

# Új lehetőségek a bőrsebek gyógyulásának gyógyszeres elősegítésére

**Ph.D. értekezés tézisei**

**Dr. Degovics Döníz**



**Szeged**

**2022**

**Új lehetőségek a bőrsebek gyógyulásának gyógyszeres elősegítésére**

**Ph.D. értekezés tézisei**

**Dr. Degovics Döníz**

**Témavezető:**

**Dr. Erős Gábor Ph.D.**

**Szegedi Tudományegyetem**

**Általános Orvostudományi Kar**

**Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika**

**Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola**

**Szeged**

**2022**

## Bevezetés

A bőr az emberi test legnagyobb szerve, amely elsődleges védelmi vonalként funkcionál a fizikai, kémiai ártalmakkal, valamint a kórokozókkal szemben. A bőr integritásának helyreállítása olyan esszenciális folyamat, amely a túléléshez elengedhetetlen. A regenerációs válasz több sejttípus komplex, dinamikus összjátéka. Ez a folyamat három, egymást átfedő fázisra osztható: gyulladás, proliferáció és remodeláció.

A sebgyógyulási folyamat károsodása krónikus sebek kialakulásához vezethet, amelyek alatt a 6 hét alatt be nem gyógyuló hám-, és szövethiányt értjük. A leggyakoribb típusok a diabéteszes fekély, a vénás vagy artériás lábszárfekély és a nyomási fekély. A krónikus sebek világszerte népegészségügyi problémát jelentenek, csak az Egyesült Államokban több mint 6 millió embert érintenek, ellátási költségük évente körülbelül 9,7 milliárd dollár.

A cukorbetegség a sebgyógyulás minden egyes fázisát károsítja. A diabéteszes fekélyekre a megváltozott neutrofil- és monocita fenotípus, a citokinek és növekedési faktorok expressziójának és aktivitásának rendellenességei miatt elhúzódó gyulladásos fázis jellemző. A proliferációs fázist az endothelsejtek működési zavara, az angiogenezis károsodása, a keratinocita migráció és proliferáció csökkenése jellemzi, ami nem megfelelő granulációs szövet képződéshez és a seb szakítószilárdságának csökkenéséhez vezet. Bár az elmúlt években a sebkezeléssel foglalkozó kutatások száma exponenciálisan növekedett, a standard ellátás során a diabéteszes fekélyben szenvedő betegeknek még mindig csak 50%-a gyógyul meg teljesen, és a mai napig egyetlen terápiás szer sem tudta a gyógyulási arányt 50-60% fölé emelni.

A sérülés miatti sejtkárosodás következtében hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) szabadul fel, és  $Ca^{2+}$  szignálok figyelhetők meg. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$ , mint fontos másodlagos hírvivő, különböző intracelluláris jelátviteli útvonalakban vesz részt, pl. az excitáció-kontrakció kapcsolatban. A két legnagyobb intracelluláris  $Ca^{2+}$  raktár az endoplazmatikus retikulum (ER)/szarkoplazmatikus retikulum (SR) és a mitokondrium. Két fő receptor szabályozza a  $Ca^{2+}$  felszabadulását az SR/ER-ből, az inozitol-1,4,5-trifoszfát receptorok (IP3R) és a rianodin receptorok (RyR). Az emlősök szöveteiben jelenleg három RyR izoforma ismert, és számos sejttípus mindháromat képes expresszálni. A RyR1 (vázizom típus) és a RyR2 (szívizom típus) elsősorban a vázizomban és a szívizomban fejeződik ki, és kulcsfontosságúak az excitáció-kontrakció kapcsolatban, míg a RyR3 (agyi típus) az agyi intracelluláris kalciumszabályozásban vesz részt. Nemrégiben kimutatták, hogy a RyR az epidermális keratinocitákban is megtalálható.

A keratinociták intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvittele alapvető fontosságú számos sejtfolyamatban, pl. keratinocita migráció, proliferáció, differenciáció, barrier homeosztázis és a proinflammatorikus citokinek felszabadulása. Korábban igazolták, hogy az excitátoros receptorok, például az N-metil-D-aszpartát receptor (NMDA), a nikotinos acetilkolin receptor, a P2X purinerg receptor és a RyR aktiválása az intracelluláris kalciumkoncentráció emelkedését idézi elő, és késlelteti a bőr barrier sérülés utáni gyógyulását. Másrészt a kalciumcsatornák, például a feszültségfüggő kalciumcsatorna, a P2X receptor és a RyR gátlása felgyorsítja a barrier regenerációját. A RyR-ek teljes vastagságú bőrseb gyógyulására gyakorolt hatásáról azonban nem áll rendelkezésre információ.

A fent említett receptorokon kívül a szerotoninreceptorok (5HTR-ek) és a szerotonin visszavétel transzporterek (SERT), amelyek a szerotonin extracelluláris térből az intracelluláris térbe történő felvételéért felelősek, csökkentve ezzel az extracelluláris szerotonin koncentrációt, szintén széles körben kifejeződnek számos szövetben, beleértve a bőr sejtjeit is. A szerotonin vagy 5-hidroxitriptamin (5-HT) egy monoamin neurotranszmitter és citokin. Bár főként a gasztrointesztinális nyálkahártyában, a központi- és perifériás idegrendszerben szintetizálódik, a szerotonin bioszintetikus útvonalait a sebgyógyulás minden fázisában kulcsszerepet játszó sejtekben, például a gyulladáscsökkentő sejtekben (neutrofil granulociták, makrofágok, T-limfociták), a humán fibroblasztokban és a keratinocitákban is kimutatták. Egyre több bizonyíték van arra, hogy a szerotonin elősegíti a bőrsebek sebgyógyulását. Az 5-HT fontossága a hemosztázisban jól ismert. A gyulladáscsökkentő fázisban a vérlemezkék 5-HT-t szabadítanak fel, ami fokozza a neutrofil sejtek és makrofágok akkumulációját. Míg a korai fázisban a pro-inflammatorikus M1 makrofágok dominálnak, később megnő gyulladáscsökkentő M2 makrofágok aránya, ami hozzájárul a gyulladáscsökkentő válaszok megszűnéséhez. Az 5-HT módosítja a makrofágok funkcióit azáltal, hogy a makrofágokat a gyulladáscsökkentő M2 fenotípus felé tolja el. Érdekes módon az 5-HT-ről ismert, hogy in vitro elősegíti a fibroblasztok proliferációját, és elősegíti a miofibroblasztok differenciálódását is, ami a szerotoninerg útvonal fontos szerepére utal a sebgyógyulásban. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a szelektív szerotonin visszavétel gátlók (SSRI-k), például a fluoxetin (FLX) gyulladáscsökkentő hatásúak, csökkentik a T-sejtek aktiválódását, a citokin szekréciót és a proliferációt. Ennek háttérében az FLX intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitelt befolyásoló hatása állhat, mely során csökken az IP<sub>3</sub>- és RyR által közvetített  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás. Ezen adatok alapján merült fel az SSRI helyi hatásainak vizsgálata az elhúzódó gyulladáscsökkentő fázissal jellemezhető krónikus sebek kezelésében.

## Célkitűzés

A fő célunk az volt, hogy tanulmányozzuk a helyileg alkalmazott gyógyszerek hatását a sebgyógyulás folyamatában. E célból in vitro és in vivo kísérleteket terveztünk. A teljes vizsgálatot 2 részre osztottuk (I. és II. tanulmány).

Az I. tanulmányban a fő célkitűzéseink a következők voltak:

- annak vizsgálata, hogy a RyR-ek indukciója és gátlása milyen hatást gyakorol SKH-1 egerek teljes vastagságú sebeire,
- a sebzáródás mértékének értékelése fotó dokumentáció és szövettani minták elemzésével,
- a 4-klór-m-krezol (4-CMC), egy RyR-agonista és a dantrolén (DA), egy RyR-antagonista hatásának vizsgálata a keratinociták proliferációjára, valamint a mikrocirkuláció különböző paramétereinek nyomon követése a sebszéleken intravitalis videomikroszkópia és lézer Doppler-áramlásmérés segítségével,
- a lokálisan alkalmazott hatóanyagok (4-CMC és DA) hatásának vizsgálata a gyógyulás gyulladáshoz vezető folyamatára,
- a RyR-ek indukciójának és gátlásának hatásának nyomon követése a HaCaT sejtek sebzáródására scratch-teszttel.

A II. tanulmány céljai a következők voltak:

- a lokálisan alkalmazott FLX hatásának vizsgálata a sebgyógyulásra db/db diabéteszes egereknél, amely a krónikus sebek modelljeként szolgált,
- az FLX keratinocita-migrációra gyakorolt hatásának értékelése in vitro scratch-teszt segítségével,
- a lokális FLX-kezelés esetleges pszichológiai hatásainak tanulmányozása érdekében viselkedési kísérletek elvégzése FLX-szel kezelt diabéteszes egereken.

## **Anyagok és módszerek**

### *Anyagok*

Az I. vizsgálatban a kísérleti állatok sebeire a rianodin receptor (RyR) agonistát, a 4-klór-m-krezolt (4-CMC, 0,5 mM), vagy a RyR antagonistát, a dantrolén-nátriumsót (DA, 100  $\mu$ M) alkalmaztuk. A scratch-teszt során a HaCaT sejtvonalból származó immortalizált humán keratinocitákat 4-CMC-vel (0,3 mM) vagy DA-val (45  $\mu$ M) kezeltük.

A II. vizsgálatban db/db diabéteszes egerek teljes vastagságú bőrkimetszéssel kialakított sebeit vagy 0,02% fluoxetinnel (FLX) vagy 5% w/v polietilén-glikolban (5% PEG) oldott 2% szerotoninnal (5-HT) kezeltük. A humán bőrből izolált neonatális humán keratinocitákat (NHK) különböző koncentrációjú 5-HT-vel (1  $\mu$ mol/L 5-HT, 10  $\mu$ mol/L 5-HT, 100 nmol/L 5-HT) kezeltük keratinocita növekedési táptalajban (KGM).

### *Állatok*

Az I. vizsgálatban a kísérleteket 12-15 hetes hím SKH-1 szőrtelen egereken (testtömeg: 36-44 g) végeztük.

A II. vizsgálatban genetikailag cukorbeteg hím egereket (db/db; BKS.Cg<sup>+/+</sup> Lepr<sup>db</sup>) használtunk a kísérletekhez.

### *Kísérleti terv*

#### *I. vizsgálat.*

Az egereket 3 kezelési csoportra osztottuk: (1) a sebeket steril fiziológiás sóoldattal kezeltük; (2) a sebeket 4-CMC-vel (0,5 mM) kezeltük; (3) a sebeket DA-val (100  $\mu$ M) kezeltük. A sebekről 4 naponta fényképeket készítettünk (4, 8, 12, 16 és 20), majd az állatokat elaltattuk, és szövettani elemzéshez szövetmintákat vettünk.

A mikrokeringést intravitalis videomikroszkópiával (IVM) figyeltük meg a 4., 8. és 12. napon. Az egerek egy külön csoportjában lézer-Doppler-áramlásmérést végeztünk a 4-CMC-vel vagy DA-val kezelt sebekben.

A gyulladásos fázisban az 1. és 4. napon megmértük a xantin-oxidoreduktáz (XOR) és a mieloperoxidáz (MPO) aktivitását. Minden vizsgált időpontban, minden csoportban 6 egér volt. Vizsgálatunknak ebben a részében in vitro sebgyógyulási vizsgálatokat is végeztünk.

#### *II. vizsgálat.*

A cukorbeteg (db/db) egereken két teljes vastagságú, 8 mm-es, kirögzített, körkörös sebet alakítottunk ki. Az egereket 3 kezelési csoportra osztottuk: (1) a sebeket helyileg alkalmazott FLX-szel kezeltük; (2) a sebeket szerotoninnal (5-HT) kezeltük; (3) a sebeket 5% w/v polietilén-glikollal (PEG) kezeltük. A kezeléseket naponta helyileg alkalmaztuk. A 9. napon

viselkedési vizsgálatokat végeztünk. Számszerűsítettük az egerek világos és sötét kamrában eltöltött idejét; a sötét kamrában töltött idő százalékos aránya a szorongás mérőszáma. A felfedezési hajlandóság arányát az egerek kognitív képességének értékelésére használtuk. A 10. napon az állatokat elaltattuk, a sebszövetet formalinban rögzítettük, metszetet készítettünk, és hematoxilin-eozin (H&E) vagy immunhisztokémiai festést végeztünk. Vizsgálatunk ezen részében in vitro sebgyógyulási vizsgálatokat is végeztünk.

*A sebfelület mérése (I. vizsgálat)*

A sebekről fényképeket készítettünk. A seb területét megmértük, és a 0. napon meghatározott területhez viszonyítottuk a seb záródási sebességének kiszámításához.

*Intravitalis videomikroszkópia (IVM) (I. vizsgálat)*

A mikrocirkulációt fluoreszcens intravitalis videomikroszkóppal vizualizáltuk. A következő paramétereket vizsgáltuk: a sebszélek kapillárisaiban megmértük a vörösvérsejtek sebességét (RBCV,  $\mu\text{m/s}$ ). Az érátmérőt (VD,  $\mu\text{m}$ ) az adott látómezőben lévő összes ér mérésével értékeltük, kivéve a 6  $\mu\text{m}$ -nél kisebbeket.

*Mikrokeringési mérések lézer-Doppler-áramlásméréssel (I. vizsgálat)*

A bőr mikrovaszkuláris véráramlásának értékelésére non-invazív lézer-Doppler szöveti áramlásmérőt használtunk. A szonda fejének megfelelő nagyságú kör alakú sebeket alakítottunk ki. Egy szabványos, lézersugarat kibocsátó szondát helyeztünk a sebszél felszínére. Az áramlást 24 órával a műtét után mértük. Először a kiindulási áramlást mértük meg, majd a sebeket lokálisan kezeltük. Tíz perccel később megismételtük a méréseket. A jelet 20 másodpercig regisztráltuk.

*Szöveti xantin-oxidoreduktáz és mieloperoxidáz aktivitás (I. vizsgálat)*

Homogenizált szövetmintákból megmértük a ROS-termelés markerének tekinthető XOR és a szöveti leukocita-infiltrációt jelző MPO aktivitását.

*Rutin szövettani és immunhisztokémiai vizsgálat (I. vizsgálat)*

A sebet kimetszettük és a szövetet formalinban fixáltuk. Minden mintából történt hematoxilin-eozin (H&E) festés, míg a Ki-67 pozitív sejteket immunhisztokémiai módszerrel tettük láthatóvá.

A H&E-vel festett metszeteken megmértük a seb átmérőjét és a növekvő hámszövet kiterjedését mindkét oldalon. A növekvő hámszövet kiterjedését a seb kezdeti átmérőjéhez viszonyítottuk. A Ki-67-festett metszeteken az epidermális proliferáció elemzéséhez kiszámítottuk az epidermális proliferációs indexet; a Ki-67-et expresszáló bazális keratinociták mennyiségét

elosztottuk a bazális keratinociták teljes számával, hogy meghatározzuk a proliferáló sejtek százalékos arányát a proliferatív aktivitás mutatójaként.

*Sejtkultúra és scratch-teszt (I. vizsgálat)*

A humán HaCaT keratinocitákat DMEM-ben tenyésztettük. A kísérletekhez a sejteket 24 lyukú lemezekben inkubáltuk. Minden esetben 3 különböző kezelést alkalmaztunk 6 minta felhasználásával.

A scratch-tesztet 4 mm széles sejtkeparóval végeztük. A sejteket naponta egyszer kezeltük 4-CMC-vel (0,3 mM) vagy DA-val (45  $\mu$ M), míg a kontroll csoportot nem kezeltük. A lyuk teljes területét 24 órával, 48 órával és 72 órával a sebzés után lefényképeztük. A karcolás szélességének mérésére a DermAssess© szoftvert használtuk.

*Sejtkultúra és scratch-teszt (II. vizsgálat)*

Keratinocita: A neonatális humán keratinocitákat (NHK) újszülöttkori fitymából izolálták.

Scratch-teszt: A keratinocitákat három különböző donorból KGM-ben összeérésig növesztettük. A sejteket vagy kezeletlenül hagytuk (kontroll), vagy különböző koncentrációjú 5-HT-vel (1  $\mu$ mol/L 5-HT, 10  $\mu$ mol/L 5-HT, 100 nmol/L 5-HT) kezeltük KGM-ben a 0. időpontban. A tenyésztő edény közepén három 500 $\mu$ m és 1 mm közötti szélességű sebet alakítottunk ki steril pipettahegy alkalmazásával. A konfluens NHK-kultúrákban készített karcolásos sebek gyógyulási sebességét vizsgáltuk.

*Kirögzített sebmodell (II. vizsgálat)*

A db/db egereken két 1,6 mm vastag szilikonlapból készült gyűrű alakú rögzítő sánt helyeztünk el a háton kétoldalt a kijelölt helyeken, és cianoakrilát ragasztóval, valamint nyolc megszakított öltéssel rögzítettük. Mindkét sánt területén belül egy 8 mm-es steril bőrbioptziás lyukasztóval teljes vastagságú sebet hoztunk létre. A sántre műanyag fedőlemezt helyeztünk.

A kezeléseket naponta egyszer alkalmaztuk. A 10. napon a sebszövetet kimetszettük, formalinban rögzítettük, a metszeteken H&E festést, illetve immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk.



## Eredmények

### *I. vizsgálat.*

#### *A rianodin receptorok gátlása felgyorsítja a sebzáródást in vivo*

A seb területének digitális képeken végzett planimetrikus elemzése a hámosodás folyamatos növekedését mutatta, a 4. napon körülbelül 20%-os, a 8. napon 50%-os, a 12. napon pedig 80%-os sebfedettséggel a DA-val kezelt csoportban. A kísérlet végén, a 20. napon a kalcium antagonistával kezelt sebek mindegyike teljes sebzáródást ért el, míg a 4-CMC-vel kezelt állatoké nem.

A DA-val kezelt csoportban a makroszkópos elemzések alapján igazolt fokozott sebgyógyulást a rutin szövettani vizsgálat is megerősítette. A sebek széleinek növekvő hámmylveit a 4. és 8. napon szignifikánsan kiterjedtebbnek találtuk a kontroll állatokhoz képest. A 12-20. nap között nem találtunk lényeges különbséget a csoportok között.

Annak megállapítása érdekében, hogy a gyorsabb sebzáródás a fokozott proliferációnak tulajdonítható-e, az epidermisz proliferatív aktivitását a Ki-67-tel festett metszetek elemzésével számszerűsítettük. A 4., 8., 12., 16. és 20. napon kiszámoltuk az epidermális proliferációs indexet, de eredményeink nem mutattak szignifikáns időbeli vagy térbeli különbséget a csoportok között.

#### *A HaCaT sejtek in vitro sebzáródását dantrolén felgyorsítja*

Megvizsgáltuk a DA és a 4-CMC hatását egyrétegű HaCaT sejtek sebzáródására. A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a DA jelenlétében a kontrollhoz képest szignifikánsan gyorsabb ütemben történt a záródás, és a karcolásos terület 72 órás inkubáció után teljesen bezáródott. Ezzel szemben a 4-CMC-vel kezelt sejt kultúrákban a sebszélek nem értek össze 72 óra alatt.

#### *A dantrolén növeli az érátmérőt és a vörösvérsejtek sebességét*

Az IVM-videófelvételek elemzése kimutatta, hogy az érátmérők nem mutattak változást a 4-CMC és a kontroll csoportban a megfigyelési időszak alatt, míg a kalciumcsatorna-antagonista a 4. napon 25%-kal növelte az érátmérőket a kontroll csoporthoz képest. Ez a jelentős különbség a 8. napon (17%) és a 12. napon (22%) is megfigyelhető volt.

Az is kiderült, hogy az RyR-ek gátlása a mérések minden időpontjában kb. 25%-kal növelte a vörösvértetek sebességét a kapillárisokban, míg a 4-CMC- és a kontroll csoport között nem volt különbség. A lézer-Doppler-áramlásmérés eredményei megerősítették az IVM vizsgálat során nyert adatokat. Az áramlási görbék a véráramlás konzisztens, szignifikáns növekedését mutatták a kezelés után a kiindulási szinthez képest, mely átlagosan 15-szörös áramlásnövekedést jelentett a DA-val kezelt csoportban.

*A rianodin receptorok gátlása mérsékli a xantin-oxidoreduktáz aktivitást, ezáltal csökkenti a reaktív oxigéngyökök termelését, ugyanakkor nem befolyásolja a mieloperoxidáz aktivitást és a leukocita akkumulációt*

A sebgyógyulás gyulladós fázisában, a sebzés utáni első és negyedik napon megmértük az MPO-aktivitást, a gyulladós sejtek akkumulációjának általánosan használt mutatóját. Eredményeink alapján nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között. Ezzel szemben a ROS-termelés kritikus forrását jelentő XOR-aktivitás jelentős csökkenését figyeltük meg a DA-val kezelt csoportban az első és a negyedik napon a kontroll csoporthoz képest, míg a 4-CMC nem változtatta meg az enzimaktivitást.

## **II. vizsgálat**

*Az NHK sejtek sebzáródását szerotonin jelenlétében a fluoxetin felgyorsítja*

Bár a humán keratinocitákról kimutatták, hogy expresszálják a triptofán-hidroxiláz gént, amely az 5-HT szintézis egyik enzime, a vizsgált keratinocitákban nem tudtunk 5-HT termelést kimutatni a 9,8 nmol/L-es alsó kimutatási határunk felett. Így a keratinociták endogén 5-HT-termelődése túl alacsony lehet ahhoz, hogy exogén 5-HT hiányában fokozza a migrációs sebességet az FLX-kezelt keratinocitákban. Az 5-HT jelenlétében azonban az FLX javította a gyógyulást a kezelt sejt kultúrákban: a 10 nmol/L kezelési csoportban 60,6%, a 100 nmol/L kezelési csoportban 62,0% (P = 0,01), az 1 µmol/L FLX csoportban pedig 67,0% volt a gyógyult sebfelület (P = 0,001), a kontroll sejt kultúrák 52,2%-os gyógyulásához képest. Annak további bizonyítására, hogy az FLX 5-HT-függő útvonalon keresztül működik, a scratch-teszteket megismételtük a HTR2A szerotonin receptor blokkoló ketanserin (KET) jelenlétében. A HTR2A-blokkoló KET in vitro gátolta az FLX sebgyógyulásra gyakorolt hatását, és a sebgyógyulás mértéke ismét a kezeletlen kontrollcsoport szintjére állt vissza (P=0,948). Ezek az adatok nemcsak azt mutatják, hogy az FLX in vitro növeli a keratinocita migrációt, hanem azt is, hogy ez a HTR-en keresztül történő 5-HT jelátviteltől függ.

*A fluoxetin elősegíti a reepitelizációt in vivo*

Annak vizsgálatára, hogy az FLX elősegíti-e az in vivo sebgyógyulást, teljes vastagságú sebeket kezeltünk a károsodott sebgyógyulás modelljének számító db/db diabéteszes egerekben helyileg alkalmazott FLX-szel, 5-HT-vel, illetve 5%-os v/v PEG-gel. Az 5%-os PEG-ben oldott 0,02%-os FLX-szel vagy 2%-os 5-HT-vel kezelt egerek sebei a sebzést követő 10. napon kevesebb exszudátumot mutattak, mint a PEG-gel kezelt kontroll egereké. Ezen túlmenően a reepitelizáció az FLX-szel kezelt egereknél 66,2% volt, míg a PEG-kezelt egereknél ez átlagosan 39,6% volt (P=0.01). Mivel az 5-HT lokális alkalmazása nem eredményezett

statisztikailag szignifikáns javulást a reepitelizációban, valószínűleg a szerotonin rövid felezési ideje miatt, nem vizsgáltuk tovább a közvetlen hatását.

*A helyileg alkalmazott fluoxetin szisztémás hatása nem szignifikáns*

Egy helyileg alkalmazott gyógyszer esetén a szisztémás felszívódást minimalizálni kell a mellékhatásprofil csökkentése érdekében. A helyileg alkalmazott 0,2%-os FLX 10 napos napi adagolása után az FLX szintje a plazmában 23 és 64 ng/ml között mozgott, a plazma szerotonin koncentrációjának változása nélkül. A mért FLX-szintek kétszer alacsonyabbak, mint a terápiás dózisban szájon át szedett FLX-szel kezelt betegek plazmaszintjei, és jelentősen alacsonyabbak a neurológiailag terápiás dózisban szájon át vagy intraperitoneálisan beadott FLX-szel kezelt egerek szintjeinél is. Annak további vizsgálata céljából, hogy a helyileg alkalmazott FLX-kezelésünk kivált-e pszichológiai hatásokat, viselkedési kísérleteket végeztünk sebzett diabéteszes egereken, amelyeket helyileg alkalmazott FLX-szel kezeltünk, és azt találtuk, hogy a kezelt állatok viselkedése nem mutatott szignifikáns változásokat a fény/sötét kamrás tesztben, amely a szorongás mutatójaként alkalmazott vizsgáló módszer, vagy az új tárgyak felismerésének tesztjében, amely a kognitív funkciót jellemző vizsgáló módszer. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a helyileg alkalmazott FLX, minimális szisztémás hatás mellett, elősegíti a sebgyógyulást.

## Diszkusszió

A különböző eredetű sebek jelentősen ronthatják az életminőséget, és nagy terhet rónak az egészségügyi rendszerre. Ezért szükség van a gyógyulási folyamatot felgyorsító új terápiás megközelítésekre. Vizsgálatainkban már forgalomban lévő gyógyszerek - DA, egy izomlazító és FLX, egy antidepresszáns - hatását vizsgáltuk a sebgyógyulásra. Vizsgálatunk kimutatta, hogy a DA, a RyR-ek gátlószere elősegíti a makroszkopikus sebzáródást *in vivo*, és a szövettani vizsgálat megerősítette, hogy hozzájárul a hámosodás folyamatához. Továbbá az *in vitro* kísérletek azt igazolták, hogy DA kezelés hatására a keratinocita réteg gyorsabban záródik. A hám regenerációja a proliferáció, a migráció és a differenciáció térben és időben szorosan szabályozott folyamatát igényli. Úgy tűnik, hogy a kalcium szignálok szerepet játszanak ezekben a folyamatokban. Az epidermisz jellegzetes kalciumgrádiens mutat, alacsony kalciumszintet az alsó, bazális és spinális epidermiszrétegekben, és növekvő kalciumszintet a stratum granulosum felé, amely hozzájárul a keratinociták differenciálódásához. Azt is leírták, hogy az extracelluláris kalcium az intracelluláris szabad kalcium szintjének növekedését váltja ki, ami elősegíti a sejt differenciálódást. Mivel az epidermális sérülések megzavarják a kalciumgrádiens, és a RyR-ekről ismert, hogy a kalcium által kiváltott kalciumfelszabadulás fő közvetítői, feltételezhetőnek tűnt, hogy e receptorok működése hatással lehet a sebgyógyulásra. Denda és munkatársai kimutatták, hogy a RyR-ek aktiválása késlelteti a hámbarrier regenerálódását, míg a RyR-ek gátlása helyileg alkalmazott DA-val felgyorsítja a hámbarrier helyreállítását. Az említett vizsgálatban a sérülés a bőr legfelső rétegére korlátozódott. Vizsgálatunk újdonsága a DA hatékonyságának kimutatása a teljes vastagságú dermális sebekben. Eredményeink szerint a RyR gátlása különböző utakon keresztül járul hozzá a gyógyulási folyamathoz. A Ki-67 immunfestés segítségével nem találtunk szignifikánsan magasabb proliferációs arányt a DA alkalmazását követően. Így feltételezhető, hogy a sebek gyorsabb záródásáért a fokozott sejt migráció lehet a felelős. A migrációt kalciumfüggő folyamatok szabályozhatják, de ez a feltételezés további vizsgálatokat igényel. *In vivo* kísérleteink azonban egy másik fontos, a regenerációban szerepet játszó tényezőt is azonosítottak.

Az IVM segítségével kapott eredmények azt mutatták, hogy a DA helyi alkalmazása a sebszélek kapillárisaiban az RBCV jelentős növekedéséhez vezetett. Ez az emelkedés az arteriolák vazodilatációjából és a prekapilláris szfinkterek relaxációjából eredhet. Az érátmérők mérése igazolta a vazodilatációt, és a lézer-Doppler áramlásmérés is megerősítette a RyR gátlását követő emelkedett véráramlást. Ismert, hogy a RyR-ek számos szerv különböző kaliberű

ereiben expresszálódnak, például a vese rezisztencia arterioláiban, a mezenteriális artériákban, a kremaszter arteriolákban, a nagy agyi artériákban és az agyi mikrocirkulációban is. A RyR-ek kulcsszerepet játszanak az érrendszeri tónus szabályozásában, de hatásuk a különböző szervekben eltérő lehet. Eredményeink azt mutatták, hogy a DA jelentősen megnöveli az érátmérőt és a RBCV-t a bőrben. A RyR-ek szerepe a bőr mikrocirkulációjában eddig nem volt ismert. A sebterület fokozott perfúziója jobb oxigén- és tápanyagellátást eredményezhet, ezáltal hozzájárulva a gyorsabb regenerációhoz.

A jelen tanulmány azt is megmutatta, hogy a DA hatással van a sebzést kísérő gyulladásra. A gyulladásról ismert, hogy a sebgyógyulás első fázisa, és fontos szerepet játszik a gyógyulásban. A túlzott gyulladáshoz vezető krónikus seb kialakulásához vezethet, és hozzájárulhat a hegeképződéshez. A gyulladást különböző tényezőkkel jellemezhető, pl. a gyulladáshoz vezető sejtek felhalmozódásával és a reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) termelésével. Az MPO – egy lizoszomális fehérje –, amely nagymértékben expresszálódik a neutrofil granulocitákban és makrofágokban, a granulociták oxigénfüggő antimikrobiális rendszerének kritikus eleme, és a gyulladáshoz vezető sejtek felhalmozódásának markereként használható. A makrofágokban a XOR a ROS egyik fő forrása, továbbá kimutatható a keratinocitákban is, és fontos összetevője a veleszületett immunfolyamatoknak. A normál gyógyulási folyamat során a XOR expressziója röviddel a sebzés után fokozódik. Bár a DA helyi alkalmazása nem befolyásolta a leukociták felhalmozódását, jelentősen mérsékelte a ROS-termelést. Az irodalmi adatok alapján, úgy tűnik, hogy a kalcium szerepet játszik a ROS-képző mechanizmusok szabályozásában. A barrier sérülését különböző neurotranszmitterek, pl. ATP, dopamin és glutamát (Glut) felszabadulása követi az epidermiszből. Sebzés után a Glut magas koncentrációt ér el a bőrben. A Glut felhalmozódása stimulálja az NMDA-receptorokat, amelyek növelik az intracelluláris kalciumszintet, ami kiváltja az ER-ből a rianodin-receptorokon keresztüli kalciumfelszabadulást. Megjegyzendő, hogy az NMDA-receptorok vagy a RyR-ek gátlása csökkenti a ROS-termelést az asztrocitákban. A kalcium beáramlása mitokondriális kalcium-túlterheléshez is vezethet, ami fokozhatja a mitokondriális szuperoxid-termelődést. Az említett folyamatok öngerjesztőnek tűnnek, mivel a mitokondriumokban a ROS által kiváltott károsodás XO-aktivációhoz és további ROS-termeléshez vezet. Továbbá a ROS-expozíció a RyR-eket is aktiválja. Feltételezhető, hogy az intracelluláris kalciumfelszabadulás csökkentése a RyR-ek gátlásával a ROS-képződés csökkenését eredményezi.

A DA potenciális gyulladáscsökkentő hatását már korábbi tanulmányok is felvetették. Állatkísérletekben azt találták, hogy a DA csökkenti a pro-inflammatorikus citokinek (TNF- $\alpha$ , IL-12 és IFN- $\gamma$ ) termelését, növeli a gyulladásgátló citokinek (IL-10) mennyiségét, mérsékli a

mitokondriális diszfunkciót és javítja a túlélést az endotoxémia egérmódeljében. Ezzel szemben a RyR-ek 4-CMC-vel történő aktiválása nem befolyásolta a vizsgált paramétereket, így úgy tűnik, hogy a RyR aktiválása nem segíti elő a sebgyógyulást.

Az FLX gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív hatását is kimutatták korábban. A lipopoliszachariddal (LPS) indukált szzeptikus sokk egérmódeljében az FLX csökkentette a TNF- $\alpha$  expresszióját és javította a túlélést. Továbbá az FLX csökkentette az LPS által kiváltott ROS/RNS képződést mikroglia sejtekben és a hepatitis C vírussal stimulált Huh7.5 sejtekben. Érdekes módon egy humán T-limfocitákon végzett kutatás igazolta, hogy az FLX befolyásolja a  $Ca^{2+}$  jelátvitelt azáltal, hogy kimeríti a Ca-raktárakat, így kevesebb  $Ca^{2+}$  tud felszabadulni az IP3R vagy RyR aktiválását követően; ez a mechanizmus a FLX gyulladáscsökkentő hatásának egy lehetséges magyarázata. Az említett vizsgálat azt is leírta, hogy a Ca-raktárak kimerülése nem 5-HT-mediált. A korábbi tanulmányokkal összhangban a sebágyak kvantitatív RT-PCR-rel végzett elemzése a TNF, IFN- $\gamma$  és IL-6 transzkriptum csökkenését mutatta a kontrollcsoportéhoz képest, ami azt jelzi, hogy az FLX csökkentette a gyulladást a sebágyban. Ezenkívül vizsgálatunk kimutatta, hogy *in vivo* az FLX a kevésbé gyulladással fenotípus felé toltja el a helyi immunmiliót azáltal, hogy elősegítette a pro-reparatív M2 makrofágok képződését a sebkörnyezetben. Ezek az eredmények összhangban vannak F. Su és munkatársai tanulmányával, amely szerint az FLX képes gátolni az M1 aktivációt és javítani a mikroglia sejtek, az agyspecifikus makrofágok M2 aktivációját.

A jelen tanulmány azt is feltárta, hogy a szerotonin útvonalakon keresztül az 5-HT FLX-szel kombinálva javította a keratinocita migrációt *in vitro*. Továbbá az *in vivo* károsodott sebgyógyulási modellben az FLX alkalmazása fokozott reepitelizációt eredményezett.

Eredményeink szerint a helyileg alkalmazott FLX több a sebgyógyulásban szerepet játszó jelátviteli útvonalat is befolyásolhat.

Összefoglalva, eredményeink megmutatták, hogy a kalcium-indukált kalcium-felszabadulás gátlása lokálisan alkalmazott DA segítségével felgyorsítja a sebzáródást *in vivo* és *in vitro*. Emellett a DA fokozza a bőr vérellátását. Azt is igazoltuk, hogy a RyR-ek gátlása csökkenti a XOR-aktivitást, ezáltal mérsékli a ROS-termelést. Bár a sebkezeléshez számos olyan hatóanyag áll rendelkezésre, amely a fibroblasztok proliferációjának fokozásával és/vagy a reepitelializáció felgyorsításával elősegíthetik a sebgyógyulást (pl. dexpanthenol, nátrium-hialuronát, cink-hialuronát), tudomásunk szerint nincs olyan helyileg alkalmazható szer, amely a sebgyógyulást a sebterület perfúziójának fokozásával is elősegítené.

A károsodott sebgyógyulás diabéteszes egérmódeljében kimutattuk, hogy a lokálisan alkalmazott FLX több különböző sejt típusra gyakorolt hatása révén javítja a sebgyógyulást.

Úgy tűnik, hogy a vizsgálatunkban az FLX kedvező hatásai nem befolyásolják a pszichológiai státuszt.

Munkánk bebizonyította, hogy a RyR-antagonista DA, valamint az SSRI csoportba tartozó FLX, biztonságos és ígéretes terápiás hatóanyagok a dermális sebgyógyulás különböző útvonalakon keresztül történő elősegítésére.

## **Összefoglalás**

In vivo és in vitro kísérleteink a RyR-ek és az 5HT<sub>2</sub>-ek sebgyógyulásban betöltött szerepének feltárására irányultak.

Kimutattuk, hogy a RyR-ek gátlása több célponton keresztül jótékony hatással van a sebgyógyulásra:

- a DA in vivo fokozza a sebzáródást
- a DA felgyorsítja HaCaT sejtek sebzáródását
- a DA növeli az érátmérőt és a vörösvérsejtek sebességét
- a RyR-ek gátlása csökkenti a XOR-aktivitást, ezáltal csökkenti a ROS-termelődést

Kimutattuk, hogy az FLX, mint helyileg alkalmazott gyógyszer:

- felgyorsítja az NHK sejtek sebzáródását 5-HT jelenlétében
- az FLX elősegíti az reepitelizációt in vivo
- a helyileg alkalmazott FLX-nek korlátozott szisztémás hatása van

Ezért ezek a helyileg alkalmazott gyógyszerek biztonságos alternatívát jelentenek a krónikus, nem gyógyuló sebek problémájára.

## **Köszönetnyilvánítás**

Először is szeretném kifejezni őszinte köszönetemet Kemény Lajos professzor úrnak, hogy elindította tudományos pályafutásomat, és lehetőséget biztosított számomra, hogy tudományos munkámat a Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikán végezhessem, valamint értékes tudományos útmutatásáért és segítségéért.

Külön elismerésemet és köszönetemet szeretném kifejezni konzulensemnek, Dr. Erős Gábornak, jobb tanácsadót és mentort el sem tudtam volna képzelni. Az ő útmutatásai segítettek a kutatás és a tézis megírásának minden szakaszában.

Hálás vagyok Sztanyikné Évának és Gyurisné Szögi Kittinek a kísérletek kivitelezésében nyújtott kiváló segítségükért. Köszönöm Függek Erikának a szövettani vizsgálatokban nyújtott segítségét és Tax Gábornak a sejtekkel való munkában nyújtott segítségét.

Köszönöm Chuong Minh Nguyen, Danielle Marie Tartar, Michelle Dawn Bagood, Michelle So, Alan Vu Nguyen, Anthony Gallegos, Daniel Fregoso, Jorge Serrano, Duc Nguyen, Andrew Adams, Benjamin Harouni, Jaime Joel Fuentes, Melanie G. Gareau, Robert William Crawford, Athena M. Soulika és Roslyn Rivkah Isseroff munkáját a Davis-i Kaliforniai Egyetemen végzett in vitro és in vivo kísérletekben.

Köszönöm Alexander D. Borowsky-nak és a Davis-i Kaliforniai Egyetem Egérbiológiai Program immunhisztokémiai laboratóriumának az immunhisztokémiai festést.

A vizsgálatot a California Institute for Regenerative Medicine (CIRM) preklinikai fejlesztési díja (PC1-08118), a CIRM doktori képzési ösztöndíja (TG2-01163), a National Institutes of Health (National Institute of General Medical Sciences) T32 farmakológiai képzési ösztöndíja (T32GM099608), valamint a Kaliforniai Egyetem, Davis, Bőrgyógyászati Tanszék Seed Grantje finanszírozta.

Továbbá a kutatást támogatta az EFOP-3.6.2-16-2017-00009 számú projekt, melynek címe: A klinikai kutatások tematikus hálózatának létrehozása és nemzetközivé tétele. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap és Magyarország költségvetésének társfinanszírozásával valósult meg. A munkát a GINOP-2.3.2-15-2016-00015 számú magyarországi kutatási ösztöndíj is támogatta.



## Publikációk

*Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:*

**I. Degovics D**, Hartmann P, Németh IB, Árva-Nagy N, Kaszonyi E, Szél E, Strifler G, Bende B, Krenács L, Kemény L, Erős G.: A novel target for the promotion of dermal wound healing: Ryanodine receptors.

Toxicol Appl Pharmacol. 2019;366:17-24. doi: 10.1016/j.taap.2019.01.021.

**IF: 3.347**

**II.** Nguyen CM, Tartar DM, Bagood MD, So M, Nguyen AV, Gallegos A, Fregoso D, Serrano J, Nguyen D, **Degovics D**, Adams A, Harouni B, Fuentes JJ, Gareau MG, Crawford RW, Soulika AM, Isseroff RR.: Topical Fluoxetine as a Novel Therapeutic That Improves Wound Healing in Diabetic Mice.

Diabetes. 2019;68(7):1499-1507. doi: 10.2337/db18-1146.

**IF: 7.720**

*Az értekezés témájához kapcsolódó absztraktok:*

**I. Degovics D**, Hartmann P, Németh IB, Árva-Nagy N, Kemény L, Erős G: A rianodin receptorok szerepe a sebgyógyulásban. Bőrgyógy Vener Szle 89(6):p.165, 2013. (A Magyar Dermatológiai Társulat 86. Nagygyűlése, Budapest, 2013. december 12-14.)

**II. Degovics D**, Hartmann P, Németh I, Árva-Nagy N, Kemény L, Erős G: The effect of ryanodine receptors on dermal wound healing. Journal of Investigative Dermatology 134 (Suppl 2):S102, 2014

**III. Degovics D**, Hartmann P, Németh IB, Árva-Nagy N, Kemény L, Erős G: The role of ryanodine receptors in wound healing. European Surgical Research 52:178, 2014.

*Egyéb közlemények:*

**I.** Szél E, Danis J, Sörös E, Tóth D, Korponyai Cs, **Degovics D**, Prorok J, Acsai K, Dikstein S, Kemény L, Erős G: Protective effects of glycerol and xylitol in keratinocytes exposed to hyperosmotic stress.

Clin Cosmet Investig Dermatol. 2019;12:323-331. doi: 10.2147/CCID.S197946

**IF: 1.970**

**II.** Szél E, Polyánka H, Szabó K, Hartmann P, **Degovics D**, Balázs B, Németh IB, Korponyai C, Csányi E, Kaszaki J, Dikstein S, Nagy K, Kemény L, Erős G: Anti-irritant and anti-inflammatory effects of glycerol and xylitol in sodium lauryl sulphate-induced acute irritation.

J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015;29(12):2333-41. doi: 10.1111/jdv.13225

**IF: 3.029**

**III.** Szolnoky Gy, Erős G., **Degovics D.**, Németh I., Kui R., Paschali E, Vasas J, Korom E, Varga M, Kemény L: Novel aspects of lymphedema-, and venous leg ulcer-related pathomechanism and therapy

Bőr és Vener Szemle. 2019;95(2):65–68. doi 10.7188/bvsz.2019.95.2.6

*Egyéb absztraktok:*

**I. Degovics D**, Erős G, Hartmann P, Gati K, Nemeth IB, Czobel M, Korponyai C, Nagy K, Kemény L. The effects of oxygen- and hydroxyproline-containing solutions on the healing of acute wounds. Clinical Hemorheology and Microcirculation 2013; 54(2):193-194.

**II.** Szél E, Erős G, Hartmann P, Németh IB, **Degovics D**, Korponyai C, Dikstein S, Boros M, Nagy K, Kemény L: Anti-irritant and anti-inflammatory effects of polyols in irritant contact dermatitis. Clinical Hemorheology and Microcirculation 54(2):205, 2013.

**III.** Szél E, Erős G, Hartmann P, **Degovics D**, Korponyai C, Boros M, Dikstein S, Nagy K, Kemény L: Poliolorok antiirritáns és gyulladáscsökkentő hatása irritatív kontakt dermatitiszben. Bőrgyógy Vener Szle 89(6):p.179, 2013. (A Magyar Dermatológiai Társulat 86. Nagygyűlése, Budapest, 2013. december 12-14.)

**IV.** Szél E, Erős G, Hartmann P, Németh I, **Degovics D**, Korponyai C, Kaszaki J, Polyánka H, Szabó K, Dikstein S, Nagy K, Kemény L: Poliolorok antiirritáns és gyulladáscsökkentő hatása irritatív kontakt dermatitiszben. Bőrgyógy Vener Szle 90(6):p.261, 2014. (A Magyar Dermatológiai Társulat 87. Nagygyűlése, Budapest, 2014. november 27-29.)

*Szabadalmi kérelmek:*

**I.** Erős, G; Degovics, D; Hartmann, P; Kemény, L: Pharmaceutical composition comprising a ryanodine receptor antagonist for facilitating wound healing

US20160303085A1, Benyújtás éve (szabadalom): 2016, Benyújtás száma: 15/103,374, Benyújtás országa: Amerikai Egyesült Államok

**II.** Degovics, D; Erős, G; Hartmann, P; Kemény, L: Pharmaceutical composition comprising dantrolene analogues for treating skin wounds

HU1300720A2, Benyújtás éve (szabadalom): 2013, Benyújtás száma: P1300720, NSZO: A61K 31/4178, A61P 17/02, Ügyszám: P1300720, Benyújtás országa: Magyarország

**III.** Erős, G; Degovics, D; Hartmann, P; Kemény, L: Pharmaceutical compositions for facilitating wound healing

WO2015087097A2, Benyújtás éve (szabadalom): 2014, Benyújtás száma: PCT/HU2014/000124, NSZO: A61K 31/4178

**IV.** Erős, G; Degovics, D; Hartmann, P; Kemény, L: Pharmaceutical composition comprising a ryanodine receptor antagonist for facilitating wound healing

Benyújtás éve (szabadalom): 2016, Benyújtás száma: 201647023609, Ügyszám: 201647023609, Benyújtás országa: India

**V.** Erős, G; Degovics, D; Hartmann, P; Kemény, L: Pharmaceutical composition comprising a ryanodine receptor antagonist for facilitating wound healing

Benyújtás éve (szabadalom): 2016, Benyújtás száma: 201480075392.6, Ügyszám: 201480075392.6, Benyújtás országa: Kína

**VI.** Erős, G; Degovics, D; Hartmann, P; Kemény, L: Pharmaceutical composition comprising a ryanodine receptor antagonist for facilitating wound healing

Benyújtás éve (szabadalom): 2016, Benyújtás száma: 14837102.4, Ügyszám: 14837102.4, Benyújtás országa: Hollandia

**VII.** Erős, G; Degovics, D; Hartmann, P; Kemény, L: Pharmaceutical composition comprising a ryanodine receptor antagonist for facilitating wound healing

Benyújtás éve (szabadalom): 2017, Benyújtás száma: 17103927.3, Ügyszám: 17103927.3, Benyújtás országa: Hongkong