific) és antibiotikum készítménnyel (MycoZap™ Plus-CL 1:500-ban; Lonza) egészítettünk ki. A tápfolyadékot kétnaponta cseréltük, és a sejteket 70-80%-os konfluencia elérésekor passzáltuk. A tenyészetek esetleges *Mycoplasma* kontaminációját rendszeresen ellenőriztük MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit (Lonza) segítségével, és minden esetben negatív eredményt kaptunk. A sejtek tenyésztését Szabó-Papp Judit, Galicz Anita, Barotáné Kovács Mónika, Ádám Dorottya, Arany József és Volascsekné Tóth Kinga Fanni végezte.



5. ábra HaCaT keratinociták tenyészetben (saját készítésű fáziskontraszt-mikroszkópos felvétel)

5.3 A génexpresszió vizsgálata

5.3.1 Immunfluoreszcens jelölés

A TRPV3 expresszióját SZ95 sebecitákon immunfluoreszcens eljárással (is) bizonyítottuk. A sebecitákat 24-lyukú lemezekbe helyezett fedőlemezekre szélesztettük. A letapadást követően jéghideg acetonban (VWR International) fixáltuk a sejteket (5 perc), majd foszfátpufferelt sóoldatban (PBS: 115 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7,4; mind a Sigma-Aldrichtól) oldott 0,1% Triton-X-100 detergenssel (Sigma-Aldrich) permeabilizáltuk (10 perc, szobahő). PBS-sel történő mosás és PBS-ben oldott 1%-os marhaszérum albuminnal (BSA, Sigma-Aldrich) történő 30 percig tartó blokkolást követően a sejteket nyúlban termeltetett, blokkoló oldatban 1:200 arányban hígított TRPV3 specifikus elsődleges antitestekkel (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) inkubáltuk 4 °C hőmérsékleten, egy éjszakán át. Fluoreszcens jelölésként a sejteket ezt követően fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált kecskében termeltetett, nyúl IgG Fc-szegmensre specifikus másodlagos antitesttel (Life Technologies) inkubáltuk 1 órán

keresztül (hígítás: 1:200 arányban blokkoló oldatban), majd magfestésként 4',6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornia, USA) alkalmaztunk. A TRPV3 expresszióját Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóp (Nikon, Tokió, Japán) segítségével vizsgáltuk. Negatív kontrollként az elsődleges antitest kihagyásával megfestett fedőlemezeinket használtuk. Az immunfluoreszcens jelöléseket *Dr. Szántó Magdolna* végezte.

5.3.2 A TRPV3 expresszió kimutatása faggyúmirigyekben (immunhisztokémia)

A faggyúmirigyek TRPV3 expresszióját formalin-fixált, paraffinba ágyazott mintákban mutattuk ki, melyek a Kenézy Gyula Egyetemi Kórházban (Debrecen) trichilemmális (piláris) cisztával diagnosztizált betegek, faggyúmirigyben gazdag bőrterületeiről származtak. A paraffinos blokkokból 4 µm vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk. A formalin-fixált metszeteken hőindukált antigénfeltárás történt 1 mM EDTA pufferben (Reanal Laborvegyszer Kereskedelmi Kft., Budapest, Magyarország; pH 8,0) 15 percig mikrohullámú sütőben. Az endogén peroxidáz aktivitást 3%-os hidrogén-peroxiddal (Sigma-Aldrich) blokkoltuk 10 percig. A blokkolás után a szöveti metszeteket specifikus TRPV3 elleni nyúl elsődleges antitesttel (Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael) 1:500 hígításban 1 óráig inkubáltuk. A csatorna expresszióját HRP polimer-konjugált nyúl IgG Fc szegmens elleni EnVision+ rendszerrel (DAKO, Glostrup, Dánia) detektáltuk a gyártó előírásait követve, majd a TRPV3 jelenlétét 3,3'-diaminobenzidin (DAB, Dako by Agilent, Glostrup, Dánia) segítségével tettük láthatóvá. A sejtmagokat hematoxilin (Sigma-Aldrich) segítségével jelöltük, végezetül pedig megfelelő fedőmédiummal (Histolab, Göteborg, Svédország) fedtük le a metszeteket. Negatív kontrollként az elsődleges antitest elhagyásával jelölt metszeteinket alkalmaztuk, míg szöveti pozitív kontrollként az epidermisz szolgált a metszeteken. A TRPV3 expresszióját a korábban már említett Nikon

Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóp (Nikon) segítségével áteső fényben vizsgáltuk. Az immunhisztokémiai jelöléseket *Dr. Pór Ágnes* és *Dr. Kovács Ilona* végezte.

5.3.3 RNS tisztítás, reverz transzkripció és kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció (Q-PCR)

Génexpressziós vizsgálatra sejteinket minden esetben 9,2 cm² méretű Petri-csészékbe (TPP) szélesztettük 500.000 sejt/Petri-csésze denzitással. A megfelelő kezelések végeztével a sejteket 500 µl Trizolate reagenssel (UD Genomed, Debrecen, Magyarország) vagy TRIzol reagenssel (Life Technologies) arattuk. Az RNS izolálásáig a mintákat -80 °C-on tároltuk. Az RNS tisztítását a minták felolvasztását követően kloroform (Sigma-Aldrich) hozzáadásával kezdtük. Erős vortexelést követően a mintákat szobahőmérsékleten inkubáltuk 5-10 percig, majd a 15 percig 4 °C-on 13.000/perces fordulatszámon történő centrifugálást követően elkülönülő 3 fázis közül az RNS-t tartalmazó, felső, vizes réteghez izopropanolt (Sigma-Aldrich) mértünk, és újabb vortexelés után 10 percig inkubáltuk szobahőn a mintákat. Az inkubációt követően ismét 4 °C-on 13.000/perces fordulatszámon centrifugáltuk a mintákat 10 percig. A centrifugálás után általában már jól láthattuk RNS pelleteket, melyeket a maradék izopropanol eltávolítására 75%-os etanollal (VWR International) mostunk. Végül egy utolsó centrifugálási lépést (13.000/perc, 4 °C) követően eltávolítottuk az alkoholt is, majd az RNS mintáinkat 20 µl nukleázmentes vízben (Qiagen, Hilden, Németország) oldottuk fel. A mintáink RNS tartalmának meghatározására NanoDrop-1000 spektrofotométert (Thermo Fisher Scientific) használtunk. Az RNS tisztítását és a koncentráció lemerését követően került sor a minták RNS tartalmának cDNS-sé történő átírására az Ambion™ (Thermo Fisher Scientific) reverz transzkripció kitjeit felhasználva. Első lépésként a genomi DNS szennyezés eliminálására DNáz (DNase I) kezelést végeztünk, majd sztenderd reverz transzkripció master mixet (10× RT buffer, 10× Random Primers, dNTP Mix, RNase inhibitor, MultiScribe Revers Transcriptase 50 U/µl,

nukleázmentes víz) alkalmazva mintánként 1 (keratinociták), illetve 2 µg (szebociták) RNS-ből kiindulva 20 µl végtérfogatú cDNS mintákat állítottunk elő. A Q-PCR reakciókat TaqMan assay-kkel és Gene expression Master Mix-szel (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) végeztük. Belső kontrollként a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), a ciklofillin A (PPIA) és a 18S riboszomális RNS (RNS 45S) génexpresszióját használtuk fel. A kísérleteink során alkalmazott TaqMan assay-k azonosítóit a **3. táblázat** foglalja össze. A Q-PCR reakciókat 384 well PCR plate-eken (LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white, Roche, Bazel, Svájc) LightCycler® 480 (Roche) készülékben. Minden reakciót három technikai ismétléssel végeztünk. Az egyes gének relatív expresszióját a ΔCT módszert alkalmazva a belső kontroll génexpressziójának értékeire normalizálva $\text{átlag} \pm \text{SD}$ formában adtuk meg. A méréseket *Dr. Szántó Magdolona és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

3. táblázat A Q-PCR során használt TaqMan assay-k

Rövidítés	A gén neve	Azonosító
CXCL8	interleukin-8 (IL-8/ CXCL8)	Hs00174103_m1
GAPDH	gliceraldehide-3-foszfát dehidrogenáz	Hs99999905_m1
IL-1α	interleukin-1 α	Hs00174092_m1
IL-1β	interleukin-1 β	Hs00174097_m1
IL-6	interleukin-6	Hs00985639_m1
NRIP1	nuclear receptor interacting protein 1	Hs00942766_s1
PPARG	peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptor γ	Hs00234592_m1
PPIA	peptidil-prolil izomeráz A (ciklofillin A)	Hs99999904_m1
RNA 45S5	18S riboszomális RNS	Hs03928985_g1
TNFα	tumornekrózis faktor- α	Hs00174128_m1
TRPV3	tranziens receptorpotenciálú vanilloid 3 ioncsatorna	Hs00376854_m1

5.3.4 Western blot

A western blothoz szükséges fehérjeminták előkészítéséhez a sejteket 90 mm-es Petri-csészékben 1-2 millió sejt/Petri-csésze sejtszámmal szélesztettük, majd a kívánt kezelések végeztével a sejteket lízispufferben (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; [VWR International], 150

mM NaCl [VWR International], 1 (V/V)% Triton™ X-100 [Sigma-Aldrich], 1 (V/V)% IGEPAL® CA-630 [Sigma-Aldrich], nátrium-deoxycholate [500 mg 100 ml-ben; Sigma-Aldrich] desztillált vízben) arattuk, amely proteáz inhibitor koktélt (hígítás: 1:100; Sigma-Aldrich) és PhosSTOP-ot (1 tableta/10 ml; [Roche]) tartalmazott. A fehérjetartalom meghatározásáig a mintákat -80 °C-on tartottuk. Felolvasztást követően jégen ultrahangos feltárást (szonikálást) végeztünk mintáinkon. A proteinkoncentráció meghatározása BCA protein assay kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher) segítségével történt. A mintákat ezután nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézisnek vetettük alá. A 10%-os Mini Protean TGX géleket (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) sávonként azonos (15 µg vagy 30 µg) mennyiségű fehérjével töltöttük meg. A membránokat kísérlet céljától függően humán TRPV3 ellen nyúlban termeltetett primer antitesttel (1:200 hígításban; Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael) vagy egér-anti-humán p-IκBα specifikus (1:1000 hígításban; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), illetve egér-anti-humán p-p38 MAPK specifikus primer antitestekkel (1:2000; Sigma-Aldrich) inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. A primer antitestek hígítása 1% tejporthalmazó TBST-ben történt. Másodlagos ellenanyagként tormaperoxidázzal (HRP) konjugált, kecskében termeltetett, nyúl IgG Fc szegmens elleni antitestet (1:1000, Sigma-Aldrich) vagy tormaperoxidázzal konjugált, kecske-anti-egér IgG Fc szegmens-specifikus ellenanyagot (1:5000; Bio-Rad) használtunk, melyek hígítása 1% tejporthalmazó TBST-ben történt. A másodlagos ellenanyagokkal a membránt szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül inkubáltuk. Az immunreaktív sávokat kemilumineszcens SuperSignal™ West Pico PLUS, valamint Femto PLUS Chemiluminescent Substrate kit (Pierce, Thermo Fisher) segítségével vizualizáltuk KODAK Gel Logic 1500 Imaging System (Kodak, Tokió, Japán) készülékben. Eredményeinket digitális formában a KODAK előhívó készülékhez ajánlott Kodak MI 4.0.5 (Eastman Kodak Company) program használatával rögzítettük. Annak ellenőrzésére, hogy a mintákból

valóban azonos mennyiségű fehérje került-e felvitelre, a vizsgálni kívánt fehérjék detektálását követően membránokról „stripping” kezeléssel választottuk le a kötődött antitesteket. A folyamat során elsőként 0,2 N NaOH (Sigma-Aldrich) oldat segítségével eltávolítottuk az antitesteket és a membránokat nyúl-anti- β -tubulin antitestekkel (Abcam, Cambridge, UK; vagy Novus Biologicals, Englewood, Colorado, USA; 1:1 000 hígítás 1%-os tej és BSA tartalmú TBST-ben 4 °C-on egy éjszakán át) inkubáltuk, majd a fent leírtak szerint vizualizáltuk torma-peroxidázzal konjugált kecske-anti-nyúl IgG Fc-szegment-specifikus másodlagos ellenanyaggal (1:10 000 1%-os tej tartalmú TBST-ben; Thermo Fisher Scientific; szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül). A kísérleteink során alkalmazott antitesteket a **4. táblázat** foglalja össze. A jelek szemikvantitatív denzitometriás elemzését az *ImageJ 1.52a* szoftver (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) segítségével végeztük.

A western blot kísérleteket *Dr. Szántó Magdolna, Ádám Dorottya, Arany József és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

4. táblázat A western blot kísérletek során alkalmazott antitestek listája

Célfehérje	Faj*	Hígítás	Gyártó	Inkubációs idő és hőmérséklet
TRPV3	nyúl	1:200	Alomone Labs	egy éjszakán át; 4 °C
β-tubulin	nyúl	1:1000	Abcam	egy éjszakán át; 4 °C
Nyúl IgG Fc szegmens (másodlagos antitest)	kecske	1:1000	Sigma-Aldrich	1 óra; szobahő
p-IκBα	egér	1:1000	Cell Signaling Technology	egy éjszakán át; 4 °C
p-p38 MAPK	egér	1:2000	Sigma-Aldrich	egy éjszakán át; 4 °C
Egér IgG Fc szegmens (másodlagos antitest)	kecske	1:5000	Bio-Rad	1 óra; szobahő

*faj, amelyben az antitestet termeltették

5.4 *Az intracelluláris lipidtartalom szemikvantitatív meghatározása (Nile Red jelölés)*

A szebocitákban termelődő lipidek mennyiségét Nile Red festéssel határoztuk meg. A Nile Red egy olyan fluoreszcens festék, mely vizes közegben nem fluoreszkál, lipofil környezetben azonban fluoreszcenssé válik, optimális gerjesztési és emissziós spektruma pedig attól függ, hogy poláros vagy neutrális (apoláros) lipidek veszik-e körbe. Ezek a különleges spektrális sajátságok lehetővé teszik azt, hogy ezen lipidek mennyiségét ugyanabban a mintában detektálhassuk. A sejtekben a poláros lipidek főként a membránokban vannak jelen, a jel intenzitásából így a sejtszámra következtethetünk,¹⁷¹ míg a neutrális lipidek zömmel a szebociták által termelt faggyúlipideket jelentik, így a sejtek differenciáltsági állapotáról adnak tájékoztatást.¹⁷⁰ A lipidtartalom meghatározására az SZ95 szebocitákat „black well, clear bottom” 96 lyukú (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) lemezekre szélesztettük 20.000 sejt/well denzitással, majd elvégeztük a megfelelő kezeléseket. Az 1 mg/ml-es, etanolban (VWR International) oldott Nile Red (Sigma-Aldrich) törzsoldatot 1:1000 arányban hígítottuk PBS-ben. A vizsgált lemezekről eltávolítottuk a felülúszót, majd a Nile Red munkaoldatból 100-100 µl-t mértünk minden wellbe, és 37 °C-on 30 percig inkubáltuk a lemezeket. Fél óra elteltével FlexStation 3 (Molecular Devices, San Francisco, Kalifornia, USA) multimode plate reader segítségével a neutrális, faggyúlipidek mennyiségének szemikvantitatív meghatározásra 485 nm-es gerjesztési és 565 nm-es detektálási hullámhosszon, „well scan” módban, wellenként kilenc ponton vizsgáltuk meg a fluoreszcencia intenzitását. A kapott eredményeket a kontrollra normalizálva, átlag±SD formában ábrázoltuk. A Nile Red jelöléseket *Dr. Szántó Magdolna, Dr. Oláh Attila és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.5 Az életképesség vizsgálata (MTT-assay)

A sejtek életképességének, viabilitásának vizsgálatára MTT-assay-t alkalmaztunk. Az MTT-assay segítségével az élő sejtek mitokondriális enzimeinek aktivitását kolorimetriás úton mérve közvetett információt nyerhetünk az élősejt-számról. A sejtek enzimeit a sárga metiltiazol-tetrazólium-bromidból a tetrazólium gyűrű hasításával vízben nem oldódó, lila színű formázán kristályokat képeznek, melyeket a sejtekkel együtt feloldva egy homogén, lila színű oldatot kapunk. A kísérletek alkalmával a sejteket 20.000 sejt/well sejtszámmal szélesztettük 96 lyukú lemezekre, majd elvégeztük a megfelelő kezeléseket. Ezt követően eltávolítottuk a sejtek felülúszóját és 100 µl/well 0,5 mg/ml végkoncentrációjú, PBS-ben oldott MTT (Sigma-Aldrich) oldatot mértünk a sejtekhez. Ezzel az oldattal 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáltuk a sejteket, majd az oldat eltávolítását követően a kristályokat 100 µl/well MTT szolubilizáló oldatban (81% 2-propanol, 9% 1M-os HCl, 10% Triton-X 100; mind Sigma-Aldrich) oldottuk fel. A kristályok feloldódásáig a lemezeket szobahőmérsékleten, közepes erősséggel rázattuk, majd az abszorbanciát 565 nm-en a már említett FlexStation 3 készülékkel (Molecular Devices) mértük le, eredményeinket pedig a kontroll értékeire normalizálva, átlag±SD formában adtuk meg. A FX hatásainak vizsgálatakor a kiértékelés némileg különbözött. Ezen kísérletek során a plate-ek üres welljeiben is mértünk abszorbanciát, és ezen well értékeinek átlagát háttérnek tekintve rendre kivontuk az összes többi well esetén mért abszorbancia értékekből. Ezután a háttérrel korrigált értékeket az oldószerrel kezelt kontrollra normáltuk, és a GraphPad Prism 9.3.1 (471) szoftver (Graphpad Software, LLC, San Diego, Kalifornia, USA) „non-linear curve fitting” funkciója segítségével a kapott értékekre görbét illesztettünk. A sejtek életképességének vizsgálatát *Dr. Szántó Magdolna*, *Dr. Oláh Attila* és *Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.6 *A sejtszám vizsgálata (CyQUANT-assay)*

A sejtszámot CyQUANT™ Cell Proliferation Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztuk meg. Az assay egy DNS-hez kötődő fluoreszcens festék segítségével a DNS wellenkénti mennyiségéről tájékoztat, így az MTT-assay-vel ellentétben ebben az esetben valóban a sejtek számáról nyerhetünk információt. Az epidermális keratinocitákat a Nile Red jelölés alkalmával is használt „black well, clear bottom” 96 lyukú lemezekre (Greiner Bio-One) szélesztettük 5.000 sejt/well sejtszámmal, majd elvégeztük a kezeléseket. A kezelést követően eltávolítottuk a felülúszót, majd a lemezeket -80 °C-on lefagyasztottuk. Ezzel a lépéssel nemcsak tartósítottuk, hanem permeabilizáltuk is a sejteket, elősegítve a mérés során a DNS-hez kötődő festék bejutását a sejtekbe. A vizsgálat előtt a lemezeket szobahőmérsékleten felolvasztottuk. A kitben található 20-szoros lízis pufferből desztillált vízzel készítettük el a munkaoldatot, melybe 1:400 arányban hígítva CyQUANT™ GR festéket adagoltunk. Az ily módon elkészített festékoldatból a kiolvasztott lemezek welljeibe 200-200 µl-t mértünk, majd 5 percig, szobahőmérsékleten, fénytől védve inkubáltuk azokat. Az inkubációs idő lejártával a fluoreszcencia intenzitását FlexStation 3 (Molecular Devices) készülék segítségével 480 nm-es gerjesztési és 520 nm-es detektálási hullámhosszt alkalmazva, „well scan” módban, wellenként kilenc ponton mértük le, majd a kapott eredményeket a kontroll csoportra normalva, átlag±SD alakban ábrázoltuk. A CyQUANT-assay-t *Arany József, Ádám Dorottya és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.7 *Fluo-4 AM-alapú fluoreszcens Ca²⁺-mérés*

A TRP csatorna aktivátorok, illetve blokkolók Ca²⁺ homeosztázisra gyakorolt hatásának funkcionális vizsgálatára fluoreszcens Ca²⁺ mérést is alkalmaztunk. A mérés során használt Fluo-4 AM nevű fluoreszcens festék sajátossága, hogy acetoxi-metilészter csoporttal („AM”) kapcsol, melynek segítségével a festék képes bejutni a sejtbe, ahol

azonban „csapdába esik”, hiszen az ott található nem specifikus észterázok lehasítják a kíséző „AM” észtert. A Fluo-4 a kalcium koncentrációtól függően növeli meg fluoreszcencia intenzitását, melyet a mérés során valós időben detektálhatunk. A szebocitákat fekete falú, átlátszó aljú, 96 well lemezekre (Greiner Bio-One) szélesztettük 20.000 sejt/lyuk denzitással. A mérés előkészítésekor, a sejtek médiumának eltávolítását követően 100 μ l/well Hank oldattal mostuk a sejteket. A Hank-oldat összetétele a következő volt: 136,75 mM NaCl, 5,56 mM glükóz, 5,36 mM KCl, 4,17 mM NaHCO₃, 1,26 mM CaCl₂, 0,34 mM Na₂HPO₄•2H₂O, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,81 mM MgSO₄•7H₂O, 10 mM HEPES; kiegészítve 2,5 mM probeneciddel és 1% BSA-val (mind Sigma-Aldrich). Az 1 mM (DMSO-ban oldott) Fluo-4 AM (LifeTechnologies, Carlsbad, Kalifornia, USA) törzsoldatot a fent ismertetett összetevőjű Hank oldatban hígítottuk tovább 1 μ M végkoncentrációig, majd ezzel az oldattal töltöttük fel a sejteket. A festékoldattal 30 percig 37 °C-on, fénytől védve inkubáltuk a sejteket. Az inkubációt követően három mosási lépés következett (100 μ l/well Hank oldat). Azokban az esetekben, amikor a kezelőanyagok hatásait nominálisan Ca²⁺-mentes Hank oldatban vizsgáltuk, a welleket ettől a lépéstől kezdődően módosított Hank oldattal mostuk, inkubáltuk és kezeltük. A nominálisan Ca²⁺-mentes Hank oldatba a CaCl₂ helyett ekvimoláris mennyiségű extra glükóz került. A mosást követően 150 μ l Hank oldatot (vagy névlegesen Ca²⁺-mentes Hank oldatot) mértünk a sejtekre, újabb 30 percig inkubálva őket 37 °C-on. Ez idő alatt készítettük elő a mérés során alkalmazandó kezelőanyagokat megfelelő koncentrációban (a tervezett célkoncentrációhoz képest 4-szeres töménységben) tartalmazó munkaoldatokat. A mérést a FlexStation 3 (Molecular Devices) készülék segítségével „FLEX mode”-ban végeztük 37 °C-on. A mérés első 30 másodpercében történt az alapvonal felvétele, majd ezt követte a kezelőoldatok bemérése a sejteket tartalmazó wellekbe. A fluoreszcencia intenzitását folyamatosan (általában 10 percen keresztül) követtük nyomon, 490 nm-es gerjesztési és 520 nm-es detektálási hullámhosszokat

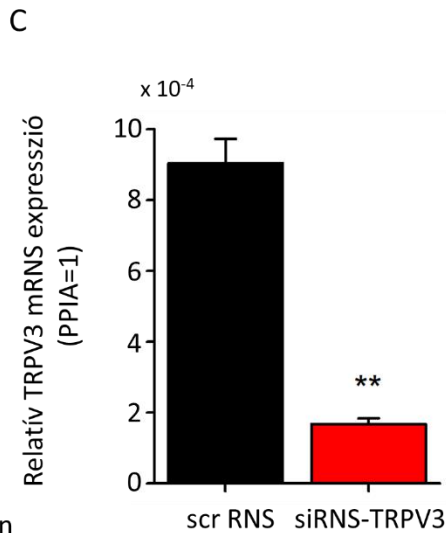
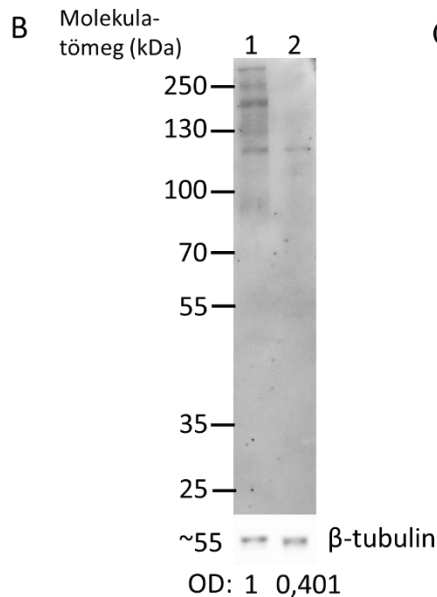
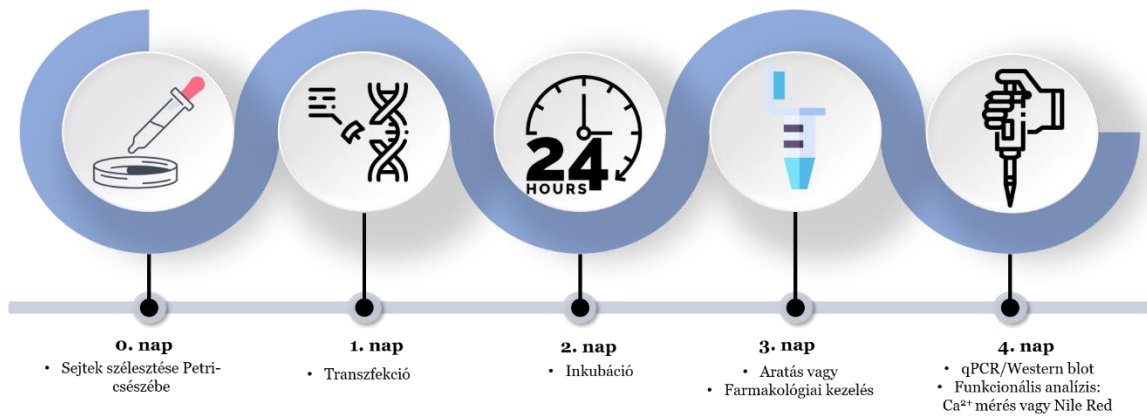
alkalmazva. A kapott fluoreszcencia értékeket az alapvonalak átlagának értékeire normalizálva, F/F_0 alakban ábrázoltuk. A Fluo-4 AM-alapú fluoreszcens Ca^{2+} -méréseket *Dr. Szántó Magdolna, Dr. Oláb Attila és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.8 Szelektív géncsendesítés kis interferáló RNS segítségével (siRNS transzfekció)

A TRPV3 gén kifejeződésének szelektív csökkentésére az SZ95 sebocitákat Petri-csészékben tenyésztettük a 70%-os konfluencia eléréséig. A következő napon a sejtek tápoldatát Opti-MEM[®] médiumra (Gibco, Sigma-Aldrich) cseréltük, és 40 nM TRPV3 elleni (azonosító: HSS175965) specifikus kis interferáló RNS oligonukleotidokkal (Invitrogen) kezeltük, Lipofectamine RNAiMax reagent (Invitrogen) használva. Kontrollként „Stealth RNAi Negative Control Med GC” duplaszálú RNS konstruktot („scrambled RNA construct”, SCR; Invitrogen) alkalmaztunk. A transzfekció után 48 órával ellenőriztük a csendesítés hatékonyságát western blot és Q-PCR segítségével is (6/A ábra). Minthogy eredményeink alapján ebben az időpontban a TRPV3 kifejeződése jelentősen csökkent (6/B-C ábra), további kísérletben az scr RNS és siRNS-TRPV3-transzfektált sejtek farmakológiai kezelését 48 órával a transzfekció után kezdtük el. A szelektív géncsendesítést *Dr. Szántó Magdolna és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

A

SZELEKTÍV GÉNCSENDESÍTÉS 5 lépésben



6. ábra A TRPV3 expresszió siRNS transzfekció által mediált csendesítése humán sebocitákon. A) A szelektív géncsendesítés folyamata 5 lépésben (saját szerkesztésű ábra). Az SZ95 sebocitákat scrambled RNS-sel (scr RNS) vagy TRPV3-at célzó siRNS-sel (siRNS-TRPV3) transzfektáltuk. A TRPV3 expresszióját 48 órával a transzfekció után ellenőriztük. B) A scr RNS-sel (1. sáv) vagy a TRPV3-specifikusan célzott siRNS-sel (2. sáv) transzfektált sebociták western blot analízise a TRPV3 fehérje szintű kifejeződésének jelentős csökkenését mutatta a transzfekciót követő második napon. Az egyenlő mintafelvitel ellenőrzésére az ugyanazon a membránon detektált β -tubulin szolgált belső kontrollként. OD: a TRPV3 sávok relatív optikai denzitása előbb a megfelelő β -tubulin sávokra, majd pedig a kontroll értékére normalizálva. A scrambled RNS transzfektált sebociták OD értéke = 1. C) A TRPV3 transzkriptek kvantitatív elemzése Q-PCR segítségével a scrambled RNS (scr RNS) és a TRPV3-specifikus siRNS-sel (siRNS-TRPV3) transzfektált sebocitákban a TRPV3 génexpresszió jelentős csökkenését mutatta 48 órával a transzfekció után. Átlag \pm SEM; N=3 egymástól függetlenül transzfektált minta; ** $p < 0,01$. A fentiek fényében kísérleteinkben az scr RNS és siRNS-TRPV3-transzfektált sejtek farmakológiai kezelését 48 órával a transzfekció után kezdtük el.

5.9 Citokin array

A keratinocitákat 40 mm átmérőjű Petri-csészékben tenyésztettük (500.000 sejt/1,5 ml médium), majd elvégeztük a tervezett 3 órás kezeléseket. A sejtek felülúszóját a kezelést követően összegyűjtöttük, majd lecentrifugáltuk (500 g; 10 perc). A mintákat a további felhasználásig -80 °C-on tároltuk, majd „Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit” (azonosító: ARY022B, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA) segítségével vizsgáltuk meg a gyártó protokollja szerint. Ennek során 2 ml/well „Array Buffer 6”-ot pipettáztunk a 4-lyukú lemezre, és ebben a pufferben blokkoltuk a nem specifikus kötőhelyeket a membránokon (1 óra, szobahőmérsékleten, rázógépen). Ezt követően az „Array Buffer 6”-ot eltávolítottuk, és a membránokat 1,5 ml felülúszóval inkubáltuk egy éjszakán keresztül 4 °C-on, finom rázatás mellett. A membránokat ezután 20 ml „Wash Buffer”-rel mostuk (3×10 perc, szobahőn), és 1,5 ml hígított detektáló antitest-koktéllal inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A megfelelő mosást követően 1× Streptavidin HRP-t adtunk a membránhoz, amellyel 30 percig inkubáltuk azokat. Végül az utolsó mosási lépést követően az immunoreaktív jeleket Chemi Reagent Mix segítségével vizualizáltuk Kodak Gel Logic 1500 Imaging System (Kodak, Tokió, Japán) segítségével. A jelek szemikvantitatív denzitometriai elemzését *ImageJ 1.52a* szoftverrel (National Institute of Health) végeztük. Az eredmények kiértékelésekor az egyes membránokon található negatív kontrollok átlagát háttérjelintenzitásnak tekintettük, és kivontuk a nyers értékekből. Ezután az egyes molekulák membránjain rendelkezésre álló két-két technikai ismétlés átlagait a kontroll tenyészet esetén kapott adatokkal normalizáltuk, és a p(I:C)-kezelés hatására bekövetkező $\geq 1,5$ -szeres változást tekintettük releváns hatásnak. A kísérletet *Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.10 A citokinek felszabadulásának vizsgálata (ELISA)

Az IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 (CXCL8) és TNF- α citokinek sejtekből történő felszabadulásának vizsgálatához a megfelelő kezeléseket követően begyűjtöttük, lecentrifugáltuk (500 g, 10 perc), majd a további felhasználásig -80 °C-on tároltuk a felülúszókat. A vizsgálatokat OptEIA™ Set Human ELISA (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) kitek segítségével a gyártó által ajánlott protokollt követve végeztük el. Minden mintát három technikai ismétléssel vittünk fel a lemezre, majd az abszorbancia értékek 405 nm-en történő meghatározását követően a standard sorra „Third order polinomial (cubic)” illesztéssel (GraphPad Prism 9.3.1 (471); Graphpad Software) határoztuk meg az egyes minták citokintartalmát. A kísérleteket *Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.11 Az endotelin-felszabadulás vizsgálata (pán-endotelin ELISA)

A megfelelő kezeléseket követően begyűjtött felülúszók endotelintartalmát „Endothelin Pan Specific DuoSet ELISA” kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) segítségével határoztuk meg, a gyártó által ajánlott protokollt követve. Minden mintát hígítás nélkül, három technikai ismétléssel vittünk fel a lemezekre, majd az abszorbancia értékek 405 nm-en történő meghatározását követően a standard sorra „Third order polinomial (cubic)” illesztéssel (GraphPad Prism 9.3.1 (471); Graphpad Software, LLC) határoztuk meg az egyes minták endotelintartalmát. A kísérleteket *Dr. Oláh Attila, Ádám Dorottya* és *Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.12 A szebociták differenciációjának vizsgálata áramlási citometria segítségével

Az SZ95 szebocitákat 6-lyukú lemezekre szélesztettük (500.000 sejt/well denzitással), majd a megfelelő kezelések elvégzését követően került sor a sejtek jelölésére Nile Reddel (1 µg/ml Nile Red oldat PBS-ben; 30 perces inkubáció 37 °C-on). A jelölést követően a sejteket learattuk, és áramlásos citometriai vizsgálatnak vetettük alá őket. A vizsgálat során a sejteket MACS pufferben (2 mM EDTA és 1,5% BSA CMF-PBS-ben oldva) tartottuk és NovoCyte Flow Cytometer (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) segítségével elemeztük, 488 nm-es gerjesztőlézert alkalmazva. A mérés során a Nile Red fluoreszcens jelét és a granuláltsággal korreláló oldalra szórást (side scatter) egyidejűleg detektáltuk, a kapott adatokat pedig FlowJo szoftver (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA) segítségével értékeltük ki. A kísérletet és az eredmények elemzését *Volascsekné Tóth Kinga Fanni, Pénzes Zsófia és Dr. Szöllősi Attila Gábor* végezte.

5.13 MitoSOX Red jelölés

A reaktív oxigéngyökök (mtROS) mitokondriális termelését MitoSOX Red szuperoxid indikátor festékkel (Thermo Fisher Scientific) követtük nyomon. A HaCaT keratinocitákat (20.000 sejt/well) 96 lyukú „black well, clear bottom” lemezekben (Greiner Bio-One) tenyésztettük. A kísérlet során a sejteket elsőként 5 µM MitoSOX Red szuperoxid indikátorral kezeltük, melyet szérumentes, előmelegített, szintelen Sebomed® Basal Mediumban oldottunk (100 µl/well; 10 perc; 37 °C). Ezt követően a sejteket háromszor mostuk a keratinociták tenyésztése során alkalmazott médiummal (DMEM), majd a jelzett módon kezeltük őket. A 30 perces, 37 °C-on történő inkubációt követően a fluoreszcenciát 510 nm-es gerjesztési és 580 nm-es emissziós hullámhosszon mértük a FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével a már korábban is említett „well scan”

üzemmódban (azaz minden wellben 9 különböző helyen mértünk). A háttérjel (ugyanazon a lemezen lévő fel nem töltött sejteken mért jel) kivonását követően e mérések átlagát egy adatpontként ábrázoltuk relatív fluoreszcencia egységben. A kísérletet és az eredmények kiértékelését *Dr. Oláh Attila és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.14 RNA-Seq módszer

A HaCaT keratinocitákat 35 mm-es Petri-csészékben tenyésztettük (500.000 sejt/1,5 ml médium). A kezeléseket (oldószer kontroll, p(I:C) [20 µg/ml] és p(I:C) [20 µg/ml] + FX [14 µM]) követően (3 biológiai ismétlés) 24 óra elteltével gyűjtöttük össze az RNS mintákat az 5.3.3 pontban leírtak szerint.

A globális transzkriptom adatok gyűjtéséhez nagy áteresztőképességű mRNS-szekvenálást végeztünk Illumina szekvenáló platformon. Az RNS-minták minőségét Agilent BioAnalyzer által ellenőriztük az Eukaryotic Total RNA Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segítségével, a gyártói protokollnak megfelelően. A könyvtárkészítési folyamat során olyan mintákat használtunk fel, amelyek RNS integritási száma (RIN értéke) >7 volt. Az RNA-Seq könyvtárakat a teljes RNS-ből az Ultra II RNA Sample Prep kit (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) segítségével készítettük el a gyártó leírása szerint. A szekvenálási futtatások Illumina NextSeq 500 készüléken (Illumina, SanDiego, CA, USA) készültek, 75 ciklusos egyvégű szekvenálással.

RNA-Seq-adatok elemzése

A nyers szekvenálási adatokat (fastq) a HISAT2 algoritmus segítségével a GRCh38 humán referencia genom verziójához igazítottuk, és BAM fájlokat készítettünk. A további elemzést, beleértve a főkomponens-elemzést (PCA), a StrandNGS szoftverrel végeztük (www.strand-ngs.com). A BAM-fájlokat a DESeq szoftverbe importáltuk, a

normalizáláshoz a DESeq algoritmust használtuk. Moderált T-tesztet használtunk a kezelések során differenciálisan expresszáldó gének meghatározására. A PCA-t az összes gén normalizált génexpressziós értékeinek felhasználásával végeztük el. A PCA-diagram a vizsgált minták egymáshoz való viszonyát mutatja be. Az azonos kezelési csoportba tartozó replikátumok nagyfokú hasonlóságot mutattak, és a három különböző kezelési csoport egyértelműen elkülönült egymástól.

Jelátviteli útvonalak elemzése

A jelátviteli útvonalak elemzését a g:Profiler (verzió: e109_eg56_p17_1d3191d) segítségével végeztük, g:SCS többszörös tesztelési korrekciós módszerrel, 0,05-os szignifikancia küszöböt alkalmazva, az „Ordered query” funkciót használva. A génlistákat feltöltöttük a g:Profiler webes felületére, és a „GO:molekuláris funkció” adatbázisát használva végeztük el az elemzést. Az említett listák azokat a géneket tartalmazták, amelyek szignifikánsan ($FC > 1,5$; $P < 0,05$) up- (p(I:C) vs. oldószer kontroll összehasonlítás) vagy down-regulálódtak (p(I:C)+FX vs. p(I:C) összehasonlítás) az adott kezeléseket követően. A gének fontosságuk szerint csökkenő sorrendbe voltak rendezve, ahol a nagyobb fold-change-et mutató gének voltak fontosabbnak tekintve. Az RNA-Seq-elemzés nyers adatai az NCBI SRA adatbázisában érhetők el (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/1022043>).

Az RNS mintákat *Tóth Kinga Fanni* készítette elő. A szekvenálást *Dr. Póliska Szilárd* végezte. Az adatok kiértékelését *Dr. Póliska Szilárd*, *Dr. Oláh Attila* és *Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.15 BioMAP® Diversity PLUS® profil analízis

Az Eurofins DiscoverX (St. Charles, MO, USA) által tervezett BioMAP® Diversity PLUS® panel a vizsgálni kívánt anyagok biológiaiaktivitás-profiljának a feltérképezésére szolgál. A vizsgálat során az adott anyag több koncentrációjának hatásait vizsgálják meg 12,

az emberi szervezet különböző szervrendszereit reprezentáló, primer sejtekből összeállított modellrendszerben. Az egyes modellrendszerekben előre meghatározott, standard kísérletes végpontokra gyakorolt hatások összessége megadja az adott anyag különböző koncentrációira jellemző aktivitásprofil, amit a kísérlet végeztével összevetnek a cég adatbázisában található anyagok aktivitásprofiljaival, majd (megfelelő matematikai elemzés segítségével) megállapítják a hasonlóság mértékét.

A módszer részletes leírása társszerzőink korábbi publikációiban olvasható.^{172,173} A BioMAP technológiát a US10018621B2, US9734282B2, US8697387B2, US8467970B2, US8019551B2, US7912651B2, US7908089B2, US7266458B2, US6763307B2 és US6656695B2 szabadalmak védik. A kísérleteket és az elemzést *Dr. Jennifer I. Drake* és *Dr. Alison O'Mahony* végezte.

5.16 Molekuláris dokkolás (molekulamodellezés)

A GDC0941-foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) komplex kristályszerkezetét (PDB ID: 3DBS) kollaborációs partnerünk a Protein Data Bank adatbázisból szerezte be.¹⁷⁴ Az analízis a PyMOL 1.7.5.0,¹⁷⁵ az AutoDockTools (ADT) és az MGLTools 1.5.7¹⁷⁶ szoftverek segítségével történt. A FX 3D struktúrafájla a National Biotechnology Information Center (Egyesült Államok) PubChem Compound adatbázisából származott,¹⁷⁷ és minden szimulációra egy ASUS GL502V munkaállomáson került sor. A szimulációkat *Dr. Yesid A. Ramirez* végezte.

5.17 PI3K aktivitás assay

A PI3K aktivitás mérését a PI3K-Glo™ Class I Profiling Kit (sejtmentes enzimaktivitás-mérő kit; Promega, Madison, WI, USA) segítségével végeztük, a gyártó utasításai szerint. Röviden, a FX gátló hatékonyságát 96 lyukú lemez formátumban vizsgáltuk 330 ng/ml kináz (p110δ/p85α) felhasználásával, 100 µl/well végső

reakcióvolumenben. Az optimális enzimkoncentrációt (amely kb. 5%-os konverziós rátát eredményez) több előzetes kísérletben határoztuk meg. A DMSO-tartalmat minden esetben 2,5%-on tartottuk. A lumineszcenciát FlexStation 3 multi-mode reader (Molecular Devices) segítségével határoztuk meg „well-scan” üzemmódban kilenc, well-en belüli pont mérésével, illetve néhány előzetes kísérlet esetében a mérés az Envision[®] 2105 Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) segítségével történt. A megfelelő háttérszűrést követően az eredményeket a 100%-nak tekintett oldószer kontroll százalékában fejeztük ki. A kiugró értékeket a ROUT módszerrel azonosítottuk (Q=10%; GraphPad Prism 9.3.1 (471); GraphPad Software). A kísérleteket és az elemzést *Arany József, Dr. Szöllősi Attila Gábor és Dr. Oláh Attila* végezte.

5.18 Statisztikai analízis

Az adatokat a szebocitákon végzett kísérletek esetén IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM, Armonk, New York, USA), valamint OriginPro 9.0 (OriginLab; Northampton, Massachusetts, USA), míg a FX hatásainak vizsgálatakor GraphPad Prism 9.3.1 (471) (Graphpad Software, LLC) segítségével elemeztük és ábráztuk.

A TRPV3 szebocitákon történő vizsgálatakor kétoldalú, párosítatlan *t*-tesztet (páros összehasonlítás), valamint egyutas ANOVA-t, majd pedig Dunnett (egy kontrollcsoporttal történő összevetés), illetve Bonferroni (többszörös összehasonlítás) *post hoc* tesztet végeztünk.

A FX keratinocitákon kifejtett biológiai hatásainak vizsgálata során a minta méretétől függően az adatok eloszlását Anderson-Darling vagy Shapiro-Wilk tesztekkel vizsgáltuk. Normál eloszlás esetén kétoldalú, párosítatlan *t*-tesztet (páros összehasonlítások) vagy egyutas ANOVA-t, majd Šídák-féle *post hoc* tesztet végeztünk (többszörös összehasonlítások) alkalmaztuk, míg nem normál eloszlás esetén kétoldalú Mann-Whitney

tesztet (páros összehasonlítások), illetve Kruskal-Wallis-tesztet, majd Dunn-féle *post hoc* tesztet (többszörös összehasonlítások) végeztünk.

Vizsgálataink során minden esetben a $P < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikáns különbségnek. A statisztikai analízist és az ábrák elkészítését *Volascsekné Tóth Kinga Fanni, Dr. Szántó Magdolna, Dr. Tóth István Balázs és Dr. Oláh Attila* végezte.

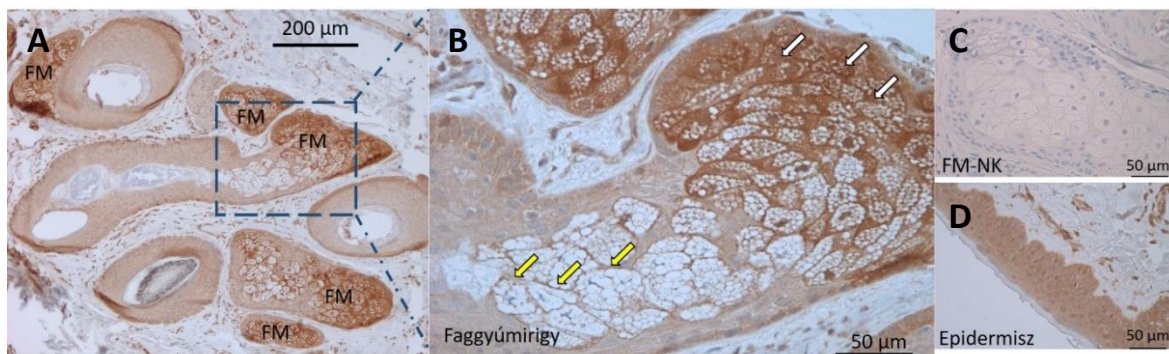
6. Eredmények

6.1 *A TRPV3 aktiválása gátolja a lipogenezist és serkenti a gyulladásos mediátorok termelését humán szebocitákban*

Amint arról az *Irodalmi áttekintés* megfelelő fejezeteiben már szó esett, munkacsoportunk a korábbi években megállapította, hogy a TRPV3 kifejeződik humán epidermális keratinocitákon, farmakológiai aktiválása pedig jelentősen fokozza több gyulladásos citokin kifejeződését és felszabadulását.^{109,113} Kimutattuk azt is, hogy a TRPV1, -2 és -4 ioncsatornák jelen vannak humán szebocitákon; a TRPV1 és TRPV4 esetében ráadásul arra is fény derült, hogy aktivációjuk csökkenti a faggyúlipid-termelést.^{105,114} Mindezek fényében jelen kísérleteink során arra tettünk kísérletet, hogy megvizsgáljuk a TRPV3 expresszióját és lehetséges szerepét humán szebocitákon.

6.1.1 *A TRPV3 jelen van humán faggyúmirigyeken*

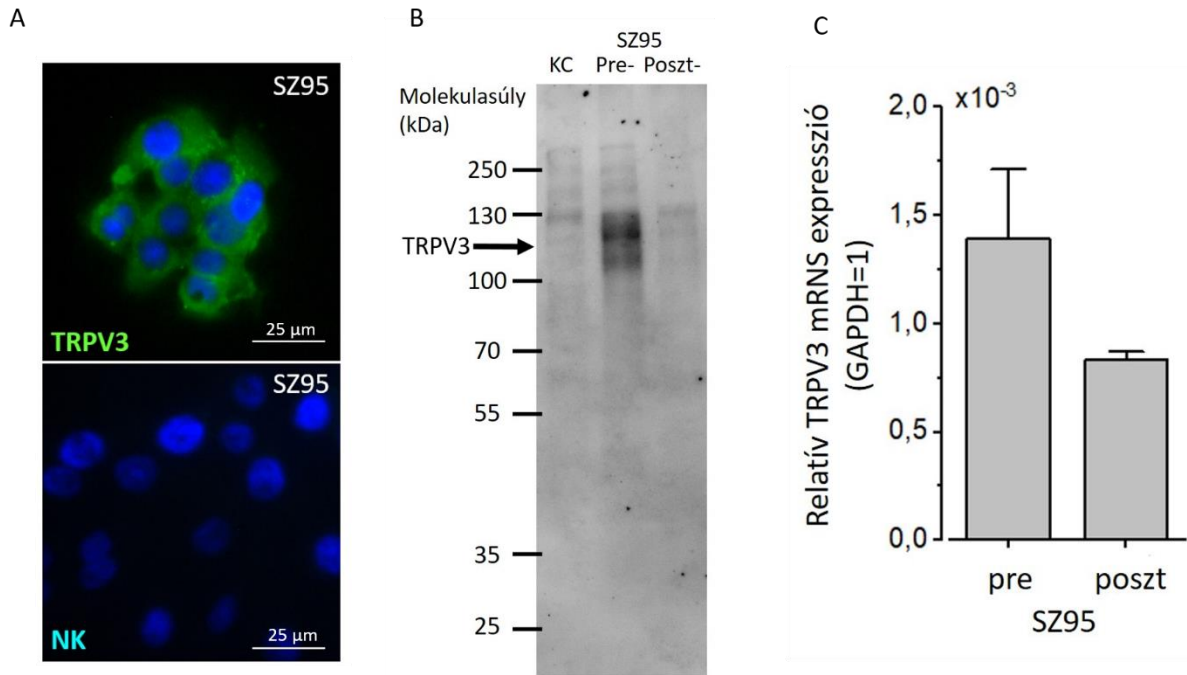
Elsőként immunhisztokémiai analízis segítségével kimutattuk, hogy a receptor nemcsak az epidermiszben, hanem a faggyúmirigyekben is kifejeződik. Eredményeink szerint ráadásul a perifériásan elhelyezkedő, differenciálatlan sejtek erősebb immunpozitivitást mutattak, mint a centrálisan elhelyezkedő, differenciáltabb sejtek (7. ábra), ami arra engedett következtetni, hogy a TRPV3 szerepet játszhat a szebociták érési folyamatainak szabályozásában.



7. ábra A TRPV3 ioncsatorna kifejeződik humán faggyúmirigyekben. A TRPV3 immunhisztokémiai festése (DAB, barna) humán faggyúmirigyekben (FM; A-B) és a szöveti pozitív kontrollként alkalmazott epidermiszben (D). A fehér és sárga nyilak rendre a periférián elhelyezkedő differenciálatlan, illetve a centrálisabban lokalizálódó, differenciált sejteket jelölik (B). Negatív kontroll (NK, (C)). Magfestés: hematoxilin (kék).

6.1.2 A TRPV3 a faggyúmirigyeken tapasztaltnál hasonló kifejeződési mintázatot mutat humán SZ95 sebocitákon

Tekintettel arra, hogy a korábban említettek szerint a humán faggyúmirigyek vizsgálatára nem áll rendelkezésre megfelelő állatmodell, a primer sebociták vizsgálata pedig jelentős objektív nehézségekbe ütközik, kísérleteinket az SZ95 sebocita sejtvonal felhasználásával folytattuk, melyek a humán faggyúmirigysejtek széleskörben használt modelljei.^{169,170} Megállapítottuk, hogy a sebociták mind fehérje, mind mRNS szinten kifejezik a TRPV3-at; az ioncsatorna expressziója ráadásul az immunhisztokémiai festések során nyert eredményekkel összhangban a posztkonfluens, differenciált tenyészetekben alacsonyabbnak adódott, mint a gyorsan proliferáló prekonfluens sejtkultúrák esetén (8. ábra).

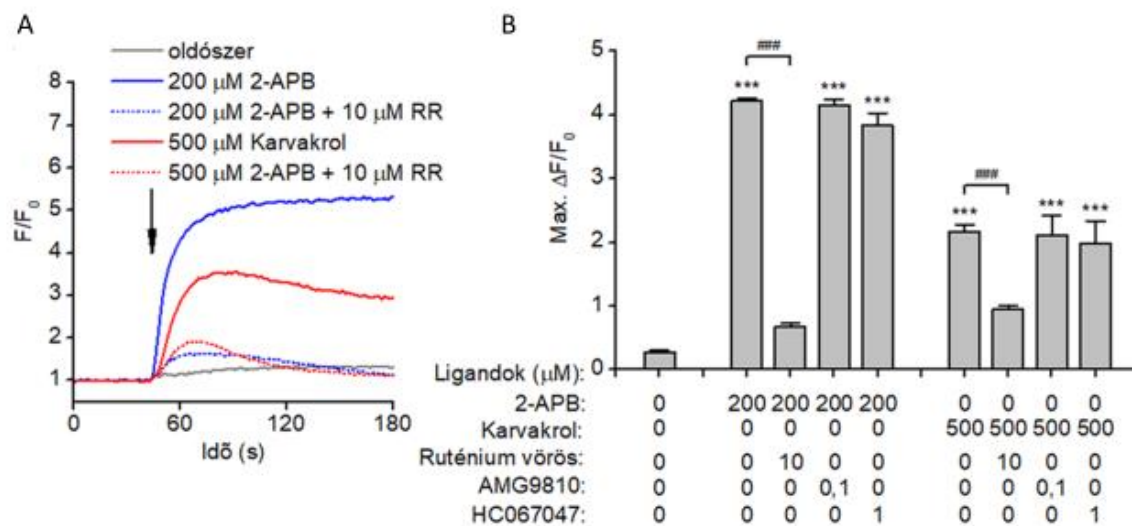


8. ábra A TRPV3 kifejeződik SZ95 sebocitákon. (A) Immunfluoreszcens jelölés az SZ95 sebocitákon (TRPV3: FITC, zöld fluoreszcencia). A kék szín a sejtmagokat jelöli (DAPI). Méretvonal: 25 μm. (B) Humán epidermális keratinociták (KC; pozitív kontroll), valamint differenciálatlan (prekonfluens; „Pre”) és spontán differenciálódott (posztkonfluens; „Poszt”) SZ95 sebocita tenyészetekből készített fehérjeminták western blot analízise. (C) A TRPV3 ioncsatorna mRNS-ének relatív expressziója pre- és posztkonfluens SZ95 sebocita tenyészetekben (átlag±SEM); N=3. NK: negatív kontroll; GAPDH: glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz (belső kontroll); KC: keratinocita; Pre: prekonfluens; Poszt: posztkonfluens.

6.1.3 A TRPV3 aktivációja Ca²⁺-jelet indukál SZ95 sebocitákon

Az expressziós mintázat leírása után funkcionális méréseket végeztünk a TRPV3 biológiai szerepének feltárására. Amit arról már szó esett, korábbi kutatásaink során azt találtuk, hogy a humán epidermális keratinocitákon a TRPV3 funkcionálisan aktív formában, azaz dominánsan Ca²⁺-ra permeábilis ioncsatornaként expresszálódik.^{109,113} Így jelen kísérleteink során is arra törekedtünk, hogy megvizsgáljuk a TRPV3 egy szintetikus (2-aminoetoxidifenil-borát; 2-APB) és egy növényi eredetű (karvakrol) aktivátorának a hatásait humán sebocitákon. A TRPV3 aktivátorok a keratinocitákon tapasztaltakhoz hasonlóan a sebociták esetében is jelentős intracelluláris Ca²⁺-koncentráció-emelkedést eredményeztek. A Ca²⁺-jel ugyanakkor szinte teljesen megszűnt az általános TRP csatorna

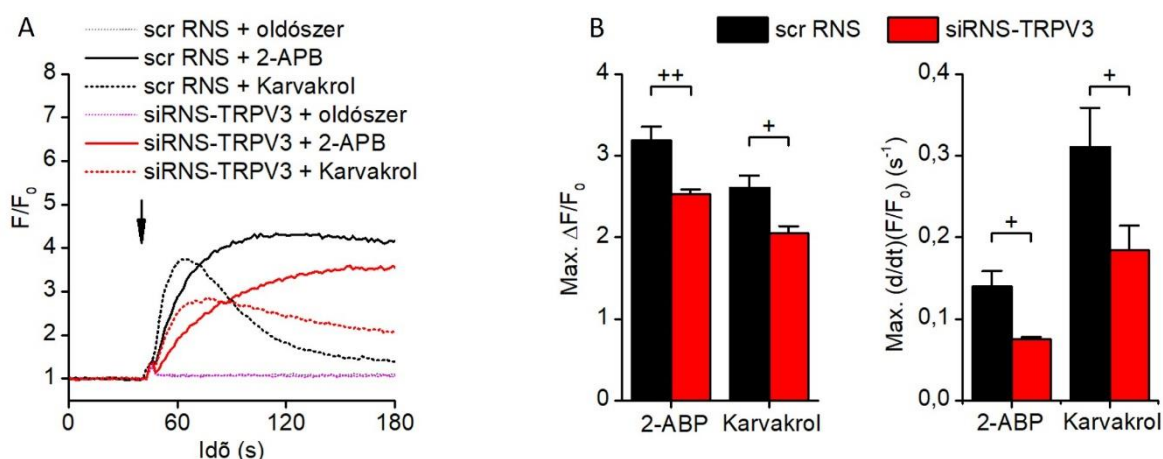
gátló ruténium vörös jelenlétében, míg a sejteken szintén funkcionálisan expresszáldó^{105,114} és a TRPV3-hoz szerkezetileg hasonló TRPV1 és TRPV4 ioncsatornák szelektív antagonistái (az AMG9810, illetve a HC067047) nem befolyásolták a kialakult Ca²⁺-jeleket (9. ábra).



9. ábra A TRPV3 aktivátorok Ca²⁺-jelet indukálnak SZ95 szecitákon. (A) Reprerentatív Ca²⁺-jelek SZ95 szecitákon, amelyeket a TRPV3 agonisták váltottak ki ruténium vörös jelenlétében vagy hiányában, a jelzett koncentrációkban alkalmazva. (B) A Ca²⁺-jelek amplitúdójának statisztikai elemzése különböző körülmények között, a jelzett módon végzett kezeléseket követően (átlag±SEM; N=6 minden csoportban). ***P<0,001 a kontroll csoporthoz képest, illetve ###P<0,001 a megadott csoportok között. 2-APB: 2-aminoetoxidifenil-borát (TRPV3 aktivátor); RR: ruténium vörös (általános TRP csatorna gátlószer).

Mivel sajnálatos módon kísérleteink idején szelektív TRPV3 aktivátorok és antagonisták kereskedelmi forgalomban nem voltak elérhetőek, ezért a 2-APB és a karvakrol hatásainak TRPV3-specificitását RNS interferencia alapú szelektív „géncsendesítés”-sel is megvizsgáltuk. Amint arról már az „Anyagok és módszerek” fejezetben szó esett, a szecitákat a TRPV3 mRNS-ét célzó kis interferáló RNS-sel (siRNS) transzfektáltuk, mely azt eredményezte, hogy a csatorna mRNS és fehérje szintű expressziója a transzfekció követő 2. napra jelentős mértékben csökkent a non-sense RNS-sel („scrambled”; SCR) transzfektált sejtek esetében detektálhatóhoz képest (6. ábra).

Habár a módszer nem volt képes teljesen megszüntetni a TRPV3 kifejeződését, funkcionális méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a „géncsendesített” sejteken szignifikánsan csökkent az agonisták által kiváltott Ca^{2+} jelek amplitúdója és a jelek felszálló szárának meredeksége is (10. ábra). Mindez azt jelenti, hogy a 2-APB és a karvakrol Ca^{2+} -homeosztázisra gyakorolt hatásait humán szebocitákon nagy valószínűséggel döntően a TRPV3 közvetíti.

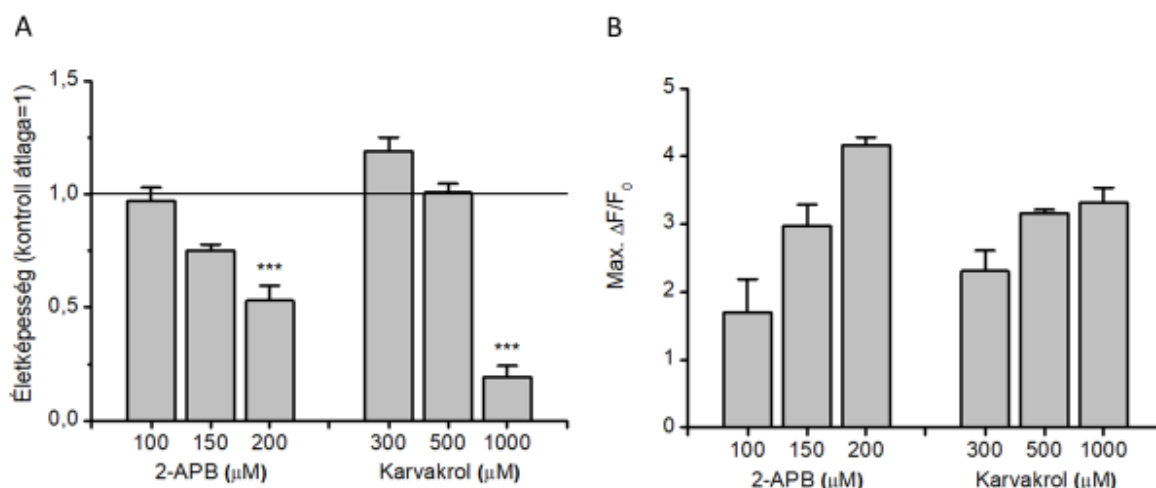


10. ábra A TRPV3 géncsendesítés következményeként az agonisták hatása csökken. (A) Reprezentatív Ca^{2+} -jelek, amelyeket a TRPV3 agonista 2-APB (200 μM) és karvakrol (500 μM) váltottak ki „scrambled” RNS-sel (scr RNS) vagy a TRPV3-at célzó siRNS-sel (siRNS-TRPV3) transzfektált humán SZ95 szebocitákon. (B) A 2-APB-vel és karvakrollal indukált Ca^{2+} -szignálok amplitúdójának és felszállószár-meredekségének statisztikai elemzése. Átlag \pm SEM; N=5 minden csoportban. +P<0,05 és ++P<0,01 a megjelölt csoportok között. scr: scrambled; (transzfekciós kontroll). siRNS: kis interferáló RNS („géncsendesített” sejtek).

6.1.4 A TRPV3 agonisták koncentrációfüggő módon csökkentik a szebociták életképességét

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a TRPV3 farmakológiai aktivációja miként befolyásolja a szebociták jellemző biológiai folyamatait. Elsőként a TRPV3 aktivátorok életképességre gyakorolt hatását vizsgáltuk meg. Eredményeink szerint az aktivátorok magasabb koncentrációban 24 órás kezelések alkalmával csökkentették az élősejt-számot, alacsonyabb - de még egyértelmű Ca^{2+} -jelet indukáló - koncentrációkban

azonban nem befolyásolták szignifikánsan (11. ábra). Mindezek alapján a következő kísérletekben ezen hatékony, de nem citotoxikus koncentrációk (2-APB: 150 μM ; karvakrol: 500 μM) biológiai hatásait vizsgáltuk tovább.

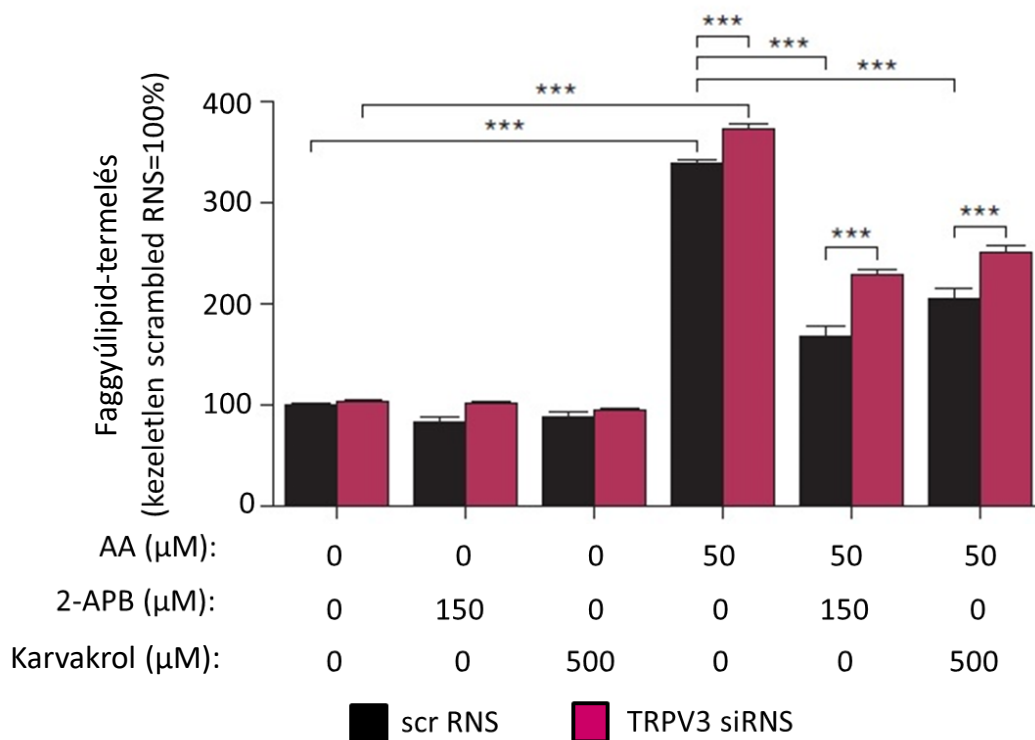


11. ábra A TRPV3 agonisták nem citotoxikus koncentrációi is jelentősen növelik a citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentrációt SZ95 szebocitákon. (A) A TRPV3 agonisták hatása az SZ95 szebociták életképességére (MTT-assay). Átlag \pm SEM; N=7-8 mindegyik csoportban, *** $P < 0,001$ az oldószerrel kezelt, az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll csoporthoz képest (24 órás kezelése). (B) A TRPV3 agonisták akut alkalmazásával kiváltott Ca^{2+} -jelek amplitúdója a megadott koncentrációkban. Átlag \pm SEM; N=3 mindegyik csoportban.

6.1.5 A TRPV3-mediált Ca^{2+} jelátvitel gátolja a faggyúlipid-termelést

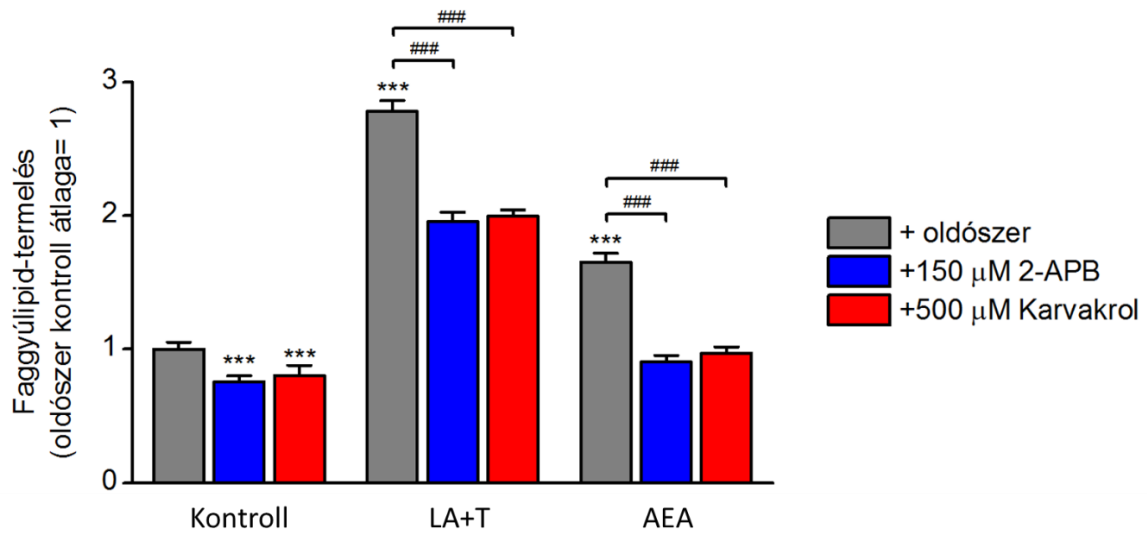
Amint arról a korábbiakban már szó esett, a TRPV3-hoz nagymértékben hasonló TRPV1 és TRPV4 ioncsatornák aktivációja jelentősen csökkenti a különböző lipogén ágensek (pl. AA) által indukált faggyúlipid-termelést humán szebocitákon,^{105,114} ezért kíváncsiak voltunk arra is, hogy a TRPV3 hogyan befolyásolja a sejtek lipidszintézisét. Ennek vizsgálatára a 2-APB és a karvakrol fentebb meghatározott nem citotoxikus, de egyértelmű Ca^{2+} -jelet okozó koncentrációit alkalmazva aktiváltuk a TRPV3 csatornát. A kezelése (a korábban a TRPV1 és a TRPV4 aktiválásakor tapasztaltakhoz hasonlóan)^{105,114} jelentősen csökkentették az AA-val indukált faggyúlipid-szintézist a non-sense RNS-sel transzfektált (scr RNS) sejtek esetén, míg a TRPV3 „géncsendesített” sejteken szignifikánsan kisebb hatást váltottak ki. Megfigyeltük azt is, hogy az AA kis, de

szignifikáns mértékben hatásosabbnak bizonyult a TRPV3 „géncsendesítését” követően, ami alapján feltételezhető, hogy a csatorna alap aktivitása is negatívan szabályozza az AA-indukált lipogenezist (12. ábra).



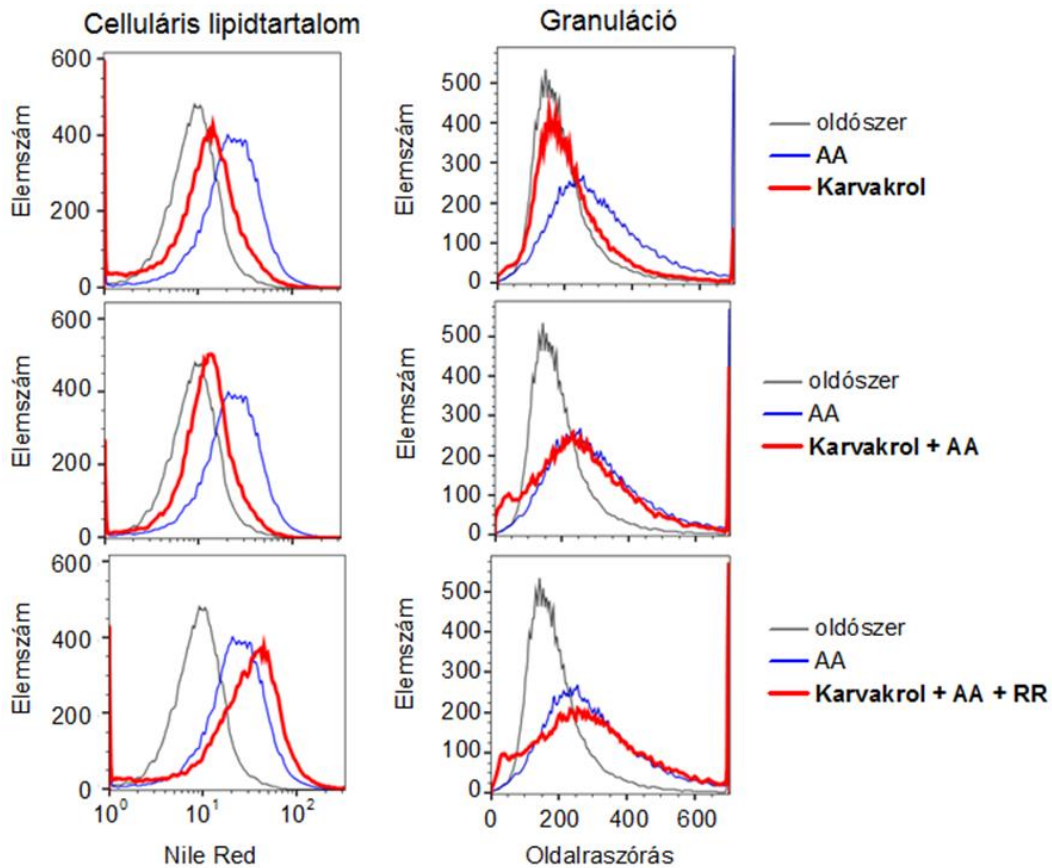
12. ábra A faggyúlipid-termelés szemikvantitatív meghatározása Nile Red jelöléssel a scrambled RNS-sel (scr RNS) és a TRPV3-at célzó siRNS-sel (siRNS-TRPV3) transzfektált SZ95 sebocitákon. A sejteket AA-val és TRPV3 agonistákkal kezeltük 24 órán keresztül. Átlag±SEM; N≥4 mindegyik csoportban. ***P<0,001 a jelölt csoportok között.

Fontos megjegyezni, hogy a TRPV3 agonisták hatása nem korlátozódott az AA-val indukált lipidszintézisre. Az aktivátorok hasonló módon gátolták az AA-étól (PKCδ aktiváció)¹⁷⁸ eltérő mechanizmussal ható endokannabinoid AEA (CB₂ és ERK1/2 MAPK aktiváció)¹⁷⁹ és a linolsav-tesztoszteron kombináció (PPAR aktiváció)¹⁸⁰ lipogén hatásait, emellett pedig valamelyest csökkentették a nem transzfektált sebociták bazális faggyúlipid-termelését is (13. ábra). Mindezek alapján a TRPV3 a faggyúlipid-termelés egy potens negatív regulátora, aktivátorai pedig (a TRPV4 aktivátoraihoz hasonlóan)¹⁰⁵ univerzális liposztikus hatást váltanak ki.



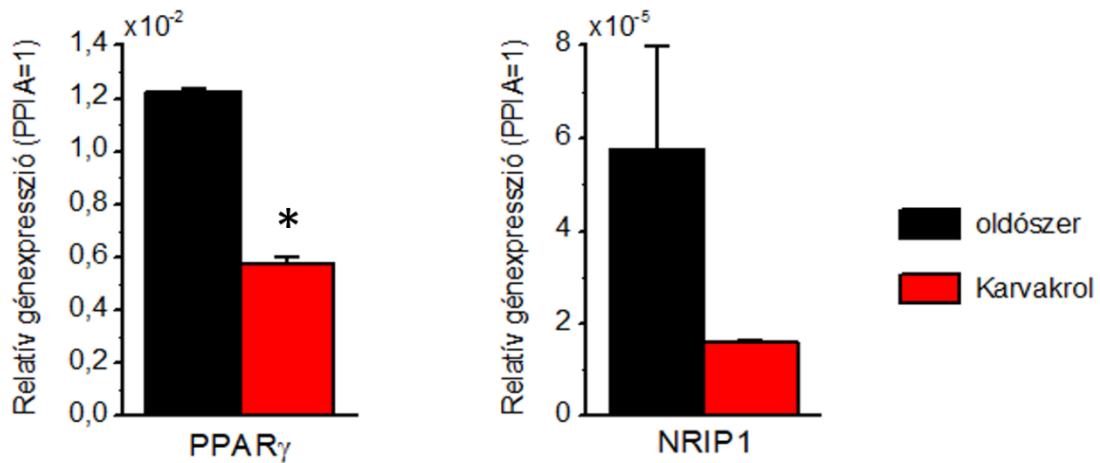
13. ábra A TRPV3 agonisták hatása a humán sebociták faggyúlipid-termelésére. Nile Red jelölés. A lipogenezist 100 µM linolsav és 1 µM tesztoszteron (LA+T) kombinációjával, illetve az endokannabinoid AEA-dal (30 µM) indukáltuk. A TRPV3 agonisták jelenléte szignifikánsan csökkentette mind a bazális, mind az indukált lipidszintézist. Átlag±SEM; N≥4 mindegyik csoportban, ***P<0,001 a kontrollhoz képest és ###P<0,001 a jelzett csoportok között.

A fenti eredményekkel összhangban áramlási citometria segítségével megállapítottuk azt is, hogy a karvakrol (bár nem befolyásolta a sejtek granuláltságát sem kontroll körülmények között, sem pedig AA-val kezelt sejtek esetén) szelektíven gátolta az AA által indukált sejten belüli lipidakkumulációt, melyet az általános TRP csatorna gátlószer ruténium vörös képes volt megakadályozni (14. ábra), újfent megerősítve, hogy valóban egy TRPV csatorna (legvalószínűbben a TRPV3) közvetítheti az említett a hatást.



14. ábra A TRPV3 agonista karvakrol ruténium vörösrel kivédhető módon csökkenti az AA-val indukált lipidszintézist. Az SZ95 szebocitákat 48 órán át kezeltük az ábrán látható kombinációkban (AA: 100 μ M; karvakrol: 500 μ M; ruténium vörös [RR]: 10 μ M). A sejteket ezt követően Nile Red oldattal megfestettük, majd összegyűjtöttük, és áramlási citometriás mérésnek vetettük alá az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint. A Nile Red festék fluoreszcenciáját és az oldalra szórást (SSC) párhuzamosan mértük a celluláris lipidtartalom és a granuláció értékeléséhez.

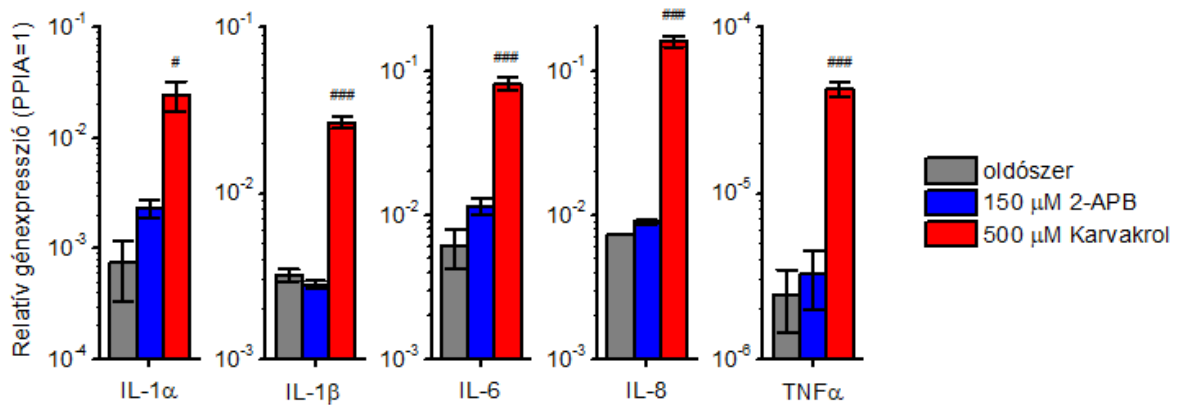
A jelenség molekuláris hátterét kutatva további kísérleteink során megvizsgáltuk a faggyúlipid-termelés fontos pozitív regulátorainak, a PPAR γ -nak és az NRIP1-nek^{105,181} az mRNA szintű kifejeződését. Kimutattuk, hogy a karvakrol képes mindkét molekula mRNA szintű expresszióját csökkenteni (15. ábra), így feltételezhető, hogy a TRPV3 aktivátorok liposztatikus hatásának kialakulásában a PPAR γ és az NRIP1 down-regulációja is szerepet játszhat.



15. ábra A faggyúlipid-szintézist pozitívan szabályozó PPAR γ és NRIP1 mRNS-szintű expressziója karvakrol kezelés hatására csökken (Q-PCR). A sejteket 500 μ M karvakrollal vagy oldószerrel kezeltük 24 órán keresztül. A karvakrol csökkentette a lipidszintézist szabályozó fenti kulcsgének kifejeződését. Átlag \pm SEM; N=3; *P<0,05.

6.1.6 A karvakrol (részben TRPV3-függő módon) fokozza egyes gyulladáscitokinek kifejeződését és felszabadulását

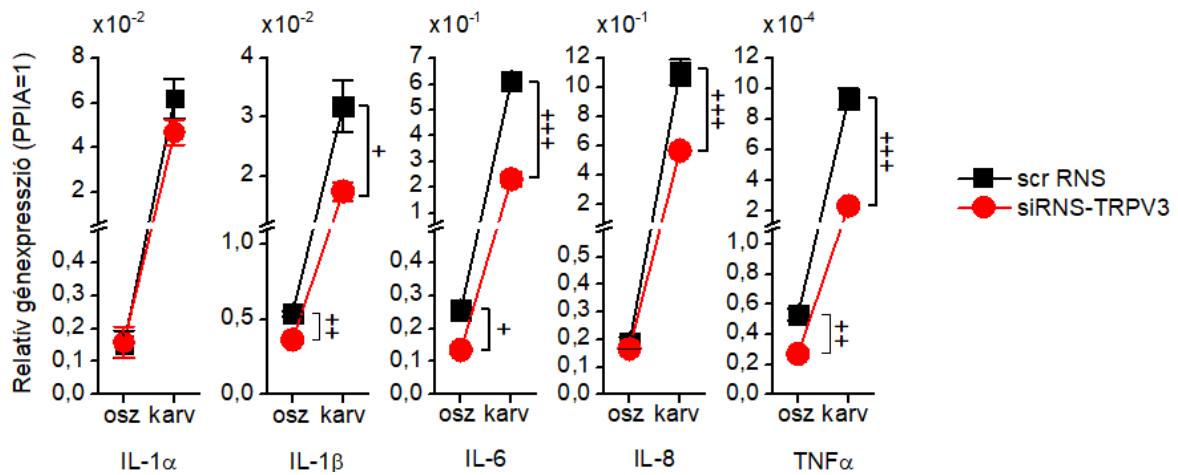
A lipidtermelés mellett a faggyúmirigyek hozzájárulnak a bőr immunfolyamatainak szabályozásához is,^{168,182} a TRPV3 aktivációjáról pedig ismert, hogy epidermális keratinociták esetén jelentős gyulladáscitokinek kialakulásához vezet,¹⁰⁹ fokozott kifejeződése és kóros aktivitása pedig szerepet játszik az AD-re jellemző bőrgyulladás kialakulásában.^{110,113} A fentieket számításba véve a TRPV3 sebocitákon játszott szerepét feltáró kísérleteink záróakkordjaként megvizsgáltuk a TRPV3 aktiváció SZ95 sebociták immunfenotípusára gyakorolt hatását is. Eredményeink azt mutatták, hogy a TRPV3 agonista karvakrol (500 μ M) 6 órás kezelést követően egyértelműen fokozta számos gyulladáscitokin transzkripcióját, míg – érdekes módon – a 2-APB 150 μ M-os koncentrációban alkalmazva hatástalannak bizonyult (16. ábra).



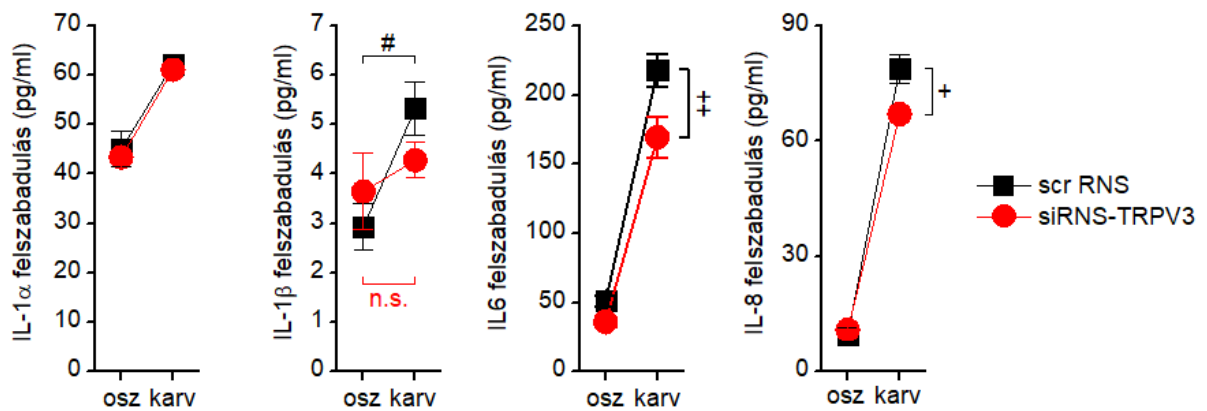
16. ábra A karvakrol fokozza egyes gyulladási citokinek mRNA szintű expresszióját SZ95 szecitákon. A sejteket 6 órán át oldószerrel vagy TRPV3 agonistákkal kezeltük. # $P < 0,05$ és ### $P < 0,001$ az oldószerrel kezelt kontrollhoz képest. Belső kontrollként a PPIA kifejeződését határoztuk meg. $N=3$. IL: interleukin. TNF: tumornekrózis faktor.

Annak eldöntésére, hogy a karvakrol gyulladási választ kiváltó hatása TRPV3 specifikusan alakult-e ki, kísérleteinket TRPV3-csökkentett SZ95 szecitákon is megismételtük. Azt tapasztaltuk, hogy a TRPV3 szelektív „gécscsökkentése” az IL-1 β , az IL-6, az IL-8 (CXCL8) és a TNF- α esetén jelentősen csökkentette a karvakrol gyulladást indukáló hatását (17. ábra), ami ismét azt támasztotta alá, hogy a TRPV3 részt vesz a karvakrol hatásainak közvetítésében. Érdekes módon ugyanakkor a gécscsökkentés nem befolyásolta az IL-1 α karvakrol-indukálta up-regulációját.

Végezetül eredményeink transzlációs relevanciájának növelésére azt is megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolja a karvakrol a gyulladási citokinek felszabadulását. mRNA szinten nyert eredményeinkkel jó összhangban azt tapasztaltuk, hogy a TRPV3 szelektív „gécscsökkentése” ugyan nem befolyásolta az IL-1 α szintjét a sejtek felülűszójában, de jelentősen csökkentette az IL-1 β , az IL-6 és az IL-8 (CXCL8) felszabadulását (18. ábra), míg a TNF- α koncentrációja detekciós küszöb alattinak adódott (nem publikált megfigyelés). Mindezek alapján a TRPV3 valóban fontos (de nagy valószínűséggel nem kizárólagos) szerepet játszik a karvakrol gyulladási választ indukáló hatásának kialakításában.



67. ábra A karvakrol gyulladásoos választ indukáló hatása döntően TRPV3-függő módon alakul ki. Q-PCR. A „scrambled” RNS-sel (scr RNS) és a TRPV3-specifikus siRNS-sel (siRNS-TRPV3) transzfektált SZ95 szebocitákat karvakrollal (500 μ M) vagy a karvakrol oldószerével kezeltük 6 órán keresztül. Átlag \pm SEM; N=3, +P<0,05, ++P<0,01 és +++P<0,001 a „scrambled”RNS-sel és a TRPV3-specifikus siRNS-sel transzfektált sejtek között. Karv.: karvakrol; scr RNS: non-sense („scrambled”) RNS-sel transzfektált tenyészetek; siRNS-TRPV3: TRPV3-csenedesített tenyészetek; osz: oldószer kontroll.

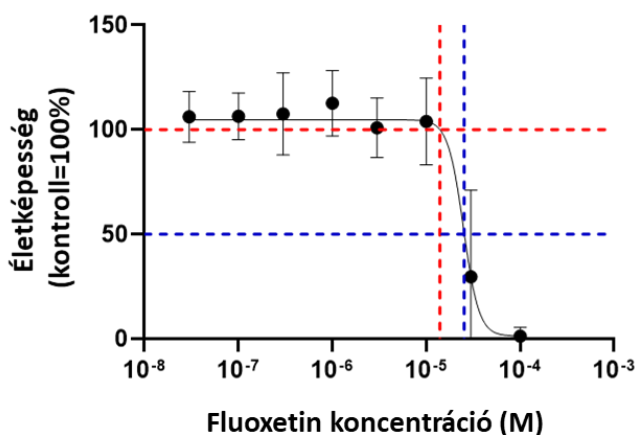


78. ábra A TRPV3 szelektív „gécnsenedesítése” jelentősen csökkenti több gyulladásoos citokin karvakrol-indukálta felszabadulását. A 18. ábrán bemutatott 6 órás kezeléseket követően begyűjtött felülűszók felhasználásával elvégzett ELISA. Átlag \pm SEM N=3. +P<0,05, ++P<0,01 és +++P<0,001, valamint #P<0,05, a jelölés szerint. Karv.: karvakrol; n.s.: nem szignifikáns különbség; scr RNS: non-sense („scrambled”) RNS-sel transzfektált tenyészetek; siRNS-TRPV3: TRPV3-csenedesített tenyészetek; osz: oldószer kontroll.

6.2 A FX a PI3K útvonal indirekt gátlásával gyulladáscsökkentő hatást fejt ki humán epidermális keratinocitákon, és csökkenti a viszketésmediátor endotelinek felszabadulását

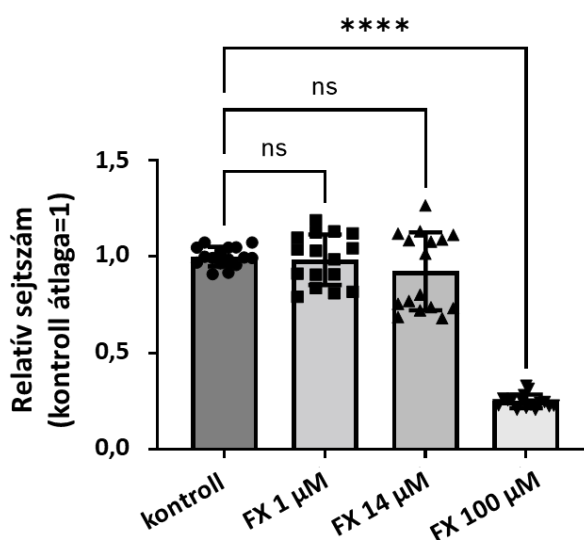
6.2.1 14 μM -os koncentrációig a FX a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható humán keratinocitákon

Kísérleteink első lépéseként meg szeretnénk határozni azt a legmagasabb FX-koncentrációt, amely 24 órás kezelés során nem gyakorol káros hatást a keratinociták életképességére. Amint az a 19. ábrán látható, a keratinocitákat többféle FX-koncentrációval (100 μM -ig) teszteltük. A megfelelő görbeillesztés azt mutatta, hogy a 24 órás kezelések során a FX félcitotoxikus koncentrációja $\sim 25,43 \mu\text{M}$ volt, míg a legmagasabb koncentráció, amely nem csökkentette a jel intenzitását az oldószer kontroll szintje alá, 14 μM volt (19. ábra).



19. ábra: A FX koncentrációfüggő módon csökkenti a HaCaT keratinociták életképességét a 24 órás kezelések során (MTT-vizsgálat). A HaCaT keratinocitákat különböző FX-koncentrációkkal (vagy oldószerrel, DMSO-val) kezeltük 24 órán keresztül. A háttérjel intenzitásértékét kivontuk, majd az adatokat az oldószerrel kezelt kontrollcsoport (100%-nak tekintett) átlagára való normalizálásukat követően $N=12$ biológiai ismétlés átlaga \pm SD értékeként mutatjuk be. A **szaggatott kék vonalak** a félcitotoxikus koncentrációt jelzik (azaz azt a koncentrációt, amelynél a számított MTT jelintenzitás az oldószerrel kezelt kontroll 50%-ára csökken; $\sim 25,43 \mu\text{M}$). A **szaggatott piros vonalak** 14 μM -t jelölik, azaz a legmagasabb koncentrációt, amelynél a számított MTT jelintenzitás nem csökkent az oldószerrel kezelt kontrollcsoport szintje alá (100%).

Ezt követően, hogy kizárjuk annak lehetőségét, hogy a FX 14 μM -os koncentrációban citotoxikus hatást vált ki, egy másik módszerrel, az ún. CyQUANT-assay segítségével is megvizsgáltuk a sejtszámra gyakorolt hatást. Ez a vizsgálat megerősítette, hogy 14 μM -ig a FX nem csökkentette a sejtek számát a 24 órás kezelések során az oldószerrel kezelt kontrollcsoporthoz képest (20. ábra), míg 100 μM -os alkalmazás esetén jelentősen csökkentette azt. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy a FX 14 μM -os koncentrációban alkalmazható a tervezett rövid (3 órás) és középtávú (24 órás) kísérleteinkben a citotoxicitás kockázata nélkül.

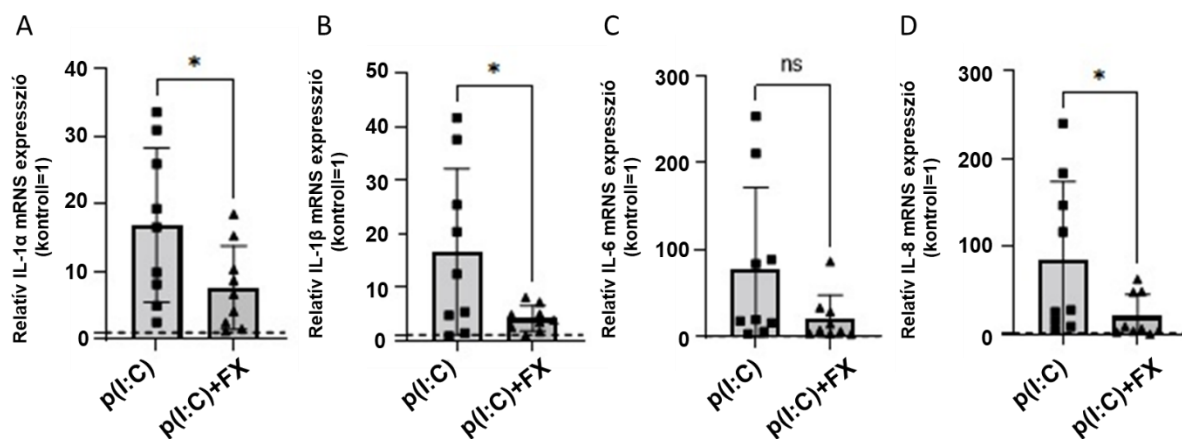


20. ábra: 14 μM -ig a FX nem csökkenti a HaCaT keratinociták sejtszámát a 24 órás kezelések során, míg 100 μM -nál citotoxikus hatást fejt ki (CyQUANT-vizsgálat). Az adatokat az oldószerrel kezelt kontrollcsoport (1-nek tekintett) átlagára való normalizálásukat követően $N=16$ biológiai ismétlés átlaga \pm SD értékeként mutatjuk be. **** $P<0,0001$ a jelzettek szerint. ns: nem szignifikáns. FX: fluoxetin.

6.2.2 A FX jelentősen csökkenti több gyulladáscsökkentő citokin p(I:C) által indukált up-regulációját humán epidermális keratinocitákon

A következőkben a FX feltételezett gyulladáscsökkentő hatását vizsgáltuk meg egy általunk korábban optimalizált¹⁸³ gyulladáscsökkentő modellrendszerben. A TLR3 aktivátor p(I:C)-t 20 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban alkalmazva megállapítottuk, hogy várakozásainknak megfelelően a 3 órás kezelések során jelentősen megnövelte számos gyulladáscsökkentő citokin (IL-

1 α , IL-1 β , IL-6 és IL-8 [CXCL8]) mRNA-expresszióját. Ezeket a hatásokat az IL-1 α , az IL-1 β és az IL-8 (CXCL8) esetén a FX (14 μ M) egyidejű alkalmazása képes volt szignifikánsan csökkenteni, míg az IL-6 esetén a változás nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket ($P=0,1615$) (21. ábra).

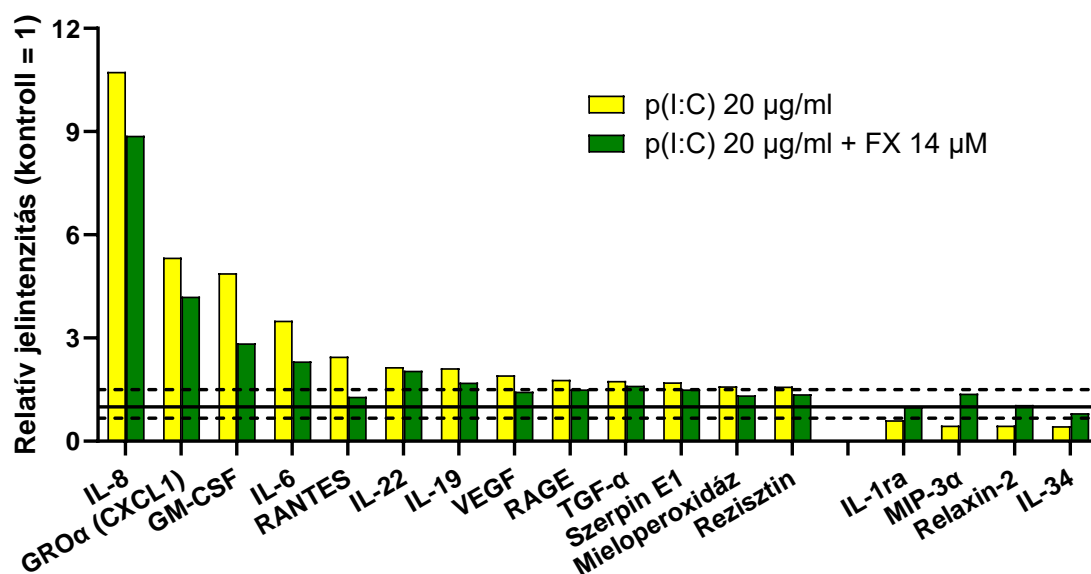


21. ábra: A FX 3 órás kezelést követően szignifikánsan csökkenti a p(I:C) gyulladáshatását HaCaT keratinocitákon. Kísérleteink során az IL-1 α (A), az IL-1 β (B), az IL-6 (C) és az IL-8 (CXCL8) (D) mRNA-szintű expresszióját Q-PCR segítségével vizsgáltuk a jelzett 3 órás kezeléseket követően. Belső kontrollként a 18S rNS expresszióját határoztuk meg, majd a relatív génexpressziók megállapítását követően az eredményeket a $\Delta\Delta$ CT módszert alkalmazva az ábrán szaggatott vonallal jelölt kontroll expressziós szintjére normalizáltuk, és átlag \pm SD ($N=9$ biológiai ismétlés) alakban ábráztuk. * $P<0,05$. ns: nem szignifikáns. FX: fluoxetin (14 μ M); IL: interleukin; p(I:C): poliinozin-policitidilsav (20 μ g/ml).

6.2.3 A FX csökkenti az IL-8 (CXCL8) p(I:C)-indukálta felszabadulását

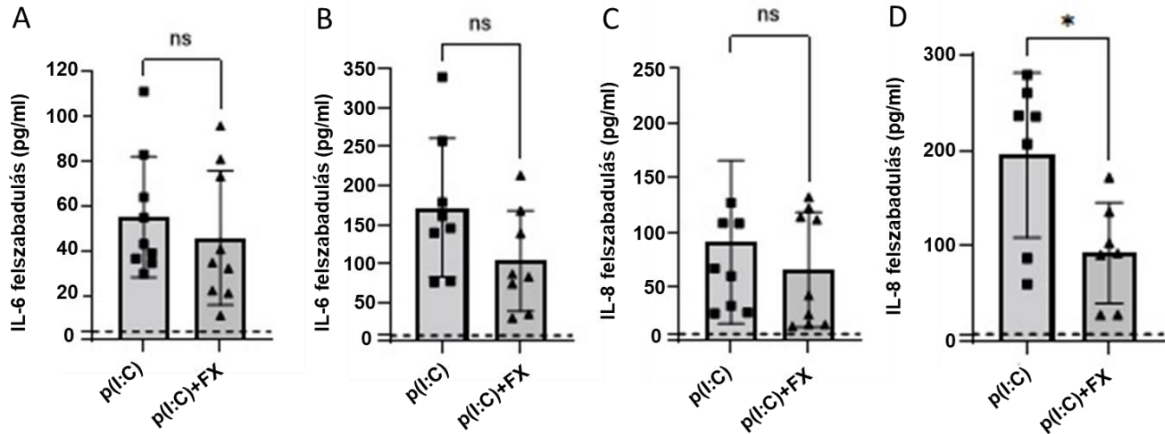
Mivel génexpressziós kísérleteink arra engedtek következtetni, hogy a vizsgált FX koncentráció hatékonyan enyhítheti a p(I:C) által kiváltott gyulladáshatást, következő lépésként fehérje szinten folytattuk vizsgálatunkat. Ennek során elsőként citokin array-t végeztünk. Az array eredményei azt mutatták, hogy a 20 μ g/ml p(I:C)-vel végzett 3 órás kezelés 13 molekula felszabadulását növelte, míg 4 molekuláét csökkentette (22. ábra és Függelék A1. táblázat; a kísérlet során a kontroll jelintenzitásához képest $\geq 1,5$ -szeres változást tekintettük biológiailag relevánsnak), a FX (14 μ M) együttes adagolása pedig valamennyi esetben csökkentette a változás mértékét (22. ábra). Mindez arra utalt, hogy a

FX mRNS-szinten észlelt gyulladásgátló hatása a citokinek/kemokinek felszabadulásának szintjén is megnyilvánulhat.



22. ábra: A FX csökkenti a p(I:C) gyulladós hatását HaCaT keratinocitákon. A sejteket a jelzett módokon kezeltük 3 órány keresztül. A felülúszókat összegyűjtöttük, majd citokin array kit segítségével megvizsgáltuk. A háttér értékével történő korrekciót követően az átlagos jelintenzitásokat (2 technikai ismétlés adataiból számítva) normalizáltuk az adott molekula oldószerral kezelt kontroll kultúra esetében mért értékére (kontroll = 1; folytonos vonal). A jelintenzitás $\geq 1,5$ -szeres p(I:C)-indukált növekedését vagy csökkenését tekintettük releváns változásnak (szaggatott vonalakkal jelölve). FX: fluoxetin; GM-CSF: granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor, más néven kolóniastimuláló faktor 2; GRO α : C-X-C motívumos kemokin ligand 1; IL: interleukin; IL-1ra: interleukin 1 receptor antagonista; MIP-3 α : C-C-motívumú kemokin ligand 20; p(I:C): poliinozin-policitidilsav; RAGE: előrehaladott glikozilációs végtermék specifikus receptor; RANTES: C-C-motívumos kemokin ligand 5; TGF: transzformáló növekedési faktor; VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A.

Ezen eredményeinket megerősítendő a keratinociták felülúszóját 3 és 24 órány kezeléseket követően tovább vizsgáltuk, hogy nyomon kövessük a már rendelkezésre álló citokin készlet gyulladós stimulus által kiváltott korai felszabadulását (3 óra), valamint a *de novo* szintetizált citokinek szekrécióját (24 óra). Q-PCR-ral nyert adatainkkal összhangban azt találtuk, hogy bár a FX csökkenteni látszott az IL-6 p(I:C)-indukált felszabadulását, a hatás egyik vizsgált időpontban sem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket, 24 órány kezelése esetén azonban szignifikánsan csökkentette az IL-8 (CXCL8) felszabadulását (23. ábra).

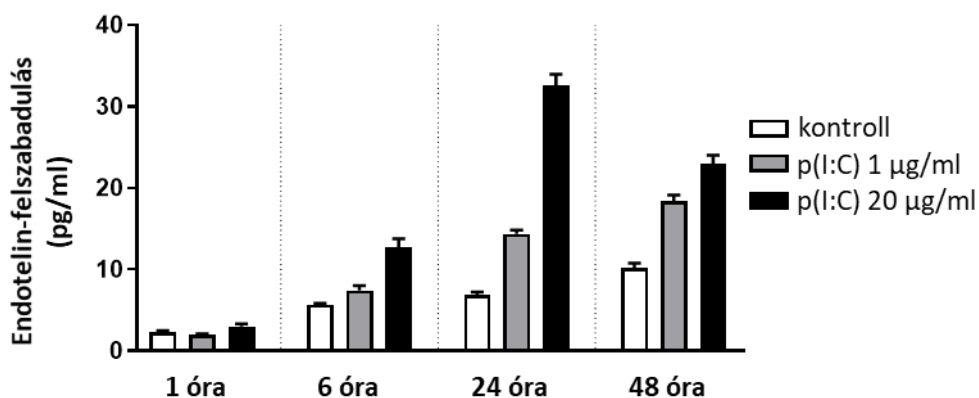


23. ábra: A FX jelentősen csökkent a p(I:C) által indukált IL-8 (CXCL8) felszabadulást (24 órás kezelések). A HaCaT keratinocitákat az ábrán jelzettek szerint kezeltük 3 (A és C) vagy 24 (B és D) órán keresztül. A felülűzőket összegyűjtöttük, majd specifikus ELISA kitek segítségével megvizsgáltuk az IL-6 (A és B) és az IL-8 (CXCL8) (C és D) felszabadulását a sejtekből. Átlag±SD; N=7-9 biológiai ismétlés. Az oldószerrel kezelt kontroll tenyészetek átlaga az ábrákon szaggatott vonallal van jelölve. **, *** és ****P<0,01, 0,001, illetve 0,0001, ns: nem szignifikáns. FX: fluoxetin (14 µM); IL: interleukin; p(I:C) poliinozin-policitidilsav (20 µg/ml).

6.2.4 A FX immortalizált (HaCaT) és primer humán epidermális keratinocitákon egyaránt kivédi a viszketést közvetítő endotelinek p(I:C) által indukálta felszabadulását

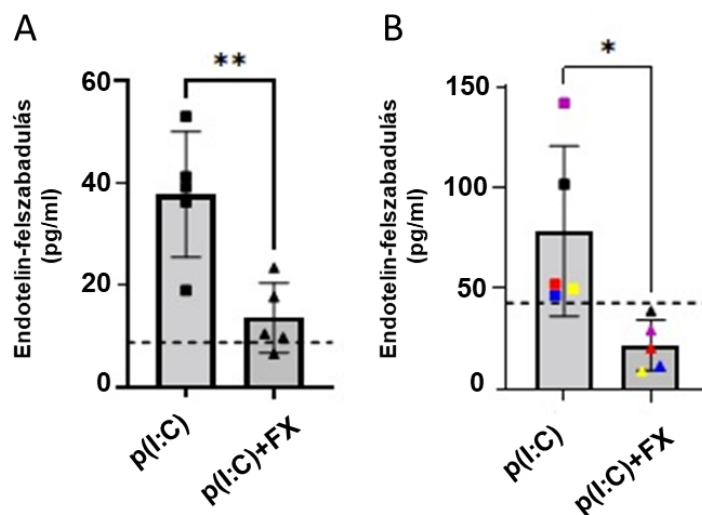
Miután kimutattuk, hogy a FX gyulladásgátló hatást fejthet ki modellrendszerünkben, célunk az volt, hogy tovább vizsgáljuk feltételezett jótékony hatásait. Mint fentebb említettük, a viszketés a bőrgyógyászati állapotok széles skálájának egyik leggyakoribb tünete,¹⁸⁴⁻¹⁸⁸ és a különböző pruritogének felszabadításán keresztül az epidermális keratinociták fontos szerepet játszanak a kialakulásában.^{184,185} Irodalmi adatok alapján a különféle endotelinek (és különösen is az endotelin-1) kulcsfontosságú keratinocita-eredetű viszketést elősegítő mediátorok.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Az endotelin-1 kifejeződése ráadásul az AD-ben szenvedő betegek tüneteket mutató bőrterületének epidermiszében up-regulálódik¹⁹² és plazmaszintje pozitív korrelációt mutat a tünetek súlyosságával is.¹⁹³ Mivel a TLR3-ról nemrégiben kiderült, hogy számos viszketéssel járó bőrbetegségben up-regulálódik, és p(I:C) általi aktiválása nagymértékben fokozza az endotelin-felszabadulást a primer humán epidermális keratinocitákból,³⁶ azt kívántuk megvizsgálni, hogy a FX miként befolyásolja

ezt a folyamatot. Ennek során először pán-endotelin ELISA kit segítségével egy előkísérletben kimutattuk, hogy az endotelin felszabadulása a primer epidermális keratinocitákhoz hasonlóan HaCaT keratinocitákban is 24 órás, 20 µg/ml p(I:C) kezelés hatására növekedik meg a legnagyobb mértékben (24. ábra).



24. ábra: A p(I:C) koncentráció- és időfüggő módon növeli az endotelin-felszabadulást a humán epidermális keratinocitákból. A HaCaT keratinocitákat az ábrán jelzettek szerint kezeltük 1, 6, 24, illetve 48 órán keresztül. A felüluszókat összegyűjtöttük, majd pán-endotelin ELISA kit segítségével vizsgáltuk az endotelin felszabadulásának kinetikáját. Az ábrán az adatokat 3 technikai ismétlés átlag±SD értékeként fejezzük ki; p(I:C): poliinozin-policitidilsav (1 és 20 µg/ml).

Mindezek fényében későbbi kísérleteinkben a 24 órás kezelések során 20 µg/ml p(I:C) alkalmaztunk a keratinocitákon. Megállapítottuk, hogy a FX (14 µM) együttes alkalmazása szinte teljesen kivédi a p(I:C)-indukált endotelin-felszabadulást HaCaT keratinocitákban (25/A ábra), valamint primer humán epidermális keratinocitákban (25/B ábra) egyaránt. Adataink tehát amellet szólnak, hogy a FX nemcsak gyulladáscsökkentő hatással bírhat, hanem képes lehet bizonyos viszketéstípusok enyhítésére is, hatásai pedig valószínűleg donorfüggetlen módon alakulnak ki.



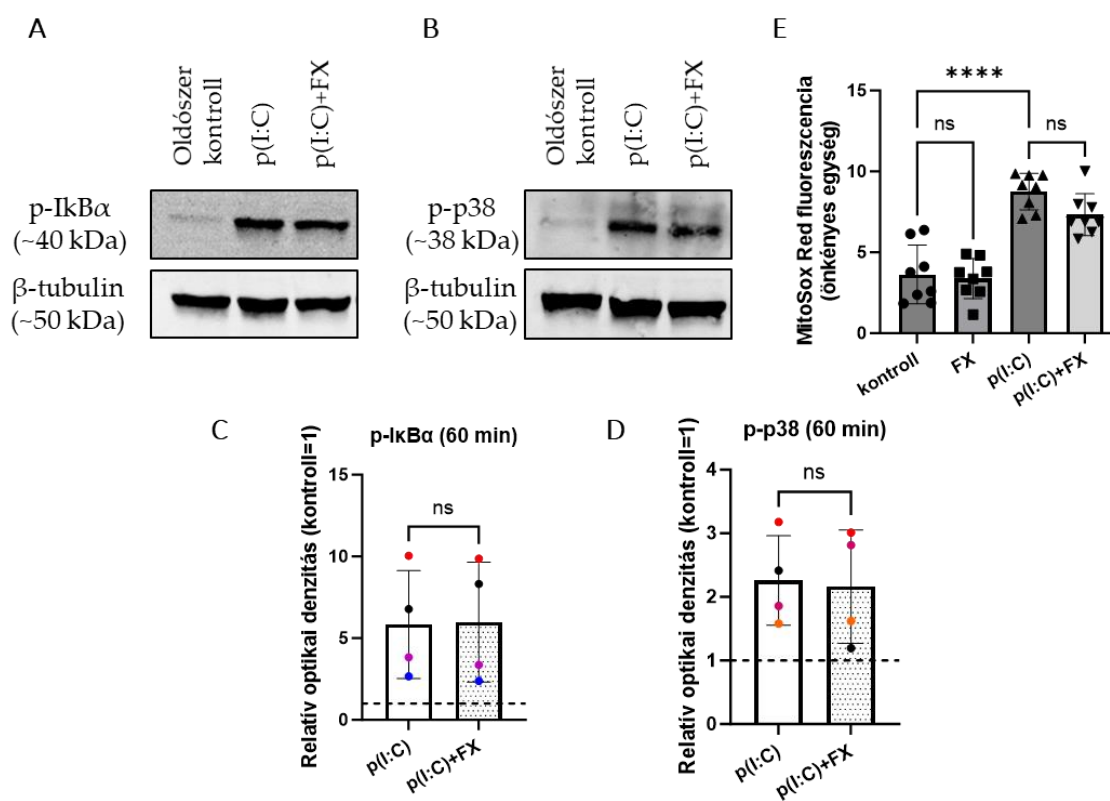
25. ábra: A FX gátolja a p(I:C)-indukált endothelin-felszabadulást humán epidermális keratinocitákban. HaCaT keratinocitákat (A), valamint 5 donorból származó primer humán epidermális keratinocitákat (B) 24 órán keresztül a fent bemutatott módon kezeltünk. A felülúszókat összegyűjtöttük, majd egy specifikus, endothelin-felszabadulás kimutatására alkalmas ELISA kit segítségével megvizsgáltuk azokat (a részleteket lásd az Anyagok és módszerek részben). Az adatok $N=5$ biológiai ismétlés (HaCaT keratinociták; A) vagy 5 donor (primer epidermális keratinociták; B) átlaga \pm SD értékeként vannak kifejezve. Az oldószerral kezelt kontroll tenyészetek átlaga mindkét esetben szaggatott vonallal van jelölve. A primer epidermális keratinociták esetében minden szín egy független donort jelöl (a részleteket lásd az Anyagok és módszerek szakaszban és a 2. táblázatban). * és ** $P<0,05$, illetve $0,01$, a jelzetteknek megfelelően. FX: fluoxetin ($14 \mu\text{M}$); p(I:C): poliinozin-policidilsav ($20 \mu\text{g/ml}$).

6.2.5 A FX nem befolyásolja a p38 és az I κ B α p(I:C)-indukált foszforilációját, és a reaktív oxigéngyökök mitokondriális termelésének (mtROS) emelkedését sem akadályozza meg

A TLR3 stimulálása az NF- κ B útvonala¹⁹⁴ aktiválásához vezethet az I κ B α gátló szabályozó foszforilációján (és ezáltal inaktiválásán) keresztül, továbbá a TLR3 a p38 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalat is aktiválhatja.¹⁹⁵ Egy korábbi kísérletben összehasonlítottuk a 10, 20, 30 és 60 perces p(I:C)-kezelés ($20 \mu\text{g/ml}$) hatásait. Adataink azt mutatták, hogy a p(I:C) 60 perc után indukálta a legerőteljesebben az I κ B α és a p38 foszforilációját (Western blot; nem publikált adatok). Ezért a további kísérleteinkben úgy döntöttünk, hogy 60 perces kezeléseket alkalmazunk. Amint az a 26/A-D ábrákon látható,

azt találtuk, hogy a FX (14 μ M) együttes adása nem befolyásolta az I κ B α vagy a p38 p(I:C)-indukált foszforilációját (Western blot), ami arra utal, hogy a gyulladáscsökkentő hatása az NF- κ B vagy a p38 MAPK aktivitással való közvetlen kölcsönhatás nélkül alakulhat ki.

Az NF- κ B és a p38 MAPK útvonalakra gyakorolt hatásai mellett a TLR3 aktiválása a reaktív oxigéngyökök mitokondriális termelését is növelheti (mtROS).¹⁹⁶ Azonban, ahogyan a 26/E ábrán látható, bár a FX együttes alkalmazása csökkenteni látszott a p(I:C)-indukált mtROS termelést (MitoSOX Red jelölés; 30 perces kezelések), a különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet ($P=0,142$).



26. ábra: A FX nem befolyásolja az NF- κ B és a p38 MAPK útvonalakat, továbbá nem képes szignifikánsan csökkenteni a p(I:C)-indukált mtROS termelést. (A-B) Western blot. HaCaT keratinociták négy különböző passzázsát kezeltük a jelzett módon 60 percig, majd a Western blot analízis elvégzéséhez begyűjtöttük a fehérjemintákat. Az A és B paneleken a p-I κ B α (A) és a p-p38 (B) reprezentatív immunoblotjai láthatók, míg a denzitometriás elemzés eredményei a C és D paneleken láthatók. Az oldószerrel kezelt kontroll tenyészetek átlaga szaggatott vonalként látható. Az adatokat 4 biológiai ismétlés átlaga \pm SD értékeként fejezzük ki. Minden szín egy független passzázsából származó adatot jelöl. (E) A mtROS-termelés vizsgálata MitoSOX Red jelöléssel a jelzett, 30 perces kezeléseket követően. Az adatokat 8 biológiai ismétlés átlaga \pm SD értékeként fejezzük ki. **** $P < 0.0001$. FX: fluoxetin (14 μ M); ns: nem szignifikáns; p(I:C): poliinozin-policitidilsav (20 μ g/ml).

6.2.6 A 14 μM -ban alkalmazott FX és a PI3K-gátló GDC0941 biológiaiaktivitás-profilja
figyelemre méltó hasonlóságot mutat

Miután a három legnyilvánvalóbb gyulladáscsökkentő jelátviteli útvonalat kizártuk^{194–196} általánosabb módszert választottunk a FX hatásmechanizmusának feltárására. A lehető leginkább elfogulatlan vizsgálómódszert keresve kollaborációs partnereink a *BioMAP*[®] *Diversity PLUS*[®] panel segítségével 12 különböző humán primer sejt alapú rendszerben (Függelék A2. táblázat) előre definiált és optimalizált végpontok segítségével térképezték fel a FX különböző koncentrációinak aktivitásprofiljait, majd a kapott eredményeket összehasonlították az adatbázisban szereplő más vegyületek hatásaival. Ez az elemzés kimutatta, hogy 14 μM -os koncentrációban alkalmazva a FX-t, annak aktivitási profilja rendkívüli hasonlóságot mutatott a PI3K-útvonal jól ismert inhibitorának,¹⁹⁷ a 370 nM-os koncentrációban alkalmazott, „pictilisib”-ként is ismert GDC0941-nek az aktivitási profiljával (Pearson-féle korrelációs együtthatót figyelembe véve; 5. táblázat, 27/A ábra).

5. táblázat A FX gyulladáscsökkentő hatású koncentrációjának aktivitási profilja figyelemreméltó hasonlóságot mutat a PI3K-gátló GDC0941 biológiai hatásával

Tesztelni kívánt anyag	Célvegyületek	Z-score érték	Pearson-féle korrelációs együttható	Közös „read out” paraméterek	Mechanizmus
Fluoxetin (14 μM)	GDC0941 (370 nM)	19,631	0,926	148	PI3K gátló
	Amitriptilin (30 μM)	18,973	0,918	148	Noradrenalin/ Szerotonin visszavételezést gátló szer
	Ciszteamin-hidroklorid (680 μM)	18,967	0,918	148	Cisztin modulátor

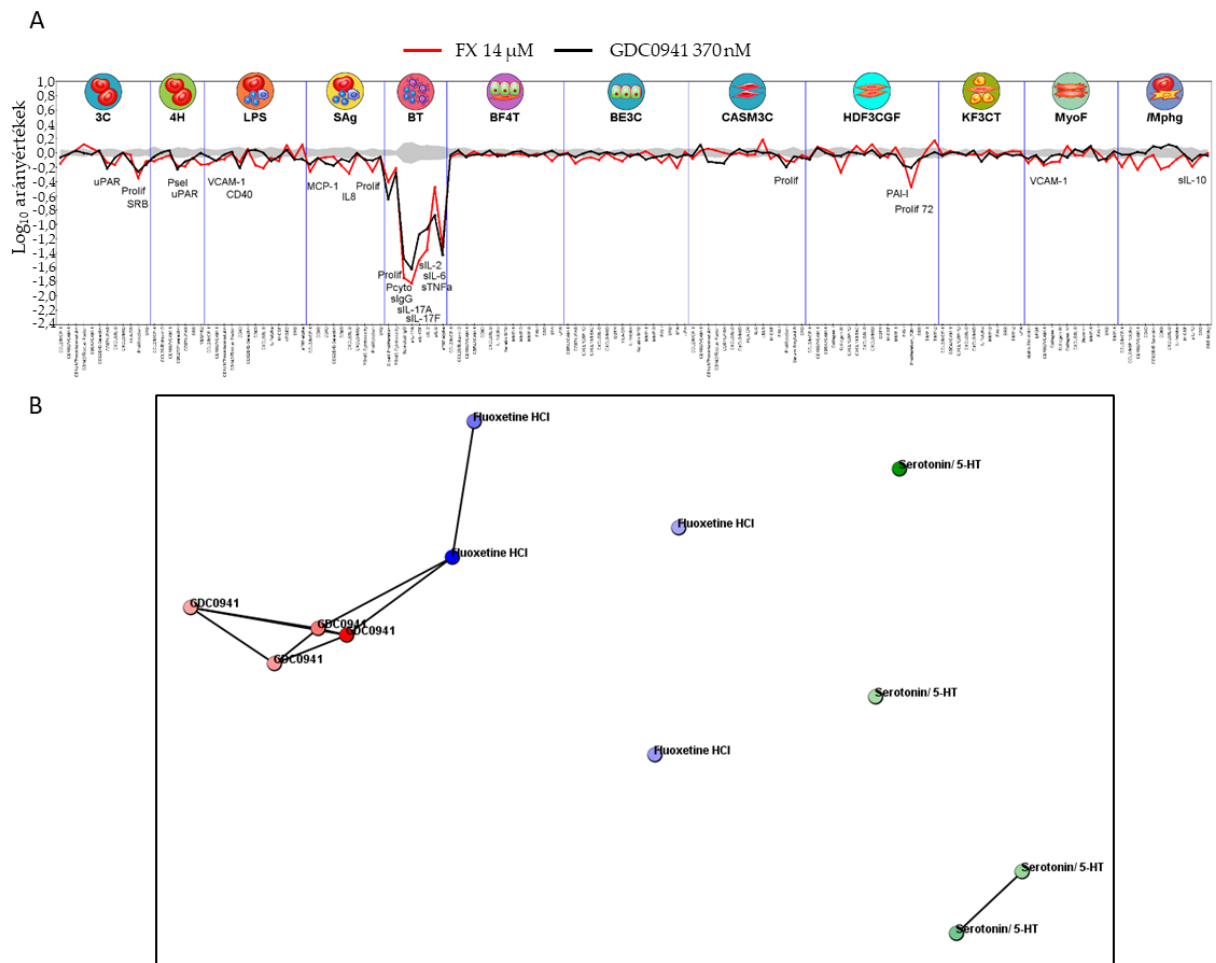
Figyelemreméltó, hogy bár a FX szelektív szerotonin visszavételezést gátló szerként ismert, amely elsősorban a szerotonin tónus emelésével hat, a szerotonin nem szerepelt a vezető találatok között (sőt, a 14 μM FX-t a 90 μM -ban alkalmazott szerotoninnal összehasonlítva a Pearson-féle korrelációs együttható (r) mindössze 0,354 volt), ami arra utal, hogy az általunk vizsgált gyulladáscsökkentő koncentrációban a FX nagy

valószínűséggel nem a „klasszikus” szerotoninerg jelátvitelen keresztül fejt ki hatását. Ezt az adatok klaszterelemzése is megerősítette, hiszen az analízis során egyértelművé vált, hogy míg a FX alacsonyabb (520 és 1600 nM) koncentrációi a magasabb FX dózisoktól távolabb (és egyszersmind a szerotoninhoz közelebb) klasztereződtek, magasabb (4,7 és 14 μ M) koncentrációi külön klasztert alkottak, amely nagy hasonlóságot mutatott a GDC0941 különböző koncentrációinak hatásaival (27/B ábra). Mindezek alapján a 14 μ M-ban alkalmazott FX gyulladáscsökkentő és pruritogén mediátorok felszabadulását csökkentő hatása valószínűleg nem a szerotoninerg jelátviteli rendszerben ismert, klasszikus célpontjaira gyakorolt hatásainak köszönhetően, hanem a gyulladással PI3K jelátvitel közvetlen vagy közvetett befolyásolása következtében alakul ki.^{198–201}

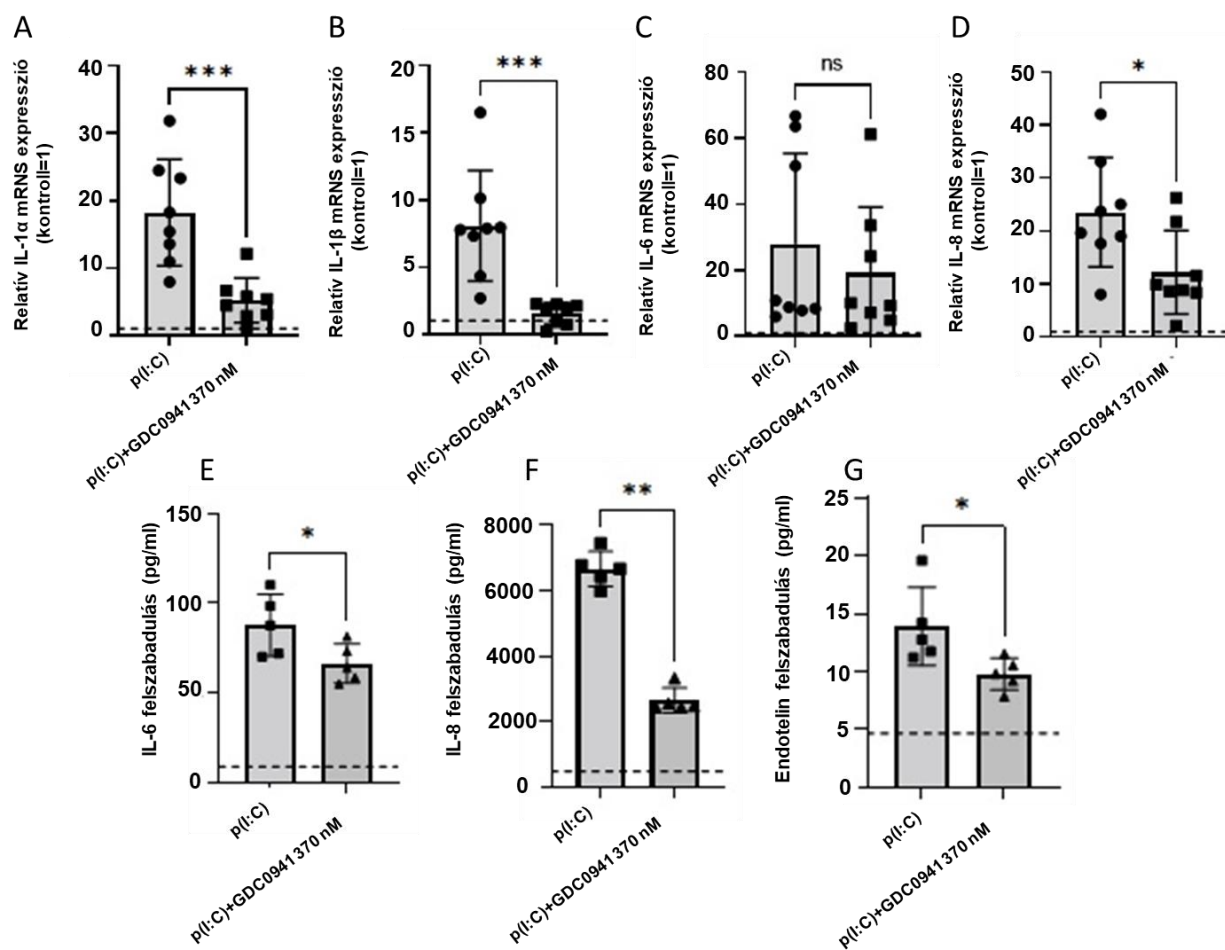
Amint arról fentebb már szó esett, a PI3K a gyulladással kapcsolatos folyamatok egyik fontos irányítója.^{198–201} Egyes adatok alapján a FX *in vivo* gátolhatja a PI3K foszforilációját (és ezáltal aktivációját) diabéteszes patkányokban¹⁵⁵ és egér BV-2 mikroglia sejtekben,¹⁵⁶ míg mások a PI3K aktivitására gyakorolt koncentráció- és időtartamfüggő, közvetett, kétfázisú hatásról számoltak be.¹⁵⁷ Ennek megfelelően az, hogy a FX biológiai hatásainak közvetítésében a PI3K-kaszád aktivitásának változásai (is) szerepet játszhatnak, nem tekinthető példanélkülinek a szakirodalomban.

6.2.7 *A GDC0941 utánozza a FX gyulladáscsökkentő és endotelin felszabadulást gátló hatását*

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a FX kedvező hatásait a hámsejtek esetén kiválthatja-e a PI3K gátlása, ezért a biológiai aktivitás-profil tekintetében legnagyobb hasonlóságot mutató molekula, a GDC0941 legmegfelelőbb koncentrációjának (370 nM) a hatását is megvizsgáltuk a gyulladással modellünkben.



27. ábra: A biológiaiaktivitás-profilok elemzése alapján a 14 μM -os FX kezelés jelentős hasonlóságot mutat a PI3K-gátló GDC0941 (370 nM) hatásával. Fontos kiemelni, hogy a FX (14 μM) és a PI3K-gátló GDC0941 (370 nM) profiljai nagymértékben átfednek egymással (A). A szürke árnyék a korábbi kísérletek során alkalmazott oldószerkontollok hatásait mutatja az egyes végpontok esetén (konfidencia intervallum: 95%). B) A FX (0,52, 1,6, 4,7 és 14 μM), a GDC0941 (14, 41, 120 és 370 nM) és a szerotonin (3,3, 10, 30 és 90 μM) több koncentrációjának összehasonlító elemzése azt mutatja, hogy a szerotonin aktivitásprofilja egyértelműen elkülönül a FX és a GDC0941 profiljától. A sötétebb színek magasabb koncentrációkat jeleznek. A pontok akkor kapcsolódnak egymáshoz, ha a Pearson-féle korrelációs együtthatójuk nagyobb, mint 0,7. CD: „cluster of differentiation”; FX: fluoxetin; HLA-DR: II. osztályú hisztokompatibilitási antigén; IL: interleukin; LDLR: alacsony sűrűségű lipoprotein receptor; MCP-1: monocita kemoattraktáns protein-1; M-CSF: makrofág kolóniastimuláló faktor; PAI-1: plazminogén aktivátor inhibitor-1; Pcyto: PBMC citotoxicitás; PBMC: perifériás vér monomorfonukleáris sejt; Prolif: proliferáció; Prolif 72: proliferáció 72 órás kezelés során; SAA: szérum amiloid A; sIgG: szekretált immunglobulin G; sIL: szolubilis interleukin; sPGE2: oldható prosztaglandin E2; SRB: szulfurodamin B; TF: szöveti faktor; TM: trombomodulin; sTNF α : szolubilis tumornekrózis faktor-alfa; TIMP-2: a metalloproteinázok szöveti inhibitora 2; tPA: szöveti plazminogén aktivátor; uPAR: urokináz plazminogén aktivátor felszíni receptor; VCAM-1: vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1; VEGFR2: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor 2. A modellek és a végpontok összefoglalása a Függelék A2. táblázatában olvasható.



28. ábra: A 370 nM-os koncentrációban alkalmazott GDC0941 utánozza a FX legfontosabb biológiai hatásait humán keratinocitákban. (A-D) Q-PCR. A HaCaT keratinocitákat az ábrán bemutatott módon kezeltük 3 órán keresztül. Belső kontrollként a 18S RNS expresszióját határoztuk meg, majd a relatív génexpressziók megállapítását követően az eredményeket a $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmazva az ábrán szaggatott vonallal jelölt kontroll expressziós szintjére normalizáltuk, és $\text{átlag} \pm \text{SD}$ ($N=8$ biológiai ismétlés) alakban ábrázoltuk. A GDC0941 szignifikánsan csökkentette az IL-1 α (A), az IL-1 β (B) és az IL-8 (CXCL8) (D) mRNS szintű kifejeződését és (nem szignifikáns mértékben) mérsékelte az IL-6 p(I:C) által indukált fokozott expresszióját is (C). (E-G) ELISA. A HaCaT keratinocitákat az ábrán bemutatott módon kezeltük 24 órán keresztül. A felülúszókat összegyűjtöttük és specifikus ELISA kitek segítségével megvizsgáltuk az IL-6 (E), az IL-8 (CXCL8) (F) és az endotelin (G) felszabadulását a sejtekből (a részleteket lásd az Anyagok és módszerek fejezetben). Az adatokat $N=5$ biológiai ismétlés $\text{átlag} \pm \text{SD}$ formában fejezzük ki; az oldószerrel kezelt kontroll tenyészetek átlaga szaggatott vonallal van jelölve. *, ** és *** $P < 0,05$, $0,01$ és $0,001$, ns: nem szignifikáns. p(I:C): poliinozin-policitidilsav (20 $\mu\text{g/ml}$).

Megállapítottuk, hogy 370 nM-os koncentrációban alkalmazva a GDC0941 szinte tökéletesen utánozza a FX biológiai hatásait humán keratinocitákon. A FX-hez (14 μM) hasonlóan a GDC0941 is gátolta az IL-1 α , az IL-1 β és az IL-8 p(I:C)-indukált fokozott

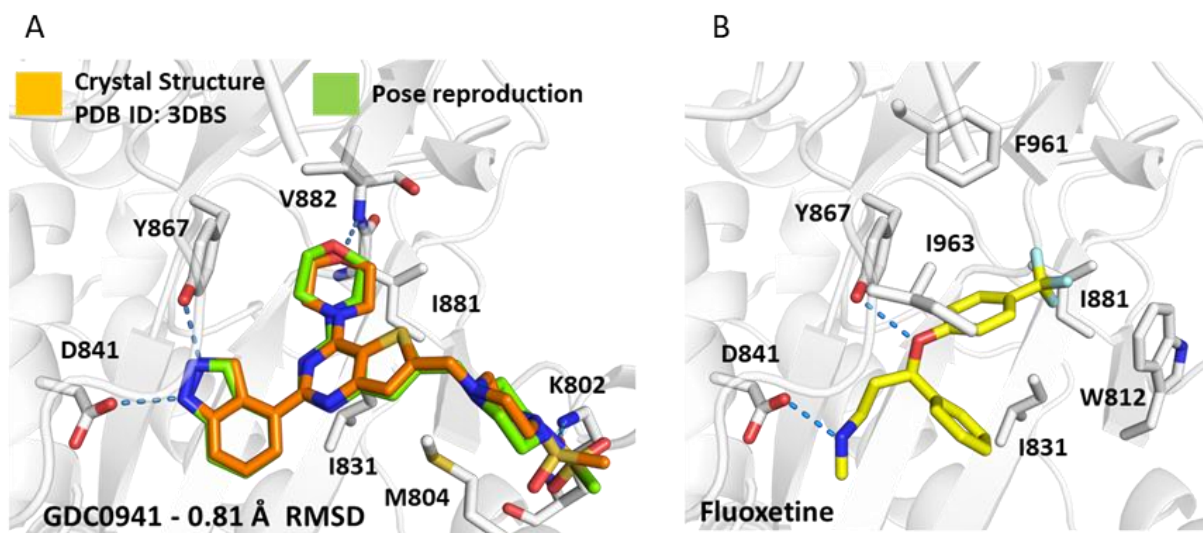
kifejeződését, de (ismét csak a FX-hez hasonlóan) nem volt szignifikáns hatása az IL-6 mRNS-expressziójára (28/A-D ábra; Q-PCR, 3 órás kezelések). Mindemellett 24 órás kezelések alkalmával hatékonyan csökkentette az IL-6, az IL-8/CXCL8 és az endotelinek p(I:C) által indukált felszabadulását is (28/E-G ábra; ELISA). Ezek az adatok azt sugallják, hogy a 14 μ M-ban alkalmazott FX jótékony gyulladáscsökkentő és pruritogén-felszabadulást gátló hatását valóban közvetítheti a PI3K útvonal gátlása humán epidermális keratinocitákon.

6.2.8 *Az in silico molekuláris dokkolási adatok azt sugallják, hogy a GDC0941 és a FX elfoglalhatják ugyanazt a kötőhelyet a PI3K-on*

Mint azt fentebb említettük, számos irodalmi adat utal arra, hogy a FX képes lehet modulálni a PI3K útvonal aktivitását.^{92,157,162} Legjobb tudomásunk szerint azonban arra vonatkozóan kísérleteinket megelőzően nem volt irodalmi adat, hogy ezt a hatást a FX közvetlenül a PI3K enzimekhez kapcsolódva vagy közvetetten (azaz más, a PI3K hatásával interferáló jelpályákra hatva) fejti-e ki. A GDC0941 és a FX aktivitásprofiljai közötti figyelemre méltó hasonlóságok (27. ábra), valamint a GDC0941 humán keratinociták citokin- és endotelintermelésére gyakorolt hatásáról szóló adataink (28. ábra) alapján felmerült, hogy a GDC0941-hez hasonlóan esetleg a kellően magas koncentrációban alkalmazott FX is gátolhatja közvetlenül a PI3K-t. A feltételezett közvetlen kölcsönhatás vizsgálatához elsőként kollaborációs partnerünk *in silico* molekuláris kötődésvizsgálatot végzett, hogy kiderüljön, a FX képes lehet-e a GDC0941-hez hasonlóan a PI3K ATP-kötő helyéhez kötődni.

A megfelelően optimalizált dokkolási protokoll következetesen reprodukálta a GDC0941 kötődés kísérletes úton meghatározott pozícióját, hiszen a legjobbnak ítélt pozíció csak 0,81 Å-mel különbözött a kísérletileg megfigyelt helyzettől (29/A ábra). A modellezés során emellett sikerült a kötődést közvetítő kulcsfontosságú hidrogénkötéseket is

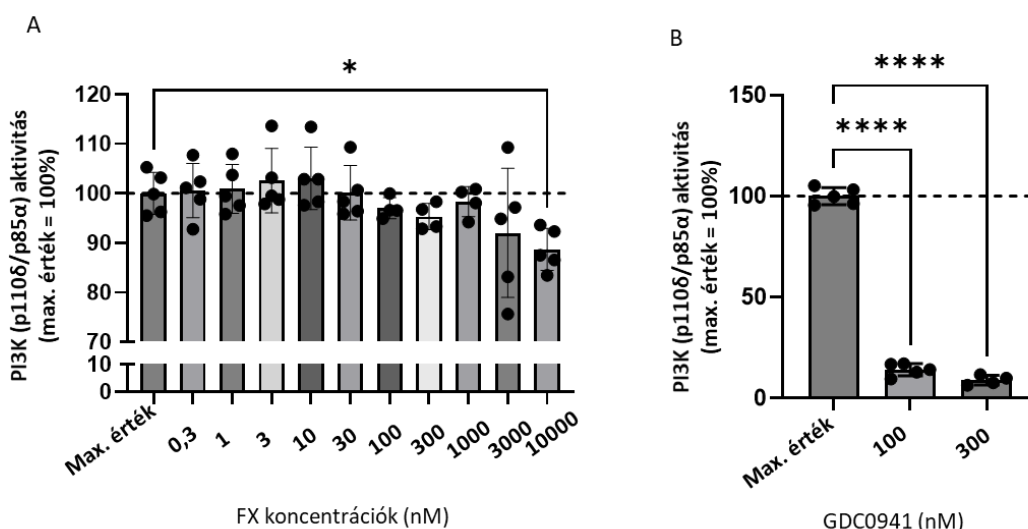
reprodukálni a GDC0941 és az enzim megfelelő oldalláncai (D841, Y867, V882 és K802) között (a 29/A ábrán kék szaggatott vonalakkal jelölve). A FX lehetséges kötődését vizsgálva az analízis kimutatta, hogy a FX képes lehet a GDC0941-hez nagyon hasonló módon kötődni a PI3K enzim ATP-kötő zsebéhez, és hidrogénkötéseket kialakítani több olyan oldallánccal (D841 és Y867), amelyekhez a GDC0941 is kötődik (29/B ábra). A molekulamodellzés tanúsága szerint emellett a FX (trifluor-metil)benzol- és fenilcsoportjai részben kitöltik a W812, I831, I881, F961 és I963 oldallánccok által meghatározott hidrofób részt, amelyet kísérletes eredmények szerint a GDC0941 hidrofób tienopirimidin magja foglal el a kötődés során.²⁰² Bár a fentiek alapján a FX nagy valószínűséggel valóban képes a GDC0941 kötőhelyét elfoglalni a PI3K enzimen, fontos megjegyezni, hogy a modellezés segítségével meghatározott kötési energiája alacsonyabb volt, mint a GDC0941-é (FX: -8,05 kcal/mol; GDC0941: -10,62 kcal/mol). A különbség nagy valószínűséggel a FX kisebb méretének köszönhető.



29. ábra A FX képes lehet kötődni a PI3K enzim ATP-kötő helyére. (A) A GDC0941 pozíciójának reprodukciója (0,81 Å négyzetes közép deviáció). (B) A PI3K γ -alegység ATP-kötőhelyén belül a FX legvalószínűbb pozíciója. A hidrogénkötéseket kék szaggatott vonalak jelölik.

6.2.9 A FX kisebb gátlást gyakorol a PI3K aktivitására sejtmentes enzimaktivitást mérő teszt során, mint a GDC0941

A következőkben, megvizsgáltuk, hogy egy sejtmentes vizsgálat során a FX képes-e közvetlenül gátolni a PI3K aktivitását. Bár a FX magas koncentrációja képes volt szignifikánsan gátolni a PI3K aktivitását (30/A ábra), a megfigyelt gátlás sokkal gyengébb volt, mint a GDC0941 által kiváltott (30/B ábra). Adataink tehát amellet szólnak, hogy bár kellően magas koncentrációban a FX közvetlenül gátolja a PI3K aktivitását, gyulladáscsökkentő hatását valószínűleg a PI3K közvetett befolyásolásán keresztül és nem a PI3K enzim közvetlen gátlása révén alakítja ki a humán keratinocitákban.



30. ábra: A FX gyengén gátolja PI3K-t

A-B: PI3K-aktivitási vizsgálat. A FX kismértékű gátlást fejt ki a PI3K aktivitásra sejtmentes enzimaktivitási tesztben. Az adatokat N=4-5 ismétlés átlaga \pm SD alakban fejeztük ki (mindegyik kilenc well-en belüli technikai ismétlés átlagaként meghatározva). Az oldószerrel (DMSO) kezelt kontroll csoport átlaga szaggatott vonalként van feltüntetve. * $P < 0,05$, illetve **** $P < 0,0001$, a jelzetteknek megfelelően. FX: fluoxetin.

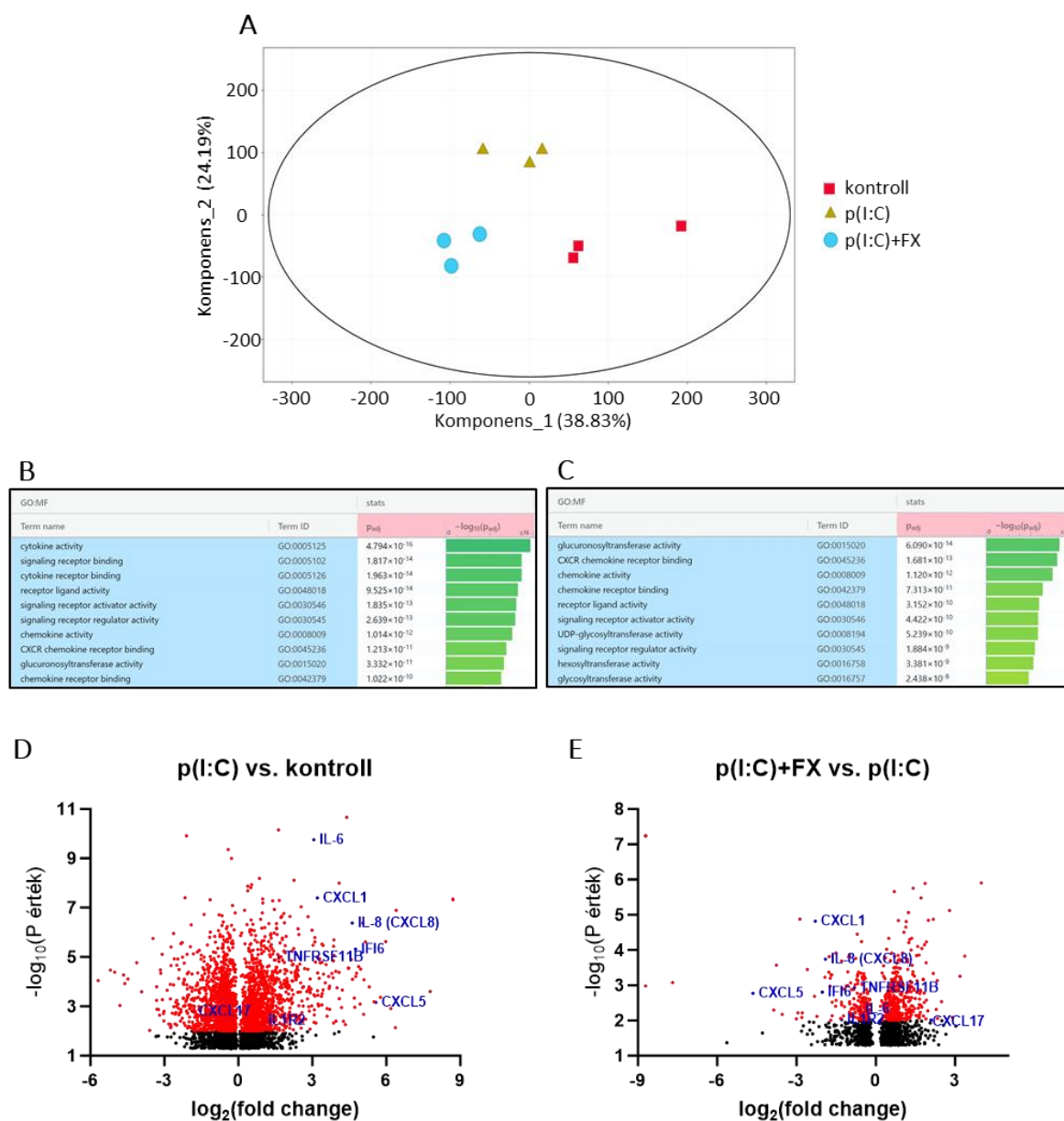
6.2.10 A FX jelentősen módosítja a p(I:C) által kialakított génexpressziós mintázatot

Végül, hogy további információt nyerjünk a FX humán keratinocitákra gyakorolt gyulladáscsökkentő hatásának természetéről, RNS-mintákat gyűjtöttünk 24 órás p(I:C) (20 μ g/ml), p(I:C)+FX (14 μ M) vagy megfelelő oldószerrel történő kezelést követően. A főkomponens-elemzés kimutatta, hogy a FX együttes alkalmazása a p(I:C)-kezelt

kultúrákhoz képest egy különálló klasztert eredményezett, ami arra utal, hogy a FX-nek jelentős hatása lehet a humán keratinociták p(I:C)-indukált transzkripciós válaszára (31/A ábra). Ezekkel az eredményekkel tökéletes összhangban a szignifikánsan up-regulált (>1,5-szeres változás; $P < 0,05$; p(I:C) vs. kontroll) *g:Profiler toolset*²⁰³ által végzett útvonal-elemzés azt mutatta, hogy a várakozásoknak megfelelően a p(I:C)-kezelés a gyulladással kapcsolatos GO:molekuláris funkció kifejezések dúsulásához vezetett (pl. „citokin aktivitás”, „citokin receptor kötődés”, „kemokin aktivitás”, „CXCR kemokin receptor kötődés” vagy „kemokin receptor kötődés”; a tíz legnagyobb szignifikanciát mutató GO:molekuláris funkció kifejezés a 31/B ábrán látható). Fontos, hogy a FX által szignifikánsan (>1,5-szeres változás; $P < 0,05$) down-regulált gének elemzése (p(I:C)+FX vs. p(I:C)) nagyon hasonló eredményeket hozott („CXCR kemokin receptor kötődés”, „kemokin aktivitás” vagy „kemokin receptor kötődés”; 31/C ábra), ami arra utal, hogy a FX valóban képes lehet enyhíteni a p(I:C) gyulladáshatását.

A differenciáltan expresszált gének elemzése* továbbá kimutatta, hogy a FX képes volt megszüntetni számos kulcsfontosságú gyulladáshatást okozó molekulát és potenciális viszketés-mediátort p(I:C)-indukált up-regulációját. A teljesség igénye nélkül, a FX egyidejű alkalmazása csökkentette az IL-6, az IL-8 (CXCL8), a GRO α (más néven CXCL1),²⁰⁴ a CXCL5 (más néven ENA-78),²⁰⁵ az interferon alfa indukálható fehérje 6 (IFI6, más néven G1P3),^{206,207} az oszteoprotegerin (TNFRSF11B),²⁰⁸ továbbá az interleukin-1 receptor 2-es típusának (IL1R2)²⁰⁹ expresszióját, és up-regulálta az egyes eredmények alapján inkább immunszuppresszív hatású CXCL17-et (31/D-E ábra).²¹⁰ Összességében ezek az adatok határozottan amellett szólnak, hogy a FX jelentős gyulladáscsökkentő hatást fejthet ki a humán epidermális keratinocitákon.

* A differenciáltan expresszált gének listája megtalálható a disszertáció alapjául szolgáló közlemény „Supplementary” adatai között; a listák készítéséhez felhasznált nyers adatok pedig szabadon böngészhetők az NCBI SRA adatbázisban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/1022043>).



31. ábra: A FX jelentősen befolyásolja a p(I:C)-indukált gyulladós választ a humán keratinocitákban. RNA-Seq elemzés. A HaCaT keratinocitákat a jelzett módon kezeltük 24 órán keresztül. (A) Főkomponens-elemzést (PCA) végeztünk az összes gén normalizált génexpressziós értékeinek felhasználásával. A PCA-diagram a vizsgált minták egymáshoz való viszonyát mutatja. Az azonos kezelési csoportba tartozó replikátumok nagyfokú hasonlóságot mutatnak egymással, valamint a három különböző kezelési csoport egyértelműen elkülönül. Minden szimbólum egy-egy biológiai ismétlést jelöl. (B-C) A szignifikánsan ($>1,5$ -szeres változás; $P < 0,05$) up-regulált (p(I:C) vs. kontroll) (B) vagy down-regulált (p(I:C)+FX vs. p(I:C)) gének (C) útvonalelemzése a g:Profiler toolset segítségével. Az elemzést a GO:molekuláris funkció útvonalak adatbázisának használatával végeztük, és a tíz legszignifikánsabb GO:molekuláris funkció kifejezést mutatjuk. (D-E) Az összes szignifikáns ($P < 0,05$) változást mutató gén felhasználásával létrehozott diagramok. A piros pontok kiemelik a jelentősebb ($P < 0,01$) változásokat mutató géneket. A legfontosabb gyulladásszabályozók, valamint a viszketést közvetítő gének kék pontokként vannak kiemelve, továbbá a megfelelő pontok mellett nevüket is feltüntettük.

7. Megbeszélés

A TRPV3-at elsőként keratinocitákon azonosították, és a tranziens receptorpotenciálú ioncsatorna szupercsalád hőérzékeny tagjaként írták le. Bár a hőérzékelésben betöltött szerepe jelenleg is vitatott, az epidermiszben jelentős mértékben expresszálódik, és nem szelektív, de dominánsan Ca^{2+} -permeábilis kationcsatornaként funkcionál.^{80,211,212} Érdekes módon annak ellenére, hogy a bőr számos sejttípusában kifejeződik, deléciónja csak mérsékelt, gyakran rassz- vagy nemfüggő, fenotípusos változásokat eredményez, mint például a göndör bajusz és hullámos szőrzet kialakulása, valamint az epidermális barrierfunkciók viszonylag enyhe defektusa.^{103,213} Ezzel szemben a TRPV3 funkcionyeréses mutációi lényegesen látványosabb bőrelváltozásokat eredményeznek, amelyek súlyos bőrszárazsággal, bőrgyulladással, viszketéssel és szőrtelen fenotípussal társulnak egerekben és patkányokban egyaránt.^{94,214} Hasonló funkcionyeréses TRPV3 mutációt fedeztek fel egy ritka humán genodermatózisban, az Olmsted-szindrómában is, amelyet periorificiális (testnyílások körül kialakuló) hiperkeratózis, csökkent szőrnövekedés, kopaszság és súlyos viszketéses tünetek jellemeznek.²¹⁵⁻²¹⁷ Ezen eredményekkel összhangban korábbi vizsgálataink során munkacsoportunk igazolta, hogy a TRPV3 a humán hajnövekedés fontos negatív regulátora,¹⁰⁷ és kimutattuk azt is, hogy a TRPV3 aktivációja gyulladást vált ki humán epidermális keratinocitákon,¹⁰⁹ míg mások a száraz bőrhöz társuló viszketésben betöltött szerepéről számoltak be.²¹⁸ A megfigyelt gyulladást és a lipidbarrier zavara arra utalt, hogy a TRPV3 túlműködés által kiváltott gyulladást bőrbetegségek kialakulásában a keratinocitákon kívül más TRPV3-at expresszáló bőrben található sejtek is részt vehetnek. Ebből kiindulva a disszertáció alapjául szolgáló egyik tanulmányban megvizsgáltuk a TRPV3 expresszióját és szerepét a bőr professzionális lipidtermelő sejtjein, a sebocitákon.¹⁸²

Az immunhisztokémiai festés kimutatta, hogy az epidermális keratinocitákhoz hasonlóan a humán faggyúmirigyekben is expresszálódik a TRPV3 (7. ábra), és a perifériás, differenciálatlan sejtek erősebb immunpozitivitást mutatnak, mint a centrálisan elhelyezkedő terminálisan differenciált sejtek. Kimutattuk azt is, hogy a TRPV3 fehérje és mRNS szinten is jelen van a humán faggyúmirigyből származó SZ95 sebocitákon is (8. ábra). Megfigyeltük továbbá, hogy (immunhisztokémiával nyert eredményeinkkel összhangban) a TRPV3 expressziója csökken a posztkonfluens, differenciáltabb kultúrákban az erősen proliferáló prekonfluens kultúrákhoz képest (8/B-C ábra).

A TRPV3 szerepének funkcionális vizsgálatok megállapítottuk, hogy a szintetikus TRPV3-aktivátor 2-APB, valamint a növényi eredetű karvakrol az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció jelentős emelkedését idézte elő (9/A ábra) humán sebocitákon. A kiváltott Ca^{2+} jelek gyakorlatilag megszűntek az általános TRP-csatorna blokkoló ruténium vörös jelenlétében, de nem befolyásolta őket sem az AMG9810, sem a HC067047, amelyek a sebociták által szintén kifejezett,^{105,114} közeli rokon TRPV1, illetve TRPV4 csatornák szelektív antagonistái (9/B ábra). Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a TRPV3 funkcionálisan aktív formában fejeződik ki a humán sebocitákban, azonban, mivel kereskedelmi forgalomban elérhető valóban specifikus TRPV3 aktivátorok és antagonisták nem álltak rendelkezésünkre, úgy döntöttünk, hogy siRNS-transzfecció segítségével megvizsgáljuk a TRPV3 expresszió csendesítésének hatását a Ca^{2+} jelekre. A sebociták transzfecciója a csatorna expressziójának részleges, de jelentős csökkenését eredményezte (6. ábra) a „scrambled” RNS-transzfecciót (kontroll) sejtekhez képest, valamint jelentősen csökkentette az agonisták által kiváltott Ca^{2+} jelek amplitúdóját és az emelkedés sebességét (10. ábra). Mindezen eredmények meggyőzően igazolták, hogy az alkalmazott aktivátorok valóban aktiválják a TRPV3-at humán sebocitákon.

A következőkben az aktivátorok biológiai hatásait vettük górcső alá. Megállapítottuk, hogy magasabb koncentrációkban (2-APB: 200 μM ; karvakrol: 1000 μM) alkalmazva 24 óra alatt jelentősen csökkentették az élő sejtek számát, de alacsonyabb koncentrációik (2-APB: 150 μM ; karvakrol: 500 μM), amelyek még mindig képesek voltak Ca^{2+} jeleket kiváltani, nem befolyásolták szignifikánsan a szebociták életképességét (11. ábra).

Mivel a faggyúlipidek alapvetően hozzájárulnak az epidermális barrierfunkciók működéséhez, a TRPV3-hoz szerkezetileg nagyon hasonló TRPV1 és TRPV4 esetén pedig munkacsoportunk a korábbiakban azt találta, hogy azok a faggyúlipid-termelés potens negatív regulátorai,^{105,114} a következőkben megvizsgáltuk a TRPV3 lipidszintézisre gyakorolt hatását is. A TRPV3 aktiválása a 2-APB és a karvakrol nem citotoxikus koncentrációival jelentősen csökkentette a lipidszintézist az AA által indukált differenciálódás során a kontrollként használt, „scrambled” RNS-transzfektált sejtek esetén. A TRPV3 agonisták hatása ugyanakkor szignifikánsan csökkent a TRPV3-at célzó siRNS-sel transzfektált sejtekben (12. ábra). Megfigyeltük azt is, hogy az AA kis, de szignifikáns mértékben hatásosabb lipogénnek bizonyult TRPV3-csendesített sejteken, amely arra enged következtetni, hogy a TRPV3 alap aktivitása szintén negatívan befolyásolja az AA által indukált faggyúlipid-szintézist. Fontos megjegyezni, hogy a TRPV3 agonisták hatása nem korlátozódott az AA által indukált lipidszintézisre. Az agonisták szintén gátolták az endokannabinoid anandamid, valamint a linolsav és tesztoszteron kombinációjának lipogén hatását, továbbá kissé csökkentették a nem transzfektált szebociták bazális faggyúlipid-szintézisét is (13. ábra). Mindezek alapján a TRPV3-mediált Ca^{2+} -influx (más intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt növelő beavatkozásokhoz hasonlóan)²¹⁹ liposztatikus hatásának bizonyult humán szebocitákon.

A jelenséget áramlási citometria segítségével tovább vizsgálva érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy a karvakrol nem volt hatással a sejtek (általában differenciációval

korreláló) granuláltságára, sem kontroll körülmények között, sem pedig AA-kezelést követően, viszont szelektíven gátolta a lipidek AA-indukálta felhalmozódását. Ez utóbbi hatás ráadásul ruténium vörössel kivédhetőnek, azaz nagy valószínűséggel TRPV csatorna által mediáltnak bizonyult (14. ábra). Végezetül kimutattuk azt is, hogy a karvakrol képes volt a faggyúlipid-termelés két fontos pozitív regulátorának,^{105,181} a PPAR γ -nak és az NR1H1-nek az expresszióját csökkenteni (15. ábra), így feltételezhető, hogy a hatása (legalább részben) ezen szabályozómolekulák down-regulációjához köthető.

A lipidszintézisen túl a faggyúmirigysejtek jelentős szerepet töltenek be a bőr immunológiai folyamatainak szabályozásában is^{182,220} a TRPV3-ról pedig ismert, hogy hámsejteken jelentősen fokozza a gyulladáshoz köthető citokinek termelését és felszabadulását is.¹⁸⁵ Ebből kiindulva jelen kísérleteink során célul tűztük ki azt is, hogy megvizsgáljuk a TRPV3 aktiváció citokinek expressziójára és felszabadulására kifejtett hatását. Eredményeink egyértelműen azt mutatták, hogy a TRPV3 agonista karvakrol 6 órán belül számos gyulladáshoz köthető citokin transzkripcióját fokozta szignifikánsan, érdekes módon ugyanakkor az említett időintervallumon belül a 2-ABP hatástalannak bizonyult (16. ábra). A karvakrol TRPV3 specificitásának igazolására az említett kísérletet TRPV3-csendesített SZ95 sebocitákon is elvégeztük, és az aktivátor hatásának jelentős (bár nem teljes) csökkenését tapasztaltuk a kontrollként használt „scrambled” RNS-sel transzfektált sejtekhez képest (17. és 18. ábra). Mindezek alapján a TRPV3 aktivációja a hámsejtek esetén tapasztaltakhoz hasonlóan¹⁰⁹ sebocitákon is gyulladáshoz köthető választ válthat ki.

Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a sebociták részt vehetnek a TRPV3 hiperaktivitással összefüggő, bőrszárazsághoz társuló gyulladáshoz köthető bőrbetegségek patogenezisében. Adataink alapján a TRPV3 nemcsak a faggyúlipid-szintézis korábban nem ismert, negatív szabályozója, de kifejezett gyulladáshoz köthető választ is képes kiváltani a sejteken,

így farmakológiai gátlása (elméletileg) jótékony hatású lehet a fenti bőrbetegségek kezelésében.

A disszertáció alapjául szolgáló második cikk középpontjában egy széles körben használt antidepresszáns, a szelektív szerotonin visszavétel gátlók családjába tartozó¹²⁴ FX áll. A FX egy biztonságosan alkalmazható szer,^{162,163} melyről ismert, hogy bizonyos modellekben gyulladáscsökkentő,^{134–137} viszketéscsillapító,^{138,139} sebgyógyulást elősegítő^{221,222} és AD-ellenes¹⁴³ hatást is képes kifejteni. A fentiek fényében nem meglepő, hogy lehetséges új indikációként számos betegség és kórállapot merült fel az utóbbi időben,^{164,221,222} a jelen tanulmány keretein belül pedig a feltételezett jótékony hatásainak további vizsgálatát tűztük ki célul humán epidermális keratinociták felhasználásával.

Megállapítottuk, hogy a FX nem citotoxikus koncentrációja (14 μ M; 19-20. ábra) képes volt jelentősen csökkenteni több gyulladáscsökkentő citokin (IL-1 α , IL-1 β és IL-8/CXCL8) p(I:C) által kiváltott upregulációját, míg az IL-6 esetén a hatás nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket (Q-PCR; 21/A-D ábra). A FX mindezek mellett jelentős mértékben csökkentette az IL-8 p(I:C) által indukált felszabadulását (ELISA; 24 órás kezelések; 23/D ábra), amely a bőr gyulladáscsökkentő folyamatainak kulcsfontosságú szabályozója, és amelyet biomarkerként is használnak a terápiás hatékonyság nyomon követésére AD-ben.²²³

A viszketés számos gyulladáscsökkentő bőrbetegség, köztük az AD egyik vezető tünete,^{184,185,187,188} a „viszketés-vakarózás ciklus”-ról pedig ismert, hogy hozzájárul ezen betegségek patogeneziséhez,^{186,224} ezért következő lépésként vizsgálatunkat a keratinocita eredetű viszketés-mediátor endotelinekre^{190–192} is ki kívántuk terjeszteni. Az endotelin-1-ről ismert, hogy nemcsak az AD-s betegek lézionális epidermiszében mutat emelkedést,¹⁹² hanem plazmaszintje a tünetek súlyosságával is korrelál.¹⁹³ Fontos megjegyezni, hogy az endotelin felszabadulása (egyebek mellett) a TLR3 jelátvitel által regulált folyamat. A TLR3 aktiválásán keresztül a p(I:C) megnövelte a primer humán epidermális keratinocitákból

történő endotelin-1 felszabadulást; a TLR3 expressziója pedig szignifikánsan megnőtt több viszketéssel járó bőrbetegségben (például AD-ben, prurigo nodularisban és pikkelysömörben) a tüneteket mutató terület epidermiszében.³⁶ Mivel a p(I:C)-kezelés a humán epidermális keratinocitákban a TLR3 expresszióját is fokozta, feltételezhető, hogy a TLR3, valamint a patológiás TLR3-szignálok által kiváltott keratinocita-eredetű endotelin-felszabadulás jelentős mértékben hozzájárulhat a viszketés-vakarózás ciklus kialakulásához.³⁶

A fentiek fényében különösen jelentős, hogy eredményeink szerint a FX fent említett hatékony gyulladáscsökkentő koncentrációja (14 μ M) képes volt szinte teljesen kivédeni a p(I:C) által indukált endotelin-felszabadulást HaCaT keratinocitákban, valamint primer humán epidermális keratinocitákban egyaránt (25/A-B ábra). Ezek az adatok összességében arra utalnak, hogy megfelelő topikális formulációkban alkalmazva a FX a jövőben egy hatékony gyulladáscsökkentő és viszketést csillapító szer lehet.

Figyelemre méltó, hogy az endotelin felszabadulásának gátlása számos egyéb betegség és kóros elváltozás esetén is jótékony hatású lehet. A megemelkedett endotelin-1 szérumszint hozzájárulhat a pulmonáris hipertónia,²²⁵ az alkohol okozta májbetegség,²²⁶ a szisztémás szklerózis,²²⁷ az endotél diszfunkció és a szisztémás hipertónia,²²⁸ valamint a terhességi toxémia (preeklampszia) és az ahhoz kapcsolt podocitopátia^{229,230} patogeneziséhez. Hasonlóképpen az endotelin-1 hatásának farmakológiai gátlása előnyös lehet bizonyos daganatok kezelésében,²³¹ valamint a koszorúér-bypass műtétet követő vénás graft elzáródás megelőzésében²³² és szubarachnoidális vérzés által okozott agyi érgörcs megszüntetésében.²³³ Adataink tehát arra utalnak, hogy érdemes lehet szisztematikusan megvizsgálni azt, hogy az endotelin-felszabadulás FX-mediált gátlása általános, sejttípus-független hatást tükröz-e, mert ha ez lenne a helyzet, akkor a FX elméletileg jótékony hatást fejthetne ki a fenti betegségekben.

Itt fontos megjegyezni, hogy a rendelkezésre álló igen kevés bizonyíték szerint a FX koncentrációja a bőrben kevesebb, mint fele (kb. 41%) lehet a plazmakoncentrációnak.²³⁴ Így figyelembe véve a FX szokásos plazmaszintjét (azaz $\sim 0,4\text{-}2\ \mu\text{M}$),^{235,236} nagyon valószínűtlennek tűnik, hogy szisztémásan alkalmazva elég magas koncentrációt érhetünk el a bőrben.²³⁴ Ezzel szemben a $14\ \mu\text{M}$ -os koncentráció könnyen elérhető lenne a megfelelő helyi formulációk alkalmazásával. Az ilyen korlátozott, lokálisan alkalmazott FX valószínűleg nem vezetne releváns szisztémás FX expozícióhoz és ezáltal szisztémás (mellék)hatásokhoz sem.²³⁷

Ezután a fent említett jótékony hatások mechanizmusát kívántuk feltárni. Itt érdemes megemlíteni, hogy a FX vizsgálatunk során használt teszt koncentrációja ($14\ \mu\text{M}$) jóval magasabb, mint az általa gátolt szerotonin transzporter (SLC6A4)²³⁸ esetében mutatott K_i értéke ($3\ \text{nM}$), és – amint arról már szó esett - meghaladja a FX-nel kezelt betegek esetében mért szokásos plazmaszintet ($\sim 0,4\text{-}2\ \mu\text{M}$)^{235,236} is. Mindezek, valamint számos irodalmi adat^{152–157} alapján felmerült, hogy a FX keratinocitákra gyakorolt hatásait nem-klasszikus celluláris célpont(ok) közvetítheti(k).

Miután kizártunk három lehetséges gyulladáscsökkentő mechanizmust (azaz a p(I:C)-indukált NF- κ B és p38 MAPK aktiváció gátlását, valamint a mtROS termelés FX általi csökkentését; 26. ábra), a hatásmechanizmus feltárása érdekében úgy döntöttünk, hogy egy teljesen elfogulatlan megközelítést alkalmazunk. Kollaborációs partnereink a BioMAP[®] Diversity PLUS[®] panel segítségével 12 humán primer sejt-alapú rendszerben vizsgálták meg a FX biológiai aktivitás-profilját (27/A-B ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a FX $14\ \mu\text{M}$ -os koncentrációban történő alkalmazásakor az aktivitási profilja nagymértékben átfedett a PI3K enzim jól ismert gátlójának,¹⁹⁷ a „pictilisib”-ként is ismert GDC0941-nek ($370\ \text{nM}$) az aktivitási profiljával (Pearson-féle korrelációs együttható (r): $0,926$; 27/A ábra). Érdekes módon ezzel szemben a szerotonin nem szerepelt a legjobb találatok között (a Pearson-féle

korrelációs együttható (r) mindössze 0,354 volt a 90 μM -os koncentrációban alkalmazott szerotonin és a 14 μM -ban adagolt FX között), ami arra utalt, hogy a FX 14 μM -os koncentrációban megfigyelt hatásai valószínűleg a „klasszikus” szerotoninerg jelátviteltől függetlenül alakultak ki. Ezt az elgondolást támasztotta alá az a megfigyelés is, hogy bár a FX alacsonyabb (520 és 1600 nM) koncentrációi (amelyek átfedést mutatnak a betegek plazmájában rendszerint mérhető koncentrációkkal)^{235,236} a szerotonin különböző koncentrációihoz közelebb, míg a magasabb koncentrációk (4,7 és 14 μM) egyértelműen azoktól távolabb klasztereződtek, és inkább a PI3K-inhibitor GDC0941-gyel alkottak közös csoportot (27/B ábra). Adataink tehát azt mutatják, hogy a 14 μM -os koncentrációban alkalmazott FX valószínűleg a PI3K jelátvitelbe avatkozik be a PI3K enzimek közvetlen vagy közvetett gátlásával vagy kulcsfontosságú down-stream effektorok közvetlen vagy közvetett gátlásával. Fontos, hogy az aktivitási profil az egyes vizsgált szereknek a rendszerben lévő sejt(ek)re gyakorolt fenotípusos hatásait tárja fel, és nem ad (nem adhat) egyértelmű mechanisztikus információt. Ha egy vizsgált anyag nagyobb hasonlóságot mutat (Pearson korrelációs együttható (r) > 0,7) egy jól jellemzett mechanizmusú szerrel, az azt jelzi, hogy a két szer hatása között jelentős fenotípusos hasonlóság van, azaz nagymértékben átfedő szignálútvonalakat befolyásolnak, de nem szükségszerűen azonos pontokon.

A bőr PI3K jelátvitelének diszregulációja súlyos kórállapotokhoz vezethet, amelyeket egyebek mellett kontrollálatlan hámsejt-proliferáció és gyulladás jellemez.¹⁹⁸ Tekintettel arra, hogy (amint arról fentebb már szó esett) a FX-ről ismert, hogy egyes hatásai a PI3K útvonal aktivitásának modulálása révén alakulnak ki,^{155–157} eredményeink amellet szóltak, hogy a FX 14 μM -os koncentrációban történő alkalmazása esetén a PI3K enzimek közvetlen vagy közvetett gátlásával fejtheti ki jótékony hatását. E hipotézist megvizsgálandó megismételtük kísérleteinket a fent említett PI3K-inhibitor (GDC0941; 370 nM) felhasználásával is. Megállapítottuk, hogy a GDC0941 szinte tökéletesen utánozta a FX

biológiai hatásait, azaz jelentősen csökkentette az IL-1 α , az IL-1 β és az IL-8 p(I:C) által indukált up-regulációját, míg az IL-6 expressziójára (a FX-hez hasonlóan) nem volt szignifikáns hatással (Q-PCR; 3 órás kezelések; 28/A-C ábra). Ezen túlmenően a GDC0941 hatékonyan csökkentette a p(I:C) által indukált IL-8 és endotelin felszabadulást (ELISA; 24 órás kezelések; 28/F-G ábra). Érdekes módon a FX-hez képest egy apró különbséget is megfigyeltünk, nevezetesen, a FX-től eltérően a GDC0941 szignifikánsan csökkentette az IL-6 p(I:C)-indukálta felszabadulását (ELISA; 24 órás kezelések; 28/E ábra), míg ez a hatás a FX esetében nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket (23. ábra).

A fent említett minimális eltérés ellenére eredményeink együttesen amellet szólnak, hogy a FX gátolhatja a PI3K útvonalat a humán keratinocitákban. Bár az elképzelés, hogy (bizonyos koncentrációban) a FX képes befolyásolni a PI3K aktivitását nem példa nélküli az irodalomban,¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ kísérleteink idején nem állt rendelkezésre arra nézve irodalmi adat, hogy ez a PI3K közvetlen, közvetett vagy esetleg kombinált (azaz közvetlen és közvetett) gátlásán keresztül valósul meg.

A kérdés eldöntésére elsőként kollaborációs partnerünk *in silico* molekulamodellezés segítségével megállapította, hogy a FX képes lehet ugyanazt a kötőhelyet elfoglalni a PI3K enzimen, mint a GDC0941 (29/A-B ábra). A következőkben ezen adatok birtokában, sejtmentes aktivitás-vizsgálat segítségével megvizsgáltuk, hogy a FX képes-e a PI3K-aktivitás közvetlen gátlására. Az *in silico* adatainkkal tökéletes összhangban azt találtuk, hogy a FX kellően magas koncentrációja valóban képes volt szignifikánsan gátolni a PI3K aktivitást (30/A ábra); azonban hatása sokkal gyengébbnek mutatkozott a GDC0941-hez képest (30/B ábra).

Adataink tehát amellet szólnak, hogy bár hatását kiegészítheti a közvetlen enzimgátlás, a FX valószínűleg közvetve gátolja a PI3K-hoz kapcsolt gyulladáso jelátviteli útvonalat az epidermális keratinocitákban. Ez egyaránt lehetséges valamelyik felettes

regulátor vagy feedback szabályozó modulálásán keresztül.²³⁹ Ilyen szabályozó lehet például a foszfoinozítid-függő kináz 1 (PDK1)-hez kapcsolt endogén negatív visszacsatolási hurok, amelyről kimutatták, hogy bizonyos sejttípusokban szabályozza a PI3K expresszióját és ez által annak aktivitását.²⁴⁰ Másrészt természetesen a FX a PI3K-kapcsolt gyulladásos jelátvitel down-stream célpontjainak aktivitását is befolyásolhatja. Bármelyik megoldás legyen is helytálló, eredményeink (29. és 30. ábra) alapján a FX alapvázának megfelelő kémiai módosítása a PI3K ATP-kötőhelyén lévő további reziduumokat megcélozva a PI3K-val szembeni jobb hatásereőséget és hatékonyságot mutató új vegyületeket eredményezhet. Ennélfogva jelenlegi eredményeink jövőbeli intelligens gyógyszertervezési vizsgálatok kiindulópontját is jelenthetik,^{241,242} amelyek a PI3K-zal szemben fokozott hatékonysággal rendelkező új FX-származékok kifejlesztéséhez vezethetnek.

Kísérleteink befejező szakaszában a FX által kiváltott biológiai hatások mélyebb megértésére RNA-Seq vizsgálatot végeztünk. A főkomponens-elemzés, az útvonal analízis, valamint a differenciáltan expresszálódó gének egyedi vizsgálata is azt igazolta, hogy a FX jelentős mértékben befolyásolja a p(I:C) gyulladáshatását a humán keratinociták esetén (31. ábra). A teljesség igénye nélkül elmondhatjuk, hogy a FX csökkentette a neutrofil kemoattraktáns kemokin GRO α (más néven CXCL1)²⁰⁴ és CXCL5 (más néven ENA-78)²⁰⁵ p(I:C)-indukált up-regulációját. Ezen a ponton érdemes megjegyezni, hogy a GRO α (CXCL1) egyes adatok alapján viszketésmediátorként is működhet,²⁰⁴ citokin array-vel nyert adataink pedig arra utalnak, hogy a FX nemcsak az expresszióját, hanem a felszabadulását is képes lehet gátolni (22. ábra). Az eddigiek mellett a FX jelentősen csökkentette az IFI6 (G1P3) p(I:C)-indukált up-regulációját is, amelyről megállapították, hogy pikkelysömörös betegek lézionális és nem lézionális bőrében is up-regulálódik.^{206,207} A FX emellett down-regulálta az oszteoprotegerint (TNFRSF11B), amely a RANKL – RANK kapcsolat szabályozásában vesz részt. Mivel az epidermálisan expresszált RANKL-

ról kiderült, hogy a regulatórikus T-sejtek számának növelésén keresztül immunszuppresszív hatást vált ki,²⁰⁸ az oszteoprotegerin (TNFRSF11B) expressziójának csökkentése *in vivo* egy további réteget adhat a FX gyulladáscsökkentő hatásaihoz. Hasonlóképpen, a FX csökkentette az IL-1 α és az IL-1 β receptorának, az IL1R2-nek a p(I:C)-indukált up-regulációját. Mivel az IL1R2 magas szintje feltehetően szerepet játszik az öregedő bőrben a Langerhans-sejtek károsodott migrációjában,²⁰⁹ expressziójának normalizálása segíthet a fiziológiás bőr-immunfelügyelet helyreállításában (30/D-E ábra). Végezetül az is figyelemre méltó, hogy míg a p(I:C) down-regulálta a CXCL17-et, a FX együttes alkalmazása jelentősen csökkentette ezt a hatást (30/D-E ábra). A CXCL17-ről nemrégiben megállapították, hogy a pikkelysömör imiquimod-indukált egérmódeljében a mieloid-eredetű szuppresszor-sejtek és regulatórikus T-sejtek toborzásán keresztül mérsékli a bőrgyulladást.²¹⁰ Azt természetesen céltzott jövőbeli vizsgálatokban kell meghatározni, hogy a FX által indukált CXCL17 up-reguláció a felszabaduló citokinek szintjén is megnyilvánul-e, valamint hogy ez kizárólag a p(I:C)-indukálta gyulladásválaszra korlátozódik vagy egy általánosabb gyulladáscsökkentő hatás része. Akárhogy is, a CXCL17 FX által indukált felszabadulása és up-regulációja hosszabb (>24 óra) időskálán tovább erősítheti a FX *in vivo* gyulladáscsökkentő hatását.

Végezetül érdemes megjegyezni, hogy egyes közelmúltbeli megfigyelések szerint a FX alkalmazása COVID-19-ben szenvedő betegeknél kedvezően befolyásolta a betegség klinikai kimenetelét.^{151,152} Bár korai lenne merész következtetéseket levonni, érdemes megemlíteni, hogy citokin array adataink szerint úgy tűnik, hogy a FX olyan módon alakítja az epidermális keratinociták immunológiai válaszát, amely kívánatos lehet SARS-CoV-2 fertőzésben is (a részleteket lásd az Függelék A1 táblázatban). Tekintettel arra, hogy a PI3K-útvonal farmakológiai gátlását SARS-CoV-2 fertőzésben szintén előnyösnek találták,^{243–245} feltételezhetjük, hogy a FX nemrégiben leírt kedvező hatásai a COVID-19

betegben^{151,152,246} (legalábbis részben) a FX által közvetített (indirekt) PI3K-gátlás következményei lehetnek.

Összességében az adataink egyértelműen bizonyítják, hogy a FX jelentős gyulladáscsökkentő hatást fejthet ki, és az endogén viszketés-mediátorok, például az endotelinek (és talán mások, pl. a GRO α [CXCL1]) felszabadulásának csökkentése révén alkalmazása jótékony viszketéscsillapító hatáshoz is vezethet, amely hatások valószínűleg a gyulladással PI3K útvonal közvetített gátlásán keresztül valósulnak meg. Figyelembe véve a FX jólismert biztonságosságát, adataink alapján érdemes lenne célzott klinikai vizsgálatokban tisztázni, hogy a fentebb ismertetett kedvező hatások megfelelő lokális, kellően magas bőrkoncentrációt biztosító formulációkban történő alkalmazás során, *in vivo* is érvényesülnek-e gyulladással és viszketéssel kísért bőrbetegségekben.

8. A disszertáció új eredményei és azok klinikai relevanciája

1. A TRPV3 az epidermisz mellett a humán faggyúmirigyekben is funkcionális formában expresszálódik, ahol aktivációja csökkenti a lipidszintézist és fokozza egyes citokinek expresszióját, felszabadulását.
2. A bemutatott eredmények alapján a TRPV3 a faggyúlipid-termelés egy potens, negatív regulátora, fokozott aktivitása szerepet játszhat a bőrszárazsággal járó gyulladásos bőrbetegségek kialakulásában, ami felveti annak lehetőségét, hogy a TRPV3 gátlása új terápiás stratégia lehet az említett bőrgyógyászati kórképek jövőbeli kezelésében.
3. A 14 μ M-ban alkalmazott FX gyulladáscsökkentő hatást fejt ki a humán epidermális keratinocitákon, továbbá képes csökkenteni a viszketést közvetítő endotelinek p(I:C) által indukált felszabadulását.
4. A FX nagy valószínűséggel nem a klasszikus szerotoninerg jelpálya befolyásolásával, hanem a PI3K-út vonal gátlása révén alakítja ki gyulladáscsökkentő hatását.
5. Mindezek alapján a FX – topikálisan alkalmazva - egy ígéretes szer lehet a viszketéssel és gyulladással járó bőrbetegségek kezelésében.

9. Összegzés

Eredményeink szerint a TRPV3 funkcionálisan aktív formában fejeződik ki a humán szebocitákon, ahol aktivációja gátolja a sejtek különféle lipogén ágensekkel kiváltott faggyúlipid-termelését és differenciációját, valamint jelentősen fokozza több gyulladásoos citokin termelését és felszabadulását. Eredményeink alapján a TRPV3 kóros aktivitása szerepet játszhat a különféle bőrszárazsággal járó bőrgyulladások patogenezisében, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a TRPV3 antagonisták hatékony terápiaes eszközök lehetnek ezen betegségek kezelésében.

FX-nel végzett kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy ez a molekula jelentős gyulladáscsökkentő hatást fejthet ki humán epidermális keratinocitákon, és hatékonyan csökkenti az endogén viszketés-mediátor endotelinek felszabadulását is. A FX biológiaiaktivitás-profiljának vizsgálata, RNA-Seq analízis, *in silico* kötődésvizsgálat, valamint direkt enzimaktivitás méréseink tanúsága szerint a hatás valószínűleg a gyulladásoos PI3K útvonal közvetett gátlásán keresztül alakul ki. Figyelembe véve a FX jólismert biztonságossági profilját, eredményeink alapján felmerül a FX bőrgyógyászati repozícionálásának lehetősége, de természetesen további klinikai vizsgálatokra van szükség annak feltárására, hogy a jelen tanulmányban bemutatott kedvező hatások *in vivo* is érvényesülnek-e megfelelő topikális formulációkban történő alkalmazás esetén gyulladással és viszketéssel kísért bőrgyógyászati kórképekben.

10. Summary

Our results indicate that TRPV3 is expressed in a functionally active form on human sebocytes, where its activation inhibits differentiation of sebocytes as well as their sebaceous lipogenesis induced by various lipogenic agents. Moreover, it significantly enhances the production and release of several inflammatory cytokines. Our results suggest that the abnormal activity of TRPV3 may play a role in the pathogenesis of skin dryness-associated cutaneous inflammatory processes.

Our experimental data obtained by using FX demonstrate that this molecule can exert a significant anti-inflammatory effect on human epidermal keratinocytes, and can effectively reduce the release of the endogenous itch-mediator endothelins. Investigation of the biological activity profile, RNA-Seq analysis, *in silico* binding, as well as direct enzyme activity measurements reveal that the effect is likely to be mediated through indirect inhibition of the pro-inflammatory PI3K pathway. Considering the well-known safety profile of FX, our results appear to justify the idea of dermatological repositioning of FX. However, further clinical studies are necessary to investigate whether the beneficial effects demonstrated in our study also develop *in vivo* in case of inflammatory and pruritic dermatoses following application of FX in appropriate topical formulations.

11. Függelék

Függelék A1 táblázat: Azon molekulák listája, amelyek releváns ($\geq 1,5$ -szeres) változásokat mutattak a citokin array során a 20 $\mu\text{g/ml}$ p(I:C)-vel történő 3 órás kezelést követően.

Rövidítés	Teljes angol név	„Fold-change” a kontrollhoz képest p(I:C)-kezelést követően	„Fold-change” a kontrollhoz képest p(I:C)+FX-kezelés hatására	Megjegyzések (hacsak másképp nem jelöljük, az információ forrása: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene ; hozzáférés: 2022. január 27.)
IL-8/ CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	10,74165865	8,878189582	Kemotaktikus faktorként működik, a neutrofileket a fertőzés helyére irányítja. A bakteriális és vírusos termékek gyorsan indukálják az IL-8/CXCL8 expresszióját. Az IL-8/CXCL8 más citokinekkel együtt részt vesz a gyulladást jelölt kaszkádban, és szerepet játszik a szisztémás gyulladást válasz szindrómában (SIRS). Magasabb szintje rosszabb prognózissal korrelál COVID-19 esetén. ²⁴⁷
GRO α	C-X-C motif chemokine ligand 1	5,341499561	4,202264249	Neutrofil kemoattraktáns. E fehérje aberráns expressziója összefüggésbe hozható bizonyos daganatok növekedésével és progressziójával. Szintje súlyos/kritikus COVID-19 betegekénél emelkedik. ²⁴⁸
GM-CSF/ CSF2	Colony stimulating factor 2	4,885446879	2,849885683	A granulociták és makrofágok differenciálódását és működését szabályozó citokin. Emelkedett GM-CSF-szintet mutattak ki SARS-CoV-2 fertőzött betegekénél, akiknél akut légzési distressz szindróma alakul ki.
IL-6	Interleukin 6	3,505016084	2,325846593	Gyulladásban szerepet játszó és a B-sejtek érését segítő citokin. COVID-19-ben megemelkedett IL-6 szintet találtak.
RANTES/ CCL5	C-C motif chemokine ligand 5	2,457841369	1,297757141	Kemoattraktáns a vér monocitái, a memória T-helper sejtek és az eozinofil sejtek számára. A magas SARS-CoV-2 vírusterhelés és az alacsony CCL5-expressziós szintek az intenzív osztályra való felvételhez vagy a halálhoz társultak. ²⁴⁹
IL-22	Interleukin 22	2,158444906	2,052078213	Az IL-10 citokin család tagja. Az IL-22 döntő szerepet játszik COVID-19-ben a gazdaszervezet immunitásának szabályozásában.
IL-19	Interleukin 19	2,12245083	1,703904209	Az IL-10 citokin család tagja. Fokozza a SARS-CoV-2 belépési receptor ACE2 expresszióját a légúti epitéliumban. ²⁵⁰
VEGF	Vascular endothelial growth factor A	1,919266193	1,44037364	Ez a növekedési faktor indukálja az érrendszeri endotélsejtek proliferációját és migrációját, és alapvető fontosságú mind a fiziológiás, mind a patológiás angiogenezisben. A SARS-CoV-2 fertőzés során a VEGF szintje megemelkedik, így elősegíti a gyulladást azáltal, hogy hozzájárul a gyulladást sejtek toborzásához, és növeli az angiopoietin II szintjét, amely a SARS-CoV-2 belépési pontjaként szolgáló ACE2 enzim két terméke közül az egyik. Az angiopoietin II viszont elősegíti a VEGF emelkedését, kialakítva ezzel a gyulladást citokinek felszabadulásának önmagát erősítő ördögi körét.
RAGE	Advanced glycosylation end-product specific receptor	1,788664054	1,51229135	A RAGE jelátvitel gátlása elősegíti a túlélést és korlátozza a betegség patogenezisét a SARS-CoV-2 fertőzést követően egerekben. ²⁵¹
TGF- α	Transforming growth factor alpha	1,752131272	1,613493182	Növekedési faktor, amely az epidermális növekedési faktor receptor ligandja. Aktiválja a sejtproliferáció, differenciálódás és fejlődés jelátviteli útját.
Serpin E1	Serpin family E member 1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1)	1,716273213	1,508567524	A szerinproteináz-inhibitor (szerpin) szupercsalád tagja. A hajnövekedést elősegítő adipokin. ^{252,253} A plazminogén-aktivátor-inhibitor-1 szintje emelkedett a súlyos COVID-19-ben szenvedő betegekénél; a COVID-19-ben fellépő hiperkoagulabilitás oka lehet a plazmin magas plazminogén-aktivátor-inhibitor-1 szintjén keresztüli gátlásból eredő csökkent fibrinolízis. ²⁵⁴
	Myeloperoxidase	1,598750074	1,338496749	Ez az enzim a neutrofilek mikrobicid aktivitásában központi szerepet játszó hipohalogenessavakat termeli.

	Resistin	1,589266474	1,365840924	A rezistin antimikrobiális szerepet játszik a bőrben, antibakteriális hatást mutat mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumokkal szemben. Magasabb szintje rosszabb prognózissal korrelál a COVID-19 esetében. ²⁴⁷
IL-1ra	Interleukin 1 receptor antagonist	0,614673757	0,994571594	Gátolja az IL-1 α és az IL-1 β aktivitását, és modulálja az IL-1-hez kapcsolódó számos immun- és gyulladási választ, különösen a fertőzés és a gyulladás akut fázisában. Magasabb szintje rosszabb prognózissal korrelál a COVID-19-ben. ²⁴⁷
MIP-3 α	C-C motif chemokine ligand 20	0,458883529	1,387978784	Kemotaktikus faktor a limfociták számára, és képes csökkenteni a mieloid progenitorok proliferációját. A súlyos COVID-19 tüdőgyulladásban szenvedő betegeknél a CCL20 plazmaszintje szignifikánsan emelkedett. ²⁵⁵
	Relaxin 2	0,458724987	1,052353792	Szisztémás szklerózisban antifibrotikus hatást fejt ki. ²⁵⁶ A SARS-CoV-2 megzavarhatja a relaxin jelátvitelt. ²⁵⁷
IL-34	interleukin 34	0,440558007	0,818161215	A kolóniastimuláló faktor-1 receptoron keresztül elősegíti a monociták és makrofágok differenciálódását és életképességét. Az IL-34 szintje alacsonyabbnak bizonyult a SARS-CoV-2 fertőzött perifériás vér mononukleáris sejteket tartalmazó humán rekonstruált organotipikus légúti epitéliumban, mint a nem fertőzött kontrollban. ²⁵⁸

* A potenciálisan SARS-CoV-2 szempontjából releváns adatok zöld (a FX által kifejtett potenciálisan kívánatos hatások) vagy sárga (a FX által kifejtett potenciálisan káros hatások) háttérrel vannak kiemelve.

Függelék A2 táblázat. A BioMAP® Diversity PLUS® panelhez használt modellrendszerek áttekintése.

Rendszer	Primer humán sejttípus(ok)	Stimuláció	Potenciálisan releváns betegség	Kísérletes végpontok
3C	Venuláris endotélsejtek	IL-1 β , TNF α , IFN γ	Krónikus gyulladás Szív- és érrendszeri megbetegedés	MCP-1, VCAM-1, TM, TF, ICAM-1, E-szelektin, uPAR, IL-8/CXCL8, MIG, HLA-DR, proliferáció, SRB
4H	Venuláris endotélsejtek	IL-4 és hisztamin	Asztma, allergia, Autoimmunitás	MCP-1, eotaxin-3, VCAM-1, P-szelektin, uPAR, SRB, VEGFR2
LPS	Venuláris endotélsejtek és perifériás vérből származó monomorfonukleáris sejtek	TLR4 ligand	Krónikus gyulladás Szív- és érrendszeri megbetegedés	MCP-1, VCAM-1, TM, TF, CD40, E-szelektin, CD69, IL-8/CXCL8, IL-1 α , M-CSF, sPGE ₂ , SRB, sTNF α
SAg	Venuláris endotélsejtek és perifériás vérből származó monomorfonukleáris sejtek	TCR ligandok (1 \times)	Krónikus gyulladás Szív- és érrendszeri megbetegedés	MCP-1, CD38, CD40, E-szelektin, CD69, IL-8/CXCL8, MIG, PBMC citotoxicitás, proliferáció, SRB
BT	B sejtek és perifériás vérből származó monomorfonukleáris sejtek	α -IgM és TCR ligandok (0.001 \times)	Asztma, allergia, Onkológia, autoimmunitás	B-sejt proliferáció, PBMC citotoxicitás, szekretált IgG, sIL-17A, sIL-17F, sIL-2, sIL-6, sTNF α
BF4T	Bronchiális epitélsejtek, dermális fibroblasztok	TNF α and IL-4	Asztma, allergia, fibrózis, Tüdőgyulladás	MCP-1, eotaxin-3, VCAM-1, ICAM-1, CD90, IL-8/CXCL8, IL-1 α , keratin 8/18, MMP-1, MMP-3, MMP-9, PAI-1, SRB, tPA, uPA
BE3C	Bronchiális epitélsejtek	IL-1 β , TNF α , IFN γ	Tüdőgyulladás COPD	ICAM-1, uPAR, IP-10, I-TAC, IL-8/CXCL8, MIG, EGFR, HLA-DR, IL-1 α , keratin 8/18, MMP-1, MMP-9, PAI-1, SRB, tPA, uPA
CASM3C	Koszorúér (artéria) simaizom sejtek	IL-1 β , TNF α , IFN γ	Szív-és érrendszeri gyulladás Resztenózis	MCP-1, VCAM-1, TM, TF, uPAR, IL-8/CXCL8, MIG, HLA-DR, IL-6, LDLR, M-CSF, PAI-1, proliferáció, SAA, SRB
HDF3CGF	Dermális fibroblasztok	IL-1 β , TNF α , IFN γ , EGF, bFGF, PDGF-BB	Fibrózis Krónikus gyulladás	MCP-1, VCAM-1, ICAM-1, kollagén I, kollagén III, IP-10, I-TAC, IL-8/CXCL8, MIG, EGFR, M-CSF, MMP-1, PAI-1, proliferáció_72hr, SRB, TIMP-1, TIMP-2
KF3CT	Keratinociták, dermális fibroblasztok	IL-1 β , TNF α , IFN γ , TGF β	Pikkelysömör, bőrgyulladások	MCP-1, ICAM-1, IP-10, IL-8/CXCL8, MIG, IL-1 α , MMP-9, PAI-1, SRB, TIMP-2, uPA
MyoF	Tüdő fibroblasztok	TNF α , TGF β	Fibrózis, krónikus gyulladás, Sebgyógyulás, extracelluláris mátrix remodelling	α SM aktin, bFGF, VCAM-1, kollagén I, kollagén III, kollagén IV, IL-8/CXCL8, decorin, MMP-1, PAI-1, TIMP-1, SRB
IMphg	Venuláris endotélsejtek makrofágok	TLR2 ligand	Szív- és érrendszeri gyulladás Resztenózis, krónikus gyulladás	MCP-1, MIP-1 α , VCAM-1, CD40, E-szelektin, CD69, IL-8/CXCL8, IL-1 α , M-CSF, sIL-10, SRB, SRB-Mphg

12. Irodalomjegyzék

- 1 Cho YS, Seo CH, Joo SY, *et al.* The Association Between Postburn Vitamin D Deficiency and the Biomechanical Properties of Hypertrophic Scars. *J Burn Care Res* 2019; **40**:274–80.
- 2 Romanovsky AA. Skin temperature: its role in thermoregulation. *Acta Physiol Oxf Engl* 2014; **210**:498–507.
- 3 Richardson M. Understanding the structure and function of the skin. *Nurs Times* 2003; **99**:46–8.
- 4 Kárpáti S, Kemény L, Remenyik É. Bőrgyógyászat és venerológia, 1. Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt., 2013.
- 5 Jensen JM, Proksch E. The skin's barrier. *G Ital Dermatol E Venereol Organo Uff Soc Ital Dermatol E Sifilogr* 2009; **144**:689–700.
- 6 Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008; **17**:1063–72.
- 7 Brettmann EA, de Guzman Strong C. Recent evolution of the human skin barrier. *Exp Dermatol* 2018; **27**:859–66.
- 8 Ishida-Yamamoto A, Igawa S, Kishibe M. Molecular basis of the skin barrier structures revealed by electron microscopy. *Exp Dermatol* 2018; **27**:841–6.
- 9 Kabashima K, Honda T, Ginhoux F, Egawa G. The immunological anatomy of the skin. *Nat Rev Immunol* 2019; **19**:19–30.
- 10 Denda M. Epidermis as the “Third Brain”? *Dermatol Sin* 2015; **33**:70–3.
- 11 Denda M, Nakanishi S. Do epidermal keratinocytes have sensory and information processing systems? *Exp Dermatol* 2022; **31**:459–74.
- 12 Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008; **358**:1483–94.
- 13 Griffiths CEM, van de Kerkhof P, Czarnecka-Operacz M. Psoriasis and Atopic Dermatitis. *Dermatol Ther* 2017; **7**:31–41.
- 14 Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. Atopic dermatitis. *Lancet Lond Engl* 2020; **396**:345–60.
- 15 Bocheva GS, Slominski RM, Slominski AT. Immunological Aspects of Skin Aging in Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci* 2021; **22**:5729.
- 16 Nedoszytko B, Reszka E, Gutowska-Owsiak D, *et al.* Genetic and Epigenetic Aspects of Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci* 2020; **21**:6484.
- 17 Pappas A. Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol* 2009; **1**:72–6.

- 18 Shi VY, Leo M, Hassoun L, *et al.* Role of sebaceous glands in inflammatory dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 2015; **73**:856–63.
- 19 Surber, Christian (Basel/Zurich), Abels, Christoph (Bielefeld), Maibach, Howard (San Francisco, CA). pH of the Skin: Issues and Challenges, 1st Edition. , Karger Book, 2018.
- 20 Paller AS, Kong HH, Seed P, *et al.* The microbiome in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2019; **143**:26–35.
- 21 Nakamura N, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, *et al.* Toll-Like Receptor 3 Increases Allergic and Irritant Contact Dermatitis. *J Invest Dermatol* 2015; **135**:411–7.
- 22 Yasuike R, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, *et al.* The role of toll-like receptor 3 in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation. *J Dermatol Sci* 2017; **88**:184–91.
- 23 Wei J, Jiang H, Gao H, Wang G. Activation of toll like receptor-3 induces corneal epithelial barrier dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; **461**:555–9.
- 24 Nakamura N, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, *et al.* Stratum corneum Toll-like receptor 3 expressions correlate with the severity of atopic dermatitis lesions. *J Dermatol Sci* 2019; **94**:354–7.
- 25 Lebre MC, van der Aar AMG, van Baarsen L, *et al.* Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* 2007; **127**:331–41.
- 26 Begon E, Michel L, Flageul B, *et al.* Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Eur J Dermatol EJD* 2007; **17**:497–506.
- 27 Selleri S, Arnaboldi F, Palazzo M, *et al.* Toll-like receptor agonists regulate beta-defensin 2 release in hair follicle. *Br J Dermatol* 2007; **156**:1172–7.
- 28 Müller-Anstett MA, Müller P, Albrecht T, *et al.* Staphylococcal peptidoglycan co-localizes with Nod2 and TLR2 and activates innate immune response via both receptors in primary murine keratinocytes. *PLoS One* 2010; **5**:e13153.
- 29 Sugita K, Kabashima K, Atarashi K, *et al.* Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol* 2007; **147**:176–83.
- 30 Miller LS, Modlin RL. Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses. *J Invest Dermatol* 2007; **127**:262–3.
- 31 Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, *et al.* Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002; **3**:673–80.
- 32 Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997; **387**:861.

- 33 Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007; **449**:564–9.
- 34 de Jongh GJ, Zeeuwen PLJM, Kucharekova M, *et al.* High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2005; **125**:1163–73.
- 35 Ong PY, Ohtake T, Brandt C, *et al.* Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002; **347**:1151–60.
- 36 Szöllösi AG, McDonald I, Szabó IL, *et al.* TLR3 in Chronic Human Itch: A Keratinocyte-Associated Mechanism of Peripheral Itch Sensitization. *J Invest Dermatol* 2019; **139**:2393-2396.e6.
- 37 Nafisi S, Maibach HI. Chapter 3 - Skin penetration of nanoparticles. In: *Emerging Nanotechnologies in Immunology* (Shegokar R, Souto EB, eds). Boston, Elsevier, 2018; 47–88.
- 38 Montagna W, Ellis RA, Silver AF. Comparative aspects of sebaceous glands , Montagna W, Ellis R A, Silver A Feds. *Advances in Biology of Skin. Vol IV. The Sebaceous Glands.* Oxford: Pergamon Press, 1963: 32–45. *Adv Biol* 1963; **Vol IV.**:32-45.
- 39 Picardo M, Ottaviani M, Camera E, Mastrofrancesco A. Sebaceous gland lipids. *Dermatoendocrinol* 2009; **1**:68–71.
- 40 Zouboulis CC. Acne and sebaceous gland function. *Clin Dermatol* 2004; **22**:360–6.
- 41 Young P Barbara, Lowe JS, Stevens Mrcp Alan, *et al.* *Wheater’s functional histology : a text and colour atlas, 4th Edition.* , Edinburgh : Churchill Livingstone, 2000.
- 42 Smith KR, Thiboutot DM. Thematic review series: skin lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe? *J Lipid Res* 2008; **49**:271–81.
- 43 Thiboutot D. Regulation of human sebaceous glands. *J Invest Dermatol* 2004; **123**:1–12.
- 44 Thody AJ, Shuster S. Control and function of sebaceous glands. *Physiol Rev* 1989; **69**:383–416.
- 45 Maibach HI, Boisits EK, eds. *Neonatal skin: structure and function, 2nd ed., rev.expanded.* New York, M. Dekker, 2003.
- 46 Nikkari T. Comparative chemistry of sebum. *J Invest Dermatol* 1974; **62**:257–67.
- 47 Pham D-M, Boussouira B, Moyal D, Nguyen QL. Oxidization of squalene, a human skin lipid: a new and reliable marker of environmental pollution studies. *Int J Cosmet Sci* 2015; **37**:357–65.
- 48 Zouboulis CC, Picardo M, Ju Q, *et al.* Beyond acne: Current aspects of sebaceous gland biology and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2016; **17**:319–34.

- 49 Fritsch M, Orfanos CE, Zouboulis CC. Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin. *J Invest Dermatol* 2001; **116**:793–800.
- 50 Moradi Tuchayi S, Makrantonaki E, Ganceviciene R, *et al.* Acne vulgaris. *Nat Rev Dis Primer* 2015; **1**:15029.
- 51 Taylor M, Gonzalez M, Porter R. Pathways to inflammation: acne pathophysiology. *Eur J Dermatol EJD* 2011; **21**:323–33.
- 52 Dreno B, Gollnick H p. m., Kang S, *et al.* Understanding innate immunity and inflammation in acne: implications for management. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; **29**:3–11.
- 53 Guy R, Green MR, Kealey T. Modeling acne in vitro. *J Invest Dermatol* 1996; **106**:176–82.
- 54 Ingham E, Eady EA, Goodwin CE, *et al.* Pro-inflammatory levels of interleukin-1 alpha-like bioactivity are present in the majority of open comedones in acne vulgaris. *J Invest Dermatol* 1992; **98**:895–901.
- 55 Eady EA, Goodwin CE, Cove JH, *et al.* Inflammatory levels of interleukin 1 alpha are present in the majority of open comedones in acne vulgaris. *Arch Dermatol* 1991; **127**:1238–9.
- 56 Ghosh S, Chaudhuri S, Jain VK, Aggarwal K. Profiling and hormonal therapy for acne in women. *Indian J Dermatol* 2014; **59**:107–15.
- 57 Zaenglein AL, Pathy AL, Schlosser BJ, *et al.* Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2016; **74**:945-973.e33.
- 58 Thielitz A, Abdel-Naser MB, Fluhr JW, *et al.* Topical retinoids in acne--an evidence-based overview. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG* 2008; **6**:1023–31.
- 59 Thiboutot D, Gollnick H, Bettoli V, *et al.* New insights into the management of acne: an update from the Global Alliance to Improve Outcomes in Acne group. *J Am Acad Dermatol* 2009; **60**:S1-50.
- 60 Strauss JS, Krowchuk DP, Leyden JJ, *et al.* Guidelines of care for acne vulgaris management. *J Am Acad Dermatol* 2007; **56**:651–63.
- 61 James WD. Clinical practice. Acne. *N Engl J Med* 2005; **352**:1463–72.
- 62 Mickle AD, Shepherd AJ, Mohapatra DP. Chapter Four - Sensory TRP Channels: The Key Transducers of Nociception and Pain. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Price TJ, Dussor G, eds). , Academic Press, 2015; 73–118.
- 63 Tsagareli MG, Nozadze I. An overview on transient receptor potential channels superfamily. *Behav Pharmacol* 2020; **31**:413–34.
- 64 Cosens DJ, Manning A. Abnormal Electroretinogram from a Drosophila Mutant. *Nature* 1969; **224**:285–7.

- 65 Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 1989; **2**:1313–23.
- 66 Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ* 2005; **2005**:re3.
- 67 An overview on transient receptor potential channels superfa...: Behavioural Pharmacology [WWW Document]. URL https://journals.lww.com/behaviouralpharm/Abstract/2020/08000/An_overview_on_transient_receptor_potential.1.aspx [accessed on 5 February 2022].
- 68 Venkatachalam K, Montell C. TRP Channels. *Annu Rev Biochem* 2007; **76**:387–417.
- 69 Seebohm G, Schreiber JA. Beyond Hot and Spicy: TRPV Channels and their Pharmacological Modulation. *Cell Physiol Biochem* 2021; **55**:108–30.
- 70 Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; **389**:816–24.
- 71 Barkin RL. The pharmacology of topical analgesics. *Postgrad Med* 2013; **125**:7–18.
- 72 Xu H, Blair NT, Clapham DE. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2005; **25**:8924–37.
- 73 McNamara FN, Randall A, Gunthorpe MJ. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *Br J Pharmacol* 2005; **144**:781–90.
- 74 Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, *et al.* The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol CB* 2005; **15**:929–34.
- 75 Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, *et al.* Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999; **400**:452–7.
- 76 Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, *et al.* A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 1999; **398**:436–41.
- 77 Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, *et al.* More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci* 2006; **32**:335–43.
- 78 Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci* 2006; **9**:628–35.
- 79 Hu H-Z, Xiao R, Wang C, *et al.* Potentiation of TRPV3 channel function by unsaturated fatty acids. *J Cell Physiol* 2006; **208**:201–12.
- 80 Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, *et al.* A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 2002; **296**:2046–9.

- 81 Watanabe H, Vriens J, Suh SH, *et al.* Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; **277**:47044–51.
- 82 Chung M-K, Lee H, Mizuno A, *et al.* TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J Biol Chem* 2004; **279**:21569–75.
- 83 Alessandri-Haber N, Yeh JJ, Boyd AE, *et al.* Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* 2003; **39**:497–511.
- 84 Caterina MJ, Pang Z. TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. *Pharmaceuticals* 2016; **9**. doi:10.3390/ph9040077.
- 85 Koivisto A, Chapman H, Jalava N, *et al.* TRPA1: A Transducer and Amplifier of Pain and Inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2014; **114**:50–5.
- 86 Gunthorpe MJ, Chizh BA. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. *Drug Discov Today* 2009; **14**:56–67.
- 87 Kwan KY, Glazer JM, Corey DP, *et al.* TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2009; **29**:4808–19.
- 88 Yamamoto-Kasai E, Imura K, Yasui K, *et al.* TRPV3 as a therapeutic target for itch. *J Invest Dermatol* 2012; **132**:2109–12.
- 89 Kim S, Barry DM, Liu X-Y, *et al.* Facilitation of TRPV4 by TRPV1 is required for itch transmission in some sensory neuron populations. *Sci Signal* 2016; **9**:ra71.
- 90 Imura K, Yoshioka T, Hirasawa T, Sakata T. Role of TRPV3 in immune response to development of dermatitis. *J Inflamm Lond Engl* 2009; **6**:17.
- 91 Bánvölgyi A, Pálinkás L, Berki T, *et al.* Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model. *J Neuroimmunol* 2005; **169**:86–96.
- 92 Yun J-W, Seo JA, Jeong YS, *et al.* TRPV1 antagonist can suppress the atopic dermatitis-like symptoms by accelerating skin barrier recovery. *J Dermatol Sci* 2011; **62**:8–15.
- 93 Mansuri MS, Singh M, Begum R. miRNA signatures and transcriptional regulation of their target genes in vitiligo. *J Dermatol Sci* 2016; **84**:50–8.
- 94 Asakawa M, Yoshioka T, Matsutani T, *et al.* Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents. *J Invest Dermatol* 2006; **126**:2664–72.
- 95 Bíró T, Bodó E, Telek A, *et al.* Hair cycle control by vanilloid receptor-1 (TRPV1): evidence from TRPV1 knockout mice. *J Invest Dermatol* 2006; **126**:1909–12.
- 96 Bodó E, Bíró T, Telek A, *et al.* A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am J Pathol* 2005; **166**:985–98.

- 97 Aijima R, Wang B, Takao T, *et al.* The thermosensitive TRPV3 channel contributes to rapid wound healing in oral epithelia. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2015; **29**:182–92.
- 98 Li S, Bode AM, Zhu F, *et al.* TRPV1-antagonist AMG9810 promotes mouse skin tumorigenesis through EGFR/Akt signaling. *Carcinogenesis* 2011; **32**:779–85.
- 99 Hwang MK, Bode AM, Byun S, *et al.* Cocarcinogenic effect of capsaicin involves activation of EGFR signaling but not TRPV1. *Cancer Res* 2010; **70**:6859–69.
- 100 Fusi C, Materazzi S, Minocci D, *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is downregulated in keratinocytes in human non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol* 2014; **134**:2408–17.
- 101 Akazawa Y, Yuki T, Yoshida H, *et al.* Activation of TRPV4 strengthens the tight-junction barrier in human epidermal keratinocytes. *Skin Pharmacol Physiol* 2013; **26**:15–21.
- 102 Denda M, Tsutsumi M, Goto M, *et al.* Topical application of TRPA1 agonists and brief cold exposure accelerate skin permeability barrier recovery. *J Invest Dermatol* 2010; **130**:1942–5.
- 103 Cheng X, Jin J, Hu L, *et al.* TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation. *Cell* 2010; **141**:331–43.
- 104 Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2011; **10**:601–20.
- 105 Oláh A, Tóth BI, Borbíró I, *et al.* Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. *J Clin Invest* 2014; **124**:3713–24.
- 106 Szabó IL, Herczeg-Lisztes E, Szegedi A, *et al.* TRPV4 Is Expressed in Human Hair Follicles and Inhibits Hair Growth In Vitro. *J Invest Dermatol* 2019; **139**:1385–8.
- 107 Borbíró I, Lisztes E, Tóth BI, *et al.* Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth. *J Invest Dermatol* 2011; **131**:1605–14.
- 108 Duchatelet S, Hovnanian A. Olmsted syndrome: clinical, molecular and therapeutic aspects. *Orphanet J Rare Dis* 2015; **10**:33.
- 109 Szöllősi AG, Vasas N, Angyal Á, *et al.* Activation of TRPV3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2018; **138**:365–74.
- 110 Larkin C, Chen W, Szabó IL, *et al.* Novel insights into the TRPV3-mediated itch in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2021; **147**:1110-1114.e5.
- 111 Wang Y, Tan L, Jiao K, *et al.* Scutellarein attenuates atopic dermatitis by selectively inhibiting transient receptor potential vanilloid 3 channels. *Br J Pharmacol* 2022; **179**:4792–808.

- 112 Seo SH, Kim S, Kim S-E, *et al.* Enhanced Thermal Sensitivity of TRPV3 in Keratinocytes Underlies Heat-Induced Pruritogen Release and Pruritus in Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 2020; **140**:2199-2209.e6.
- 113 Vasas N, Péntzes Z, Kistamás K, *et al.* Transient receptor potential vanilloid 3 expression is increased in non-lesional skin of atopic dermatitis patients. *Exp Dermatol* 2022; **31**:807–13.
- 114 Tóth BI, Géczy T, Griger Z, *et al.* Transient receptor potential vanilloid-1 signaling as a regulator of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol* 2009; **129**:329–39.
- 115 Moncrieff J, Cooper RE, Stockmann T, *et al.* The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence. *Mol Psychiatry* 2022. doi:10.1038/s41380-022-01661-0.
- 116 Preskorn SH, Stanga CY, Feighner JP, Ross R, eds. Antidepressants: Past, Present and Future. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2004 doi:10.1007/978-3-642-18500-7.
- 117 Jin Z-L, Chen X-F, Ran Y-H, *et al.* Mouse strain differences in SSRI sensitivity correlate with serotonin transporter binding and function. *Sci Rep* 2017; **7**:8631.
- 118 Francesc Artigas, PhD, David J. Nutt, MD, PhD, and Richard Shelton, MD. Mechanism of Action of Antidepressants. *Psychopharmacol Bull* 2002; **Suppl 2**:123–32.
- 119 Stahl SM. Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *J Affect Disord* 1998; **51**:215–35.
- 120 Hindmarch I, Hashimoto K. Cognition and depression: the effects of fluvoxamine, a sigma-1 receptor agonist, reconsidered. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 2010; **25**:193–200.
- 121 Albayrak Y, Hashimoto K. Sigma-1 Receptor Agonists and Their Clinical Implications in Neuropsychiatric Disorders. In: *Sigma Receptors: Their Role in Disease and as Therapeutic Targets* (Smith SB, Su T-P, eds). Cham, Springer International Publishing, 2017; 153–61.
- 122 Nackenoff AG, Moussa-Tooks AB, McMeekin AM, *et al.* Essential Contributions of Serotonin Transporter Inhibition to the Acute and Chronic Actions of Fluoxetine and Citalopram in the SERT Met172 Mouse. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 2016; **41**:1733–41.
- 123 Muhonen LH, Lahti J, Alho H, *et al.* Serotonin transporter polymorphism as a predictor for escitalopram treatment of major depressive disorder comorbid with alcohol dependence. *Psychiatry Res* 2011; **186**:53–7.
- 124 Hillhouse TM, Porter JH. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. *Exp Clin Psychopharmacol* 2015; **23**:1–21.
- 125 Catterson ML, Preskorn SH. Pharmacokinetics of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: Clinical Relevance. *Pharmacol Toxicol* 1996; **78**:203–8.

- 126 Benfield P, Heel RC, Lewis SP. Fluoxetine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in depressive illness. *Drugs* 1986; **32**:481–508.
- 127 Gram L. Fluoxetine. *N Engl J Med* 1994; **331**:1354–61.
- 128 Hamelin BA, Turgeon J, Vallée F, *et al.* The disposition of fluoxetine but not sertraline is altered in poor metabolizers of debrisoquin. *Clin Pharmacol Ther* 1996; **60**:512–21.
- 129 von Moltke LL, Greenblatt DJ, Duan SX, *et al.* Human cytochromes mediating N-demethylation of fluoxetine in vitro. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; **132**:402–7.
- 130 Hiemke C, Härtter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther* 2000; **85**:11–28.
- 131 Bergstrom RF, Peyton AL, Lemberger L. Quantification and mechanism of the fluoxetine and tricyclic antidepressant interaction. *Clin Pharmacol Ther* 1992; **51**:239–48.
- 132 Keuthen NJ, Deckersbach T, Wilhelm S, *et al.* Repetitive skin-picking in a student population and comparison with a sample of self-injurious skin-pickers. *Psychosomatics* 2000; **41**:210–5.
- 133 Arnold LM, Mutasim DF, Dwight MM, *et al.* An open clinical trial of fluvoxamine treatment of psychogenic excoriation. *J Clin Psychopharmacol* 1999; **19**:15–8.
- 134 Curzytek K, Kubera M, Majewska-Szczepanik M, *et al.* Inhibition of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity reaction by antidepressant drugs. *Pharmacol Rep PR* 2013; **65**:1237–46.
- 135 Curzytek K, Kubera M, Szczepanik M, *et al.* Crosstalk between contact hypersensitivity reaction and antidepressant drugs. *Pharmacol Rep PR* 2013; **65**:1673–80.
- 136 Kim K. Neuroimmunological mechanism of pruritus in atopic dermatitis focused on the role of serotonin. *Biomol Ther* 2012; **20**:506–12.
- 137 K C, M M, M K. Immune-Regulatory and Molecular Effects of Antidepressants on the Inflamed Human Keratinocyte HaCaT Cell Line. *Neurotox Res* 2021; **39**:1211–26.
- 138 Boozalis E, Khanna R, Kwatra SG. Selective serotonin reuptake inhibitors for the treatment of chronic pruritus. *J Dermatol Treat* 2018; **29**:812–4.
- 139 Kouwenhoven TA, van de Kerkhof PCM, Kamsteeg M. Use of oral antidepressants in patients with chronic pruritus: A systematic review. *J Am Acad Dermatol* 2017; **77**:1068-1073.e7.
- 140 Chéret J, Gherardini J, Bertolini M, Paus R. Fluoxetine promotes human hair follicle pigmentation ex vivo: serotonin reuptake inhibition as a new antigreying strategy? *Br J Dermatol*; **n/a**. doi:10.1111/bjd.18819.

- 141 Liao S, Shang J, Tian X, *et al.* Up-regulation of melanin synthesis by the antidepressant fluoxetine. *Exp Dermatol* 2012; **21**:635–7.
- 142 Metz M, Grundmann S, Ständer S. Pruritus: an overview of current concepts. *Vet Dermatol* 2011; **22**:121–31.
- 143 Li Y, Chen L, Du Y, *et al.* Fluoxetine Ameliorates Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in BALB/c Mice through Reducing Psychological Stress and Inflammatory Response. *Front Pharmacol* 2016; **7**:318.
- 144 Slominski A, Pisarchik A, Zbytek B, *et al.* Functional activity of serotonergic and melatonergic systems expressed in the skin. *J Cell Physiol* 2003; **196**:144–53.
- 145 El-Nour H, Lundeberg L, Abdel-Magid N, *et al.* Serotonergic mechanisms in human allergic contact dermatitis. *Acta Derm Venereol* 2007; **87**:390–6.
- 146 Lonne-Rahm SB, Rickberg H, El-Nour H, *et al.* Neuroimmune mechanisms in patients with atopic dermatitis during chronic stress. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV* 2008; **22**:11–8.
- 147 Weisshaar E, Ziethen B, Gollnick H. Can a serotonin type 3 (5-HT₃) receptor antagonist reduce experimentally-induced itch? *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc* 1997; **46**:412–6.
- 148 Frank MG, Hendricks SE, Johnson DR, *et al.* Antidepressants augment natural killer cell activity: in vivo and in vitro. *Neuropsychobiology* 1999; **39**:18–24.
- 149 Pellegrino TC, Bayer BM. Specific serotonin reuptake inhibitor-induced decreases in lymphocyte activity require endogenous serotonin release. *Neuroimmunomodulation* 2000; **8**:179–87.
- 150 Pellegrino TC, Bayer BM. Role of Central 5-HT₂ Receptors in Fluoxetine-Induced Decreases in T Lymphocyte Activity. *Brain Behav Immun* 2002; **16**:87–103.
- 151 Németh ZK, Szûcs A, Vitrai J, *et al.* Fluoxetine use is associated with improved survival of patients with COVID-19 pneumonia: A retrospective case-control study. *Ideggyogyaszati Szle* 2021; **74**:389–96.
- 152 Mahdi M, Hermán L, Réthelyi JM, Bálint BL. Potential Role of the Antidepressants Fluoxetine and Fluvoxamine in the Treatment of COVID-19. *Int J Mol Sci* 2022; **23**:3812.
- 153 Ambati M, Apicella I, Wang S-B, *et al.* Identification of fluoxetine as a direct NLRP3 inhibitor to treat atrophic macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; **118**:e2102975118.
- 154 Su H-C, Ma C-T, Yu B-C, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 β regulates anti-inflammatory property of fluoxetine. *Int Immunopharmacol* 2012; **14**:150–6.
- 155 Yang H, Cao Q, Xiong X, *et al.* Fluoxetine regulates glucose and lipid metabolism via the PI3K-AKT signaling pathway in diabetic rats. *Mol Med Rep* 2020; **22**:3073–80.

- 156 Park B-K, Kim YH, Kim YR, *et al.* Antineuroinflammatory and Neuroprotective Effects of Gyejibokryeong-Hwan in Lipopolysaccharide-Stimulated BV2 Microglia. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM* 2019; **2019**:7585896.
- 157 Bai Q, Song D, Gu L, *et al.* Bi-phasic regulation of glycogen content in astrocytes via Cav-1/PTEN/PI3K/AKT/GSK-3 β pathway by fluoxetine. *Psychopharmacology (Berl)* 2017; **234**:1069–77.
- 158 Wu Q, Bencaz AF, Hentz JG, Crowell MD. Selective serotonin reuptake inhibitor treatment and risk of fractures: a meta-analysis of cohort and case–control studies. *Osteoporos Int* 2012; **23**:365–75.
- 159 SSRI Drugs and Depression: List, Side Effects & Withdrawal [WWW Document]. eMedicineHealth. URL https://www.emedicinehealth.com/ssris_and_depression/article_em.htm [accessed on 20 February 2020].
- 160 Taylor MJ, Rudkin L, Bullemor-Day P, *et al.* Strategies for managing sexual dysfunction induced by antidepressant medication. *Cochrane Database Syst Rev* 2013. doi:10.1002/14651858.CD003382.pub3.
- 161 Cox GR, Callahan P, Churchill R, *et al.* Psychological therapies versus antidepressant medication, alone and in combination for depression in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2014. doi:10.1002/14651858.CD008324.pub3.
- 162 Solmi M, Fornaro M, Ostinelli EG, *et al.* Safety of 80 antidepressants, antipsychotics, anti-attention-deficit/hyperactivity medications and mood stabilizers in children and adolescents with psychiatric disorders: a large scale systematic meta-review of 78 adverse effects. *World Psychiatry Off J World Psychiatr Assoc WPA* 2020; **19**:214–32.
- 163 Magni LR, Purgato M, Gastaldon C, *et al.* Fluoxetine versus other types of pharmacotherapy for depression. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; :CD004185.
- 164 Foletto VS, Serafin MB, da Rosa TF, *et al.* Fluoxetine and Paroxetine: Repositioning as a Therapeutic Alternative in the Treatment of Various Diseases. *Am J Ther* 2020; **27**:e547–51.
- 165 Mirshahpanah P, Maibach HI. Models in acneogenesis. *Cutan Ocul Toxicol* 2007; **26**:195–202.
- 166 Xia LQ, Zouboulis C, Detmar M, *et al.* Isolation of human sebaceous glands and cultivation of sebaceous gland-derived cells as an in vitro model. *J Invest Dermatol* 1989; **93**:315–21.
- 167 Zouboulis CC, Dessinioti C. Experimental models of the sebaceous gland. In: *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*, 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 44-48, 2015; 411–22.
- 168 Zouboulis CC, Baron JM, Böhm M, *et al.* Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Exp Dermatol* 2008; **17**:542–51.

- 169 Xia L, Zouboulis CC, Ju Q. Culture of human sebocytes in vitro. *Dermatoendocrinol* 2009; **1**:92–5.
- 170 Zouboulis CC, Seltmann H, Orfanos CE, Neitzel H. Establishment and Characterization of an Immortalized Human Sebaceous Gland Cell Line (SZ95)1. *J Invest Dermatol* 1999; **113**:1011–20.
- 171 Alestas T, Ganceviciene R, Fimmel S, *et al.* Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B4 and prostaglandin E2 are active in sebaceous glands. *J Mol Med Berl Ger* 2006; **84**:75–87.
- 172 Berg EL, Yang J, Melrose J, *et al.* Chemical target and pathway toxicity mechanisms defined in primary human cell systems. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010; **61**:3–15.
- 173 Shah F, Stepan AF, O’Mahony A, *et al.* Mechanisms of Skin Toxicity Associated with Metabotropic Glutamate Receptor 5 Negative Allosteric Modulators. *Cell Chem Biol* 2017; **24**:858-869.e5.
- 174 Berman HM, Westbrook J, Feng Z, *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**:235–42.
- 175 PyMOL | pymol.org [WWW Document]. URL <https://pymol.org/2/> [accessed on 22 June 2022].
- 176 Sanner MF. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model* 1999; **17**:57–61.
- 177 Kim S, Chen J, Cheng T, *et al.* PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Res* 2021; **49**:D1388–95.
- 178 Géczy T, Oláh A, Tóth BI, *et al.* Protein kinase C isoforms have differential roles in the regulation of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol* 2012; **132**:1988–97.
- 179 Dobrosi N, Tóth BI, Nagy G, *et al.* Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2008; **22**:3685–95.
- 180 Makrantonaki E, Zouboulis CC. Testosterone metabolism to 5 α -dihydrotestosterone and synthesis of sebaceous lipids is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor ligand linoleic acid in human sebocytes. *Br J Dermatol* 2007; **156**:428–32.
- 181 Dozsa A, Dezsó B, Tóth BI, *et al.* PPAR γ -mediated and arachidonic acid-dependent signaling is involved in differentiation and lipid production of human sebocytes. *J Invest Dermatol* 2014; **134**:910–20.
- 182 Tóth BI, Oláh A, Szöllosi AG, *et al.* ‘Sebocytes’ makeup’: novel mechanisms and concepts in the physiology of the human sebaceous glands. *Pflugers Arch* 2011; **461**:593–606.

- 183 Mihály J, Angyal Á, Szilágyi SB, *et al.* 303 Establishment and optimization of pro-inflammatory model systems in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2016; **136**:S212.
- 184 Ádám D, Arany J, Tóth KF, *et al.* Opioidergic Signaling—A Neglected, Yet Potentially Important Player in Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci* 2022; **23**:4140.
- 185 Szöllősi AG, Oláh A, Lisztes E, *et al.* Pruritus: A Sensory Symptom Generated in Cutaneous Immuno-Neuronal Crosstalk. *Front Pharmacol* 2022; **13**:745658.
- 186 Furue K, Ulzii D, Tanaka Y, *et al.* Pathogenic implication of epidermal scratch injury in psoriasis and atopic dermatitis. *J Dermatol* 2020; **47**:979–88.
- 187 J M, M S. Molecular mechanisms of pruritus. *Curr Res Transl Med* 2016; **64**. doi:10.1016/j.retram.2016.08.006.
- 188 Olek-Hrab K, Hrab M, Szyfter-Harris J, Adamski Z. Pruritus in selected dermatoses. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; **20**:3628–41.
- 189 Kido-Nakahara M, Buddenkotte J, Kempkes C, *et al.* Neural peptidase endothelin-converting enzyme 1 regulates endothelin 1-induced pruritus. *J Clin Invest* 2014; **124**:2683–95.
- 190 Adur J, Takizawa S, Uchide T, *et al.* High doses of ultraviolet-C irradiation increases vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 expression in keratinocytes of the newborn mouse epidermis. *Peptides* 2007; **28**:1083–94.
- 191 Zhong W, Wu X, Zhang W, *et al.* Aberrant Expression of Histamine-independent Pruritogenic Mediators in Keratinocytes may be Involved in the Pathogenesis of Prurigo Nodularis. *Acta Derm Venereol* 2019; **99**:579–86.
- 192 Aktar MK, Kido-Nakahara M, Furue M, Nakahara T. Mutual upregulation of endothelin-1 and IL-25 in atopic dermatitis. *Allergy* 2015; **70**:846–54.
- 193 Tsybikov NN, Petrisheva IV, Kuznik BI, Magen E. Plasma endothelin-1 levels during exacerbation of atopic dermatitis. *Allergy Asthma Proc* 2015; **36**:320–4.
- 194 Wu W, Chen L, Jia G, *et al.* Inhibition of FGFR3 upregulates MHC-I and PD-L1 via TLR3/NF- κ B pathway in muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Med* 2023; **12**:15676–90.
- 195 Chen Y, Lin J, Zhao Y, *et al.* Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B* 2021; **22**:609–32.
- 196 Ahmed D, Roy D, Jaworski A, *et al.* Differential remodeling of the electron transport chain is required to support TLR3 and TLR4 signaling and cytokine production in macrophages. *Sci Rep* 2019; **9**:18801.
- 197 Schöffski P, Cresta S, Mayer IA, *et al.* A phase Ib study of pictilisib (GDC-0941) in combination with paclitaxel, with and without bevacizumab or trastuzumab, and with letrozole in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res BCR* 2018; **20**:109.

- 198 Karagianni F, Pavlidis A, Malakou LS, *et al.* Predominant Role of mTOR Signaling in Skin Diseases with Therapeutic Potential. *Int J Mol Sci* 2022; **23**:1693.
- 199 Hawkins PT, Stephens LR. PI3K signalling in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1851**:882–97.
- 200 Stark A-K, Sriskantharajah S, Hessel EM, Okkenhaug K. PI3K inhibitors in inflammation, autoimmunity and cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2015; **23**:82–91.
- 201 Wc C, E R, X L, Jp T. Impact of intracellular innate immune receptors on immunometabolism. *Cell Mol Immunol* 2022; **19**. doi:10.1038/s41423-021-00780-y.
- 202 Folkes AJ, Ahmadi K, Alderton WK, *et al.* The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J Med Chem* 2008; **51**:5522–32.
- 203 Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, *et al.* g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res* 2019; **47**:W191–8.
- 204 Deftu AF, Filippi A, Gheorghe RO, Ristoiu V. CXCL1 activates TRPV1 via Gi/o protein and actin filaments. *Life Sci* 2018; **193**:282–91.
- 205 Smith KJ, Boyer JA, Muku GE, *et al.* Editor’s Highlight: Ah Receptor Activation Potentiates Neutrophil Chemoattractant (C-X-C Motif) Ligand 5 Expression in Keratinocytes and Skin. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2017; **160**:83–94.
- 206 Szegedi K, Sonkoly E, Nagy N, *et al.* The anti-apoptotic protein G1P3 is overexpressed in psoriasis and regulated by the non-coding RNA, PRINS. *Exp Dermatol* 2010; **19**:269–78.
- 207 Szlavicz E, Olah P, Szabo K, *et al.* Analysis of psoriasis-relevant gene expression and exon usage alterations after silencing of SR-rich splicing regulators. *Exp Dermatol* 2018; **27**:656–62.
- 208 Loser K, Mehling A, Loeser S, *et al.* Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat Med* 2006; **12**:1372–9.
- 209 Pilkington SM, Ogden S, Eaton LH, *et al.* Lower levels of interleukin-1 β gene expression are associated with impaired Langerhans’ cell migration in aged human skin. *Immunology* 2018; **153**:60–70.
- 210 Oka T, Sugaya M, Takahashi N, *et al.* CXCL17 Attenuates Imiquimod-Induced Psoriasis-like Skin Inflammation by Recruiting Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2017; **198**:3897–908.
- 211 Huang SM, Li X, Yu Y, *et al.* TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Mol Pain* 2011; **7**:37.
- 212 Nilius B, Bíró T. TRPV3: a ‘more than skinny’ channel. *Exp Dermatol* 2013; **22**:447–52.

- 213 Miyamoto T, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. TRPV3 regulates nitric oxide synthase-independent nitric oxide synthesis in the skin. *Nat Commun* 2011; **2**:369.
- 214 Xiao R, Tian J, Tang J, Zhu MX. The TRPV3 mutation associated with the hairless phenotype in rodents is constitutively active. *Cell Calcium* 2008; **43**:334–43.
- 215 He Y, Zeng K, Zhang X, *et al.* A gain-of-function mutation in TRPV3 causes focal palmoplantar keratoderma in a Chinese family. *J Invest Dermatol* 2015; **135**:907–9.
- 216 Lin Z, Chen Q, Lee M, *et al.* Exome sequencing reveals mutations in TRPV3 as a cause of Olmsted syndrome. *Am J Hum Genet* 2012; **90**:558–64.
- 217 Ni C, Yan M, Zhang J, *et al.* A novel mutation in TRPV3 gene causes atypical familial Olmsted syndrome. *Sci Rep* 2016; **6**:21815.
- 218 Yoshioka T, Imura K, Asakawa M, *et al.* Impact of the Gly573Ser substitution in TRPV3 on the development of allergic and pruritic dermatitis in mice. *J Invest Dermatol* 2009; **129**:714–22.
- 219 Zouboulis CC, Seltsmann H, Abdel-Naser MB, *et al.* Effects of Extracellular Calcium and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on Sebaceous Gland Cells In vitro and In vivo. *Acta Derm Venereol* 2017; **97**:313–20.
- 220 Zouboulis CC, Coenye T, He L, *et al.* Sebaceous immunobiology - skin homeostasis, pathophysiology, coordination of innate immunity and inflammatory response and disease associations. *Front Immunol* 2022; **13**:1029818.
- 221 Nguyen CM, Tartar DM, Bagood MD, *et al.* Topical Fluoxetine as a Novel Therapeutic That Improves Wound Healing in Diabetic Mice. *Diabetes* 2019; **68**:1499–507.
- 222 Yoon DJ, Nguyen C, Bagood MD, *et al.* Topical Fluoxetine as a Potential Nonantibiotic Adjunctive Therapy for Infected Wounds. *J Invest Dermatol* 2021; **141**:1608-1612.e3.
- 223 Murata S, Kaneko S, Morita E. Interleukin-8 Levels in the Stratum Corneum as a Biomarker for Monitoring Therapeutic Effect in Atopic Dermatitis Patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2021; **182**:592–606.
- 224 Wong L-S, Yen Y-T, Lee C-H. The Implications of Pruritogens in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci* 2021; **22**:7227.
- 225 Cansu DÜ, Korkmaz C. Pulmonary hypertension in connective tissue diseases: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Clin Rheumatol* 2022. doi:10.1007/s10067-022-06446-y.
- 226 Chen J, Argemi J, Odena G, *et al.* Hepatic lipocalin 2 promotes liver fibrosis and portal hypertension. *Sci Rep* 2020; **10**:15558.
- 227 Rokni M, Sadeghi Shaker M, Kavosi H, *et al.* The role of endothelin and RAS/ERK signaling in immunopathogenesis-related fibrosis in patients with systemic sclerosis: an updated review with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther* 2022; **24**:108.

- 228 Kostov K. The Causal Relationship between Endothelin-1 and Hypertension: Focusing on Endothelial Dysfunction, Arterial Stiffness, Vascular Remodeling, and Blood Pressure Regulation. *Life Basel Switz* 2021; **11**:986.
- 229 Granger JP, Spradley FT, Bakrania BA. The Endothelin System: A Critical Player in the Pathophysiology of Preeclampsia. *Curr Hypertens Rep* 2018; **20**:32.
- 230 Kwiatkowska E, Stefańska K, Zieliński M, *et al.* Podocytes—The Most Vulnerable Renal Cells in Preeclampsia. *Int J Mol Sci* 2020; **21**:5051.
- 231 Tocci P, Blandino G, Bagnato A. YAP and endothelin-1 signaling: an emerging alliance in cancer. *J Exp Clin Cancer Res CR* 2021; **40**:27.
- 232 Dashwood MR, Loesch A. Endothelin-1, endothelin receptor antagonists, and vein graft occlusion in coronary artery bypass surgery: 20 years on and still no journey from bench to bedside. *Can J Physiol Pharmacol* 2020; **98**:570–8.
- 233 Juif P-E, Dingemans J, Ufer M. Clinical Pharmacology of Clazosentan, a Selective Endothelin A Receptor Antagonist for the Prevention and Treatment of aSAH-Related Cerebral Vasospasm. *Front Pharmacol* 2020; **11**:628956.
- 234 Neudeck BL, Taddonio TE, Garner WL, Welage LS. Determination of fluoxetine and norfluoxetine concentrations in cadaveric allograft skin. *Pharmacotherapy* 1998; **18**:851–5.
- 235 Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, *et al.* AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011; **44**:195–235.
- 236 Pope S, Zarea SG. Serum fluoxetine and norfluoxetine levels support the safety of fluoxetine in overdose. *Ann Gen Psychiatry* 2016; **15**:30.
- 237 Abels C, Soeberdt M. Can we teach old drugs new tricks?-Repurposing of neuropharmacological drugs for inflammatory skin diseases. *Exp Dermatol* 2019; **28**:1002–9.
- 238 Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD, Richelson E. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur J Pharmacol* 1997; **340**:249–58.
- 239 Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 2008; **27**:5527–41.
- 240 Dieterle AM, Böhrer P, Keppeler H, *et al.* PDK1 controls upstream PI3K expression and PIP3 generation. *Oncogene* 2014; **33**:3043–53.
- 241 Dorahy G, Chen JZ, Balle T. Computer-Aided Drug Design towards New Psychotropic and Neurological Drugs. *Mol Basel Switz* 2023; **28**:1324.
- 242 Mullins JGL. Drug repurposing in silico screening platforms. *Biochem Soc Trans* 2022; **50**:747–58.

- 243 Khezri MR, Varzandeh R, Ghasemnejad-Berenji M. The probable role and therapeutic potential of the PI3K/AKT signaling pathway in SARS-CoV-2 induced coagulopathy. *Cell Mol Biol Lett* 2022; **27**:6.
- 244 Acharya A, Pathania AS, Pandey K, *et al.* PI3K- α /mTOR/BRD4 inhibitor alone or in combination with other anti-virals blocks replication of SARS-CoV-2 and its variants of concern including Delta and Omicron. *Clin Transl Med* 2022; **12**:e806.
- 245 Fattahi S, Khalifehzadeh-Esfahani Z, Mohammad-Rezaei M, *et al.* PI3K/Akt/mTOR pathway: a potential target for anti-SARS-CoV-2 therapy. *Immunol Res* 2022; **70**:269–75.
- 246 Hoertel N, Sánchez-Rico M, Vernet R, *et al.* Association between antidepressant use and reduced risk of intubation or death in hospitalized patients with COVID-19: results from an observational study. *Mol Psychiatry* 2021; **26**:5199–212.
- 247 Perpiñan C, Bertran L, Terra X, *et al.* Resistin and IL-15 as Predictors of Invasive Mechanical Ventilation in COVID-19 Pneumonia Irrespective of the Presence of Obesity and Metabolic Syndrome. *J Pers Med* 2022; **12**:391.
- 248 Ling L, Chen Z, Lui G, *et al.* Longitudinal Cytokine Profile in Patients With Mild to Critical COVID-19. *Front Immunol* 2021; **12**:763292.
- 249 Pérez-García F, Martín-Vicente M, Rojas-García RL, *et al.* High SARS-CoV-2 Viral Load and Low CCL5 Expression Levels in the Upper Respiratory Tract Are Associated With COVID-19 Severity. *J Infect Dis* 2022; **225**:977–82.
- 250 Saheb Sharif-Askari F, Goel S, Saheb Sharif-Askari N, *et al.* Asthma Associated Cytokines Regulate the Expression of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Lung Tissue of Asthmatic Patients. *Front Immunol* 2021; **12**:796094.
- 251 Jessop F, Schwarz B, Scott D, *et al.* Impairing RAGE signaling promotes survival and limits disease pathogenesis following SARS-CoV-2 infection in mice. *JCI Insight* 2022; **7**:e155896.
- 252 Kovács D, Fazekas F, Oláh A, Töröcsik D. Adipokines in the Skin and in Dermatological Diseases. *Int J Mol Sci* 2020; **21**:9048.
- 253 Yang GH, Lee YB, Kang D, *et al.* Overcome the barriers of the skin: exosome therapy. *Biomater Res* 2021; **25**:22.
- 254 Miltiades A, Houck PJ, Monteleone M, *et al.* Insights into Fibrinogen-Mediated COVID-19 Hypercoagulability in Critically Ill Patients. *J Neurosurg Anesthesiol* 2022; **34**:136–40.
- 255 Borella R, De Biasi S, Paolini A, *et al.* Metabolic reprogramming shapes neutrophil functions in severe COVID-19. *Eur J Immunol* 2022; **52**:484–502.
- 256 Corallo C, Pinto AM, Renieri A, *et al.* Altered expression of RXFP1 receptor contributes to the inefficacy of relaxin-based anti-fibrotic treatments in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2019; **37 Suppl 119**:69–75.

- 257 Khan MA-A-K, Islam ABMMK. SARS-CoV-2 Proteins Exploit Host's Genetic and Epigenetic Mediators for the Annexation of Key Host Signaling Pathways. *Front Mol Biosci* 2020; **7**:598583.
- 258 Bordoni V, Matusali G, Mariotti D, *et al.* The interplay between SARS-CoV-2 infected airway epithelium and immune cells modulates regulatory/inflammatory signals. *iScience* 2022; **25**:103854.

13. Kulcsszavak

Akne, endotelin, faggyúmirigy, fluoxetin, gyulladás, keratinocita, lipogenezis, száraz bőr, sebocita, szelektív szerotonin reuptake inhibitor, TRPV csatorna, viszketés.

14. Key words

Acne, dry skin, endothelin, fluoxetine, inflammation, itch, keratinocyte, lipogenesis, sebaceous gland, sebocyte, selective serotonin reuptake inhibitor, TRPV channel.

15. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik bármilyen módon hozzájárultak az értekezés létrejöttéhez akár az emberi és anyagi háttér biztosítása, akár szakmai tanácsaik, segítségük révén.

Mindenekelőtt köszönetet mondok a DE ÁOK Élettani Intézet igazgatójának **Prof. Dr. Csernoch László** professzor úrnak, aki biztosította a PhD munkámhoz szükséges feltételeket. Köszönöm korábbi - **Prof. Dr. Bíró Tamás** - és jelenlegi - **Dr. habil. Oláh Attila** - témavezetőmnek a belém vetett bizalmukat, az évek során nyújtott szakmai segítségüket, és azt, hogy szakmai és emberi szempontból fontos példát adtak, és sokat tanulhattam tőlük.

Köszönet illeti a labor és az intézet korábbi és jelenlegi dolgozóit, PhD és TDK hallgatóit, akik ha szükséges volt, mindig önzetlenül siettek a segítségemre. Közöttük is különösen közvetlen munkatársaim, **Dr. Czifra Gabriella, Dr. Tóth István Balázs, Dr. Szöllösi Attila Gábor, Dr. Szántó Magdolna, Dr. Mihály Johanna, Dr. Béke Gabriella, Dr. Markovics Arnold, Ádám Dorottya, Arany József, Dr. Shahrzad Alimohammadi, Dr. Kelemen Balázs, Dr. Lisztes Erika, Fricz Nikolett, Galicz Anita, Hollósi Erika, Szabó-Papp Judit, Kovács Elek Gergő és Barotáné Kovács Mónika** segítségéért vagyok rendkívül hálás.

Hálásan köszönöm témavezetőim, **Faragó Petra** és **Dr. Sárkány Fruzsina** munkáját, akik személyében nagyon tehetséges, szorgalmas, a tudomány iránt elkötelezett TDK hallgatókat ismerhettem meg. Mindig nagy örömmel gondolok a közös munkára.

Köszönöm kollaborációs partnereink (**Prof. Dr. Christos C. Zouboulis, Prof. Dr. Christoph Abels, Dr. Michael Soeberdt, Dr. Pór Ágnes, Dr. Póliska Szilárd** és **Dr. Matolay Orsolya** és még sokan mások) felbecsülhetetlen értékű segítségét.

Végezetül ebben a pár sorban szeretnék mindent megköszönni **Szüleimnek, Férjemnek, Testvéremnek Nagymamámnak, Keresztapámnak** és **Anyósomnak** hiszen nélkülük nem jutottam volna el eddig, nagyon hálás vagyok nekik. Külön szeretném megköszönni **Pénzes Zsófiának** a még biológia alapképzés alatt született barátságot és a PhD évek alatt nyújtott szakmai és lelki támogatását.

A doktori disszertáció a **GINOP-2.3.2-15-2016-00015** (I-KOM), az **EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009** „Az orvos-, egészségtudományi- és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése”, az **NKFIH** „K” (120552) és „FK” (125055, 134235) pályázatait, az Emberi Erőforrás Támogatáskezelő Nemzeti Tehetség Program, a Nemzeti Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíja (azonosító: **NTP-NFTÖ-18-B-0168**), valamint az Innovációs és Technológiai Minisztérium **ÚNKP-19-3** kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának (azonosító: **ÚNKP-19-3-I-DE-141**) támogatásával készült. A fluoxetin biológiai hatásainak vizsgálatára (a fentiek mellett) ipari kollaborációs partnerünk (**Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel**; Bielefeld, Németország) támogatásával került sor.



16. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/527/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Volascseké Tóth Kinga Fanni
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tóth, K. F.**, Ádám, D., Arany, J., Ramirez, Y. A., Bíró, T., Drake, J. I., O'Mahony, A., Szöllősi, A. G., Pólska, S., Kilic, A., Soeberdt, M., Abels, C., Oláh, A.: Fluoxetine exerts anti-inflammatory effects on human epidermal keratinocytes and suppresses their endothelin release.
Exp. Dermatol. "Accepted by Publisher", 2023.
IF: 3.6 (2022)
2. Szántó, M., Oláh, A., Szöllősi, A. G., **Tóth, K. F.**, Páyer, E., Czakó, N., Pór, Á., Kovács, I., Zouboulis, C. C., Kemény, L. V., Bíró, T., Tóth, I. B.: Activation of TRPV3 inhibits lipogenesis and stimulates production of inflammatory mediators in human sebocytes: a putative contributor to dry skin dermatoses.
J. Invest. Dermatol. 139 (1), 250-253, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2018.07.015>
IF: 7.143

További közlemények

3. Ádám, D., Arany, J., **Tóth, K. F.**, Tóth, I. B., Szöllősi, A. G., Oláh, A.: Opioidergic Signaling: a Neglected, Yet Potentially Important Player in Atopic Dermatitis.
Int. J. Mol. Sci. 23 (8), 4140, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23084140>
IF: 5.6
4. Angyal, Á., Péntes, Z., Alimohammadi, S., Horváth, D., Takács, L., Vereb, G., Zsebik, B., **Bíró, T.**, **Tóth, K. F.**, Lisztes, E., Tóth, I. B., Oláh, A., Szöllősi, A. G.: Anandamide Concentration-Dependently Modulates Toll-Like Receptor 3 Agonism or UVB-Induced Inflammatory Response of Human Corneal Epithelial Cells.
Int. J. Mol. Sci. 22 (15), 7776, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22157776>
IF: 6.208





5. Markovics, A., Angyal, Á., **Tóth, K. F.**, Ádám, D., Péntes, Z., Magi, J., Pór, Á., Kovács, I., Töröcsik, D., Zouboulis, C. C., Bíró, T., Oláh, A.: GPR119 is a potent regulator of human sebocyte biology.
J. Invest. Dermatol. 140 (10), 1909-1918, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.02.011>
IF: 8.551
6. Szabó, I. L., 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. 140 (2), 484-488, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2019.07.690>
IF: 8.551
7. **Tóth, K. F.**, Ádám, D., Bíró, T., Oláh, A.: Cannabinoid signaling in the skin: therapeutic potential of the "c(ut)annabinoid" system.
Molecules. 24 (5), 918, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24050918>
IF: 3.267
8. Markovics, A., **Tóth, K. F.**, Sós, K., Magi, J., Gyöngyösi, A., Benyó, Z., Zouboulis, C. C., Bíró, T., Oláh, A.: Nicotinic acid suppresses sebaceous lipogenesis of human sebocytes via activating hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCA2).
J. Cell. Mol. Med. 23 (9), 6203-6214, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.14505>
IF: 4.486

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 47,406

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,743

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, 2023.11.29.

