Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A kannabinoid szignalizáció szerepe a humán bőr egyes (kór)élettani folyamataiban

Dr. Oláh Attila

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás

DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2016

A kannabinoid rendszer szerepe a bőr egyes (kór)élettani folyamataiban

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

Írta: Dr. Oláh Attila okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan, neurobiológia program) keretében

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

A doktori szigorlati bizottság:
elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Benyó Zoltán, az MTA doktora
Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:
Debreceni Egyetem, ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet
2016. február 29. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:
Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, az MTA doktora
Dr. Tóth Attila, az MTA doktora

A bírálóbizottság:
elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, az MTA doktora
Prof. Dr. Benyó Zoltán, az MTA doktora
Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
Dr. Tóth Attila, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2016. február 29. 14:00 óra

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A humán bőr és a komplex epidermális barrier (KEB)

A bőr az egyik legnagyobb szervünk, melynek legfontosabb feladata, hogy a komplex epidermális barrier (KEB) létrehozásával elhatárolja és védelmezze testünket a külvilág változatos behatásaival szemben; a bőr ugyanakkor számos további szenzoros, endokrin (*in situ* hormontermelés) és egyéb (raktározás, transzport, hőszabályozás és exokrin) funkciót is betölt.

A KEB elsődleges védvonalát a fizikokémiai barrier képezi, ami döntően az epidermális keratinociták differenciálódásának eredményeként áll elő. Ezek a sejtek fejlődésük végén apoptotizálnak, elveszítik sejtmagjukat, és különleges extracelluláris mátrixba ágyazva, mint „téglák a habarcsban", kialakítják testünk elsődleges határfelületét, melynek „szigetelését" a bőrfelszínre ürülő faggyú tesz teljessé.

A bőr sejtjei emellett számos bioaktív molekulát, ún. antimikrobiális peptideket (AMP) és lipideket (AML) is termelnek, melyek kulcsfontosságúak a védelem következő szintjeinek, az immunológiai és az ezzel szoros kölcsönhatásban álló mikrobiológiai barriernek a kialakításában.

Bőrünkön nemcsak egyénenként, de azon belül testtájanként is jellegzetesen eltérő mikrobaközösség található. A korábban általánosan elfogadott, „kommenzális" együttélési modell helyébe az utóbbi évek felfedezéseinek fényében egy dinamikusan önszabályozó, szimbiotikus jellegű modell lépett, ahol a bőr és a különféle mikrobák közötti kölcsönhatás egyfajta folyamatos „párbeszédként" fogható fel. Ennek a „párbeszéd"-nek az egyik résztvevője az immunológiai barrier.

Ma már tudjuk, hogy a bőr immunrendszere korántsem redukálható kizárólag a rezidens és odavándorló „professzionális" immunsejtekre, hiszen a patogén-asszociált molekuláris mintázatokat felismerő receptorok, gyulladásos citokinek, kemokinek, AMP-ek és AML-ek expressziója révén az epidermális

keratinociták és a faggyúmirigyek sejtjei, a szebociták is kulcsfontosságú szerepet töltenek be benne.

Az atopias dermatitis (AD)

A különösen a fejlett ipari országokban gyakori, krónikus bőrgyulladással jellemezhető *atopias dermatitis*t (AD) gyakran emlegetik „a" barrier betegségként, hiszen ebben az esetben a KEB valamennyi építőelemének, azaz a fizikokémiai, az immunológiai és a mikrobiológiai barriernek a károsodása is megfigyelhető.

Patogenezise a mai napig sem tisztázott teljes mértékben. Egyesek szerint a betegség kiinduló lépése a fizikokémiai barrier (pl. filaggrin mutáció miatti) károsodása. Ez lehetővé teszi patogén, illetve fakultatív patogén mikrobák kolonizációját és penetrációját a bőr mélyebb rétegei felé, ahol azok jellegzetes, T-helper 2 (Th_2) polarizációjú immunválaszt indukálnak, ami (vélhetőleg a termelődő citokinek révén) hozzájárul a fizikokémiai barrier további leépüléséhez. Mások szerint ezzel szemben a bőr immunrendszerének diszregulációja az elsődleges ok.

Bár ennek a kérdésnek az eldöntésére még várnunk kell, az bizonyos, hogy az epidermális keratinociták központi szereplői a folyamatnak. Egyfelől a fizikokémiai barrier felépítése elképzelhetetlen élettani hámsejtfunkciók nélkül, másfelől pedig a keratinociták által termelt citokinek rendkívül fontosak az AD-ben kialakuló immunválasz Th_2 irányú polarizálásában, illetve a vakarózás révén a barrier károsodásához közvetlenül is nagyban hozzájáruló kínzó viszketés kiváltásában.

Mindez tehát azt jelenti, hogy a hámsejtek immunológiai folyamatainak és az ezeket szabályozó jelátviteli rendszereknek a mélyebb megismerése közelebb vihet az AD patogenezisének jobb megértéséhez, és ezen keresztül a jelenleg elérhetőnél hatékonyabb, valódi oki terápia kifejlesztésének a reményével kecsegtet. Ezért jelen tanulmány keratinocitákra fókuszáló részében egy ilyen lehetséges szabályozó, a későbbiekben részletesen bemutatandó

„endokannabinoid rendszer” működésének és hámsejtekre gyakorolt hatásainak mélyebb megértésére tettünk kísérletet.

A humán faggyúmirigyek (FM) biológiája

A FM-ek elsődleges feladata a neutrális lipidekben gazdag, összetételében jelentős fajspecificitást mutató faggyú termelése. A FM-ek már az intrauterin életben is kiemelten fontosak a magzati bőr védelmében, posztnatálisan pedig a bőrfelszín lipidjeinek háromdimenziós elrendeződéséért felelősek, ami hozzájárul a fizikokémiai barrier integritásának fenntartásához. Emellett jelentősek a bőr fényvédelmében, a hőszabályozásban vagy az antioxidánsok transzportjában. Hatással vannak a szőrnövekedésre, valamint autonóm endokrin szervekként (expresszálják a szteroidszintézishez szükséges enzimeket, és képesek androgén hormonok *in situ* termelésére) és őssejtraktárakként is funkcionálnak. Ráadásul sejtjeik, a szebociták Toll-like receptorokat (TLR), gyulladásos citokineket (pl. interleukin [IL]-6, IL-8, tumornekrózis faktor-α stb.), AMP-eket és AML-eket is expresszálnak, így immunkompetens sejteknek tekinthetőek.

Az acne

Az *acne* (pattanásosság) az egyik legnagyobb prevalenciájú emberi bőrbetegség, amely élete folyamán hosszabb-rövidebb ideig szinte mindenkit érint valamilyen formában. Bár közvetlenül nem veszélyezteti az életet, mégis különösen a súlyosabb és/vagy látható testfelszínre lokalizálódó formák jelentős pszichés terhet róhatnak a betegekre, ami akár igen komoly másodlagos lelki betegségek (szorongás, depresszió, legrosszabb esetben akár szuicid késztetés) kialakulásához vezethetnek.

Az *acne* kóroktana a mai napig sem tisztázott teljes mértékben. Az mindenesetre bizonyos, hogy a „valamilyen okból” fokozódó mennyiségű és ezzel párhuzamosan megváltozó összetételű faggyú termelése, azaz a szeborrea, a FM-ek kivezetőcsövének elzáródását okozó infundibuláris hiperkeratózis,

valamint a pangó faggyúban felszaporodó *Propionibacterium acnes* törzsek által kiváltott gyulladásos folyamatok egyaránt fontosak a patogenezisben.

A különféle terápiás lehetőségek közül hatékonysága és sokoldalúsága miatt (csökkenti a lipogenezist és a kivezetőcső hiperkeratinizációját, gátolja a gyulladásos folyamatokat, valamint visszaszorítja a *P. acnes* növekedését is) kiemelkedik az izotretinoin, amely túlzás nélkül a leghatékonyabb *anti-acne* szernek tekinthető. Sajnálatos módon azonban (elsősorban szisztémás) alkalmazásakor számos, esetenként igen súlyos mellékhatás (pl. anémia, neutropénia, trombocitopénia, májkárosodás, teratogenitás, pszichés problémák stb.) kialakulásának lehetőségével kell számolni. Mindezek alapján érthető, hogy a hatékony, lehetőség szerint a betegség minél több patogenetikai aspektusát egyidejűleg kedvezően befolyásoló, és egyszersmind a most elérhetőknél kedvezőbb mellékhatásprofillal rendelkező, valamint a szebociták homeosztatikus funkcióit nem károsító kezelési módok felderítése miért áll napjaink *acne*- és FM-irányú kutatásainak homlokterében.

A humán FM-ek modellje: az SZ95 humán szebocita sejtvonal

A FM-ek (kór)élettanának mélyebb megismerését az elmúlt évtizedek során nagyban hátráltatta, hogy vizsgálatukra nem állt rendelkezésre megbízható, a betegség teljes komplexitását leképező állatmodell. További nehézség, hogy a primer humán szebociták izolálása és tenyésztése rendkívül nehézkes folyamat, ráadásul a sejtek nem is tarthatók fenn néhány passzázsnál tovább tenyészetben.

Mindezek fényében kísérleteinket a legjobban karakterizált sejtmodell, az SZ95 szebociták felhasználásával végeztük. Vizsgálatainkat az *in vivo* és klinikai relevancia növelésére teljes vastagságú humán bőr szervkultúrával (hSOC) egészítettük ki, ami az állatmodellek sajnálatos hiányában a humán FM-ek jelenleg elérhető leginkább „*in vivo*-szerű” modellje a pre-klinikai vizsgálatok szintjén.

A (-)-kannabidiol (CBD)

Régóta ismert, hogy a vadkender (*Cannabis sativa*) fogyasztását számos jellegzetes élettani és pszichés hatás kialakulása követi. Ezen hatásokért a „fito-" azaz növényi kannabinoidok (FK) a fő felelősek. Napjainkra az azonosított FK-ok száma meghaladja a százat. Ezek döntő többsége a (-)-*transz*-Δ^9-tetrahidrokannabinollal (THC) ellentétben nem vált ki pszichotróp hatásokat. A legismertebb nem-pszichotróp FK a (-)-kannabidiol (CBD), melyet a THC-vel fix kombinációban már évek óta alkalmaznak a neurológiai klinikai gyakorlatban különösebb mellékhatások nélkül.

A CBD kedvező (analgetikus, gyulladáscsökkentő, szorongásoldó, görcsoldó stb.) hatásainak hátterében meglehetősen szerteágazó célpontspektrum húzódik. Az elmúlt években sikerült kimutatni, hogy aktivál több tranziens receptorpotenciálú (TRP) csatornát, valamint az 5-HT_{1A} szerotonin és az A_{2A} adenozin receptorokat, és gátolja egyebek mellett a GPR55, TRPM8, 5-HT_3 vagy a μ opioid receptorokat. Mindezek mellett képes egyes gyulladásos kulcsenzimek (ciklooxigenázok és lipoxigenázok) gátlására, valamint a foszfolipáz A2 aktivitásának fokozására is. Érdekes módon a CB_1 és CB_2 „klasszikus" kannabinoid receptorokon kifejtett hatásait tekintve nem egységes az irodalom.

Az endokannabinoid rendszer (ECS)

A különféle kannabinoid-érzékeny receptorok, azok endogén ligandjai, az „endokannabinoidok" (eCB) és az ez utóbbiak felépítéséért és lebontásáért felelős enzim- és transzporter apparátus egy komplex jelátviteli hálózattá állnak össze, melyet összefoglaló néven „endokannabinoid rendszer"-nek (ECS) nevezünk. A legismertebb eCB-ok (anandamid [AEA] és 2-arachidonoil-glicerol) mellett napjainkra számos egyéb endogén vegyületről derült ki, hogy képes a különféle kannabinoid receptorokat aktiválni.

A kannabinoid szignalizáció vizsgálatát a ligandok sokszínűsége mellett a meglehetősen széles receptoriális spektrum is megnehezíti, hiszen a különféle endo- és FK-ok a metabotróp (pl. CB_1, CB_2, GPR55 stb.) receptorok mellett ionotróp (egyes TRP csatornák) és intranukleáris (peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptorok [PPAR-ok]) aktivitását is befolyásolhatják. A fenti „farmakológiai promiszkuitás" ismeretében könnyen érthetővé válik, hogy a FK-ok biológiai hatásai mögött többnyire nem egyetlen, hanem adott esetben egy egész sereg célmolekula aktivitásának az adott FK-ra jellemző, karakterisztikus befolyásolása áll.

Az ECS legfontosabb, leginkább karakterizált hatásai részint a központi idegrendszerhez (KIR), részint pedig az immunrendszerhez kötődnek, ahol az étvágy, a memória és a hangulati élet befolyásolása mellett erőteljes gyulladásgátló hatásokat tulajdonítanak neki.

Ezen hatások kialakításában az egyik legfontosabb tényező az „eCB-tónus" mértéke, amit a sejtek környezetében aktuálisan jelenlévő eCB-ok mennyiségének szabályozásával a felépítő és lebontó enzimek aktivitása határoz meg. Jelen tudásunk szerint ezek között az AEA-ot lebontó zsírsavamid-hidroláz (FAAH) tűnik legjelentősebbnek.

A kannabinoidok és a bőr

Az ECS különböző tagjait természetesen a (humán) bőrben is kimutatták. A teljesség igénye nélkül napjainkra bebizonyosodott, hogy az eCB-tónus fokozódása jelentős fájdalom- és viszketéscsillapító hatással rendelkezik. Az ECS számos bőrdaganat esetében összetett tumorellenes (anti-proliferatív, pro-apoptotikus és anti-angiogén) aktivitást mutat, és részt vesz egyebek mellett a melanogenezis, a keratinocita proliferáció és differenciáció, a KEB regeneráció, a fibroblaszt funkciók vagy a bazális membrán képzésének szabályozásában is.

Az ECS szerepe a bőrgyulladásokban

Ismert, hogy az ECS igen jelentős gyulladásgátló hatást fejt ki a bőrben (is). Az epidermális keratinociták károsodott eCB szignalizációja ugyanis fokozott gyulladásos kemokin felszabaduláshoz vezet, ami a professzionális immunsejtek toborzásával elindítja és fenntartja az allergiás jellegű bőrgyulladást. A FAAH expresszió molekuláris biológiai „kiütése" és a következményesen fokozódó eCB-tónus pedig egerekben hatékonyan csökkenti a 2,4-dinitrofluoro-benzénnel kiváltott gyulladás tüneteit.

Ezek, valamint az irodalomban fellelhető további, egérmodellben nyert eredmények egyöntetűen arra utalnak, hogy az epidermális keratinocitákon kialakuló homeosztatikus eCB-tónusnak központi jelentősége van a gyulladásos folyamatok korlátozásában. Így feltételezhető, hogy a tónust elsődlegesen szabályozó enzim, a FAAH expressziójának és aktivitásának fokozódása hozzájárulhat a gyulladás kialakulásához, a „homeosztatikus" FAAH aktivitás helyreállítása pedig képes lehet kivédeni ezen hatásokat. Ezért a fenti megfontolásokat szem előtt tartva kísérleteink ECS-re fókuszáló részében a FAAH gyulladásban játszott szerepét vettük górcső alá humán keratinocitákon.

Az ECS és a bőrfüggelékek

Munkacsoportunk a közelmúltban kimutatta, hogy az ECS egyes tagjai megtalálhatóak számos bőrfüggelék sejtjein is, és alapvetően befolyásolják azok működését. A jelen dolgozat szempontjából a legfontosabb ilyen vonatkozású eredmény az, hogy a szőrtüszők és verejtékmirigyek mellett a FM-ek működését is befolyásolja az ECS. Eredményeink szerint a szebociták termelői és célpontjai is az eCB-oknak, melyek valószínűleg auto- és parakrin reguláció révén fontos szerepet játszanak a bazális faggyúlipid-termelés fenntartásában. Megállapítottuk ugyanis, hogy a CB_2 szelektív géncsendesítése (azaz az autokrin/parakrin „lipogén hurok" megtörése) jelentősen csökkentette a lipogenezist SZ95 szebocitákon. A másik oldalról közelítve a kérdést, a sejtek

eCB-kezelése pedig a CB_2 receptor → ERK1/2 MAPK → PPARγ útvonal aktiválásával drámaian fokozta a neutrális lipidek szintézisét, ami felvetette az eCB diszreguláció lehetséges szerepét az *acne* kialakulásában.

Bár ezen eredmények egyértelműen igazolták, hogy az ECS fontos szabályozó szereppel bír a humán FM-ekben, semmilyen adat sem állt rendelkezésre a FK-ok esetleges hatásait illetően, ezért a fenti eredmények ismeretében kísérleteink másik része a FK-ok, közelebbről pedig elsőként a CBD FM-ekre gyakorolt hatásainak megismerésére irányult.

CÉLKITŰZÉS

A fentiek fényében jelen kísérleteink során a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Milyen hatást gyakorol a nem-pszichotróp FK CBD a humán szebociták biológiai folyamataira, és az esetleges hatásokat milyen jelátviteli útvonal(ak)on keresztül fejti ki?

2. Milyen szerepet játszik a FAAH a humán epidermális keratinociták gyulladásos folyamatainak szabályozásában?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejttenyésztés

A humán FM-ekből származó immortalizált SZ95 szebocitákat Sebomed™ Basal Medium-ban tenyésztettük, amelyet 10 (V/V)% hővel inaktivált embrionális szarvasmarha szérummal, 1 mM $CaCl_2$-dal, 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktorral, valamint 50 IU/ml penicillinnel és 50 μg/ml streptomycinnel egészítettünk ki. Azokban az esetekben, amikor az extracelluláris Ca^{2+} szerepének tisztázására „alacsony Ca^{2+}-tartalmú médium"-ban végeztük kísérleteinket, az oldatkészítés során elhagytuk a $CaCl_2$ szupplementációt.

A Humán Papillómavírus E6 antigénnel immortalizált (HPV-KER) és a primer humán epidermális keratinocitákat (NHEK) szérummentes EpiLife médiumban tenyésztettük, melyet 1 (V/V)% „Human Keratinocyte Growth Supplement"-tel, 1 (V/V)% antibiotikum (penicillin-streptomycin keverék) és 0,5 (V/V)% antimikotikum oldattal egészítettünk ki.

A humán bőrmintákat sebészeti beavatkozáson áteső, bőrgyógyászati szempontból egészséges donoroktól nyertük, akik bőrmintáik kutatási célú felhasználásához a megfelelő tájékoztatást követően írásos beleegyezésüket adták. A mintavételt és a szövetek, sejtek felhasználását a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal engedélyezte (*protokollszám: DE OEC RKEB/IKEB 3724-2012; ügyiratszám: IX-R-052/01396-2/2012*). A kutatás mindenben a Helsinki Deklaráció szellemében, annak irányelveit a gyakorlatba ültetve zajlott. A NHEK-k izolálását és tenyésztését *Hollósi Erika*, *Furin Lilla* és *Uzonyi Renáta* asszisztensnők végezték.

A sejtek tenyésztést 5% CO_2 tartalmú, párásított légtérben, 37°C-on végeztük. A médiumot minden második napon cseréltük, és a konfluencia-indukálta differenciálódás megelőzésére a sejteket a 70-80%-os konfluenciaszint elérésekor passzáltuk.

A kísérletek során az oldószerek esetleges aspecifikus hatásainak kizárására minden anyagból ezerszeres töménységű törzsoldatot készítettünk. A gyártó javaslata alapján -20°C-on vagy 4°C-on tárolt törzsoldatokból közvetlenül a kezelés előtt készítettük el a szükséges koncentrációkat a sejtek tápoldatában ezerszeres hígítást alkalmazva. Kontrollként minden esetben az anyagok oldószerével ezerszeres hígításban kezelt sejteket használtunk.

Az intracelluláris lipidtartalom meghatározása

A lipidtartalom vizsgálata során elsőként fénymikroszkópos *Oil Red O* festésnek vetettük alá a szebocitákat, majd a szemikvantitatív vizsgálathoz *fluoreszcens Nile Red jelölés*t alkalmaztunk, a jeleket pedig FlexStation™ II^{384} vagy FlexStation 3 készülék segítségével detektáltuk. A *szebocita lipidom* vizsgálatát (egy korábban optimalizált protokollt követve) olasz kollaborációs partnereink (*Emanuela Camera*, *Matteo Ludovici* és *Mauro Picardo*) végezték „*rapid resolution reverse phase high performance liquid chromatorgaphy*" (RR-RP-HPLC) és „*time of flight*" tömegspektrometria (ToF-MS) segítségével.

Az életképesség vizsgálata

Az életképesség vizsgálatakor *kolorimetriás MTT-assay*-t alkalmaztunk. A folyamat során a sejtekben keletkező lila színű formazán kristályokat 10 (V/V)% Triton-X 100-at tartalmazó sósavas 2-propanol segítségével feloldottuk, mennyiségüket pedig kolorimetriás úton határoztuk meg 565 nm-en a korábban már említett FlexStation 3 készülék segítségével. A HPV-KER sejtek esetén a TC_{50} érték (a kontroll jelintenzitás 50%-ához tartozó hatóanyag koncentráció) meghatározásához a görbe illesztését az *Origin Pro Plus 6.0* szoftver „*Exponential Decay 1*" illesztőfunkciójával végeztük.

Az apoptotikus és nekrotikus folyamatok vizsgálata

Kísérleteink során az esetleges apoptotikus folyamatok vizsgálatára a mitokondriális membránpotenciál fluorimetriás mérését végeztük *MitoProbe™ $DilC_1(5)$ Assay Kit* segítségével (a jelintenzitás csökkenése jelzi az apoptózist),

míg a nekrotikus folyamatokat a membránok dezintegrálódását jelző *SYTOX Green jelölés*sel követtük nyomon (a jelintenzitás fokozódása jelzi a nekrózist). A fluoreszcens jeleket FlexStation™ II^{384} vagy FlexStation 3 készülék segítségével detektáltuk.

A sejtproliferáció meghatározása

A sejtproliferáció *in vitro* vizsgálatát a DNS-tartalmat mérő fluoreszcens *CyQUANT proliferációs assay* segítségével végeztük. A jelintenzitást FlexStation 3 készülék segítségével detektáltuk.

Reverz transzkripciót követő kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció (Q-PCR)

A *Q-PCR* vizsgálatokat ABI PRISM 7000 Sequence Detection System vagy Stratagene Mx3005P QPCR System segítségével, 5' nukleáz assay használatával végeztük TaqMan primerek és próbák felhasználásával. Kontrollként a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz, a 18S riboszomális RNS, illetve a peptidil-prolil izomeráz A expresszióját határoztuk meg.

Teljes genom microarray analízis

A génexpresszió CBD-kezelés során bekövetkező változásainak vizsgálatát, valamint az adatok feldolgozását és bioinformatikai kiértékelését, azaz a *gene set enrichment* (GSEA) és *Biological Networks Gene Ontology* (BiNGO) analízis, valamint a biológiailag releváns módon változó expressziót mutató gének listájának elkészítését külső cégek (*ChromoMed Kft.*, Budapest, Magyarország és *Abiomics Kft.*, Budapest, Magyarország; http://www.abiomics.eu) végezték el.

A kísérletek során 3 független kontroll és CBD-kezelt (10 μM; 24 óra) mintapár összehasonlítására került sor Human Whole Genome Oligo Microarray® (44K) (Agilent Technologies) segítségével. A génexpresszióban bekövetkező változást akkor tekintettük biológiailag relevánsnak, ha minimum

kétszeres, mindhárom esetben azonos irányba mutató változás volt detektálható, és a korrigált, globális *P* érték 0,05-nél kisebbnek adódott.

A microarray-k adatai a *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) „*Gene Expression Omnibus*" publikus adatbázisában elhelyezésre kerültek, és „*GSE57571*" hozzáférési szám alatt szabadon elérhetőek (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE57571).

Immunfluoreszcens jelölés (IF)

A steril fedőlemezre szélesztett szebocitákat szobahőmérsékleten acetonnal fixáltuk, és nyúlban termeltetett elsődleges antitestekkel inkubáltuk. Másodlagos antitestként kecskében termeltetett, Alexa Fluor® 488-cal konjugált, nyúl immunglobulin Fc-szakasza elleni immunglobulint alkalmaztunk. A sejtmagokat 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) fluoreszcens magfestővel jelöltük. A sejtekről Nikon Eclipse E600 típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével készítettünk felvételeket. Negatív kontrollként az elsődleges antitest kihagyásával megfestett mintáinkat használtuk.

Western blot

A protein mintákat azonos mennyiségben vittük fel, majd nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk. Az elválasztott fehérjéket ezt követően nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd a membránokat 5 g/100 ml tejport tartalmazó foszfátpufferelt sóoldatban hígított elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-os hőmérsékleten, míg másodlagos antitestként tormaperoxidázzal konjugált antitesteket használtunk. Az immunjeleket minden esetben kemilumineszcens SuperSignal® West Pico, illetve Femto Chemiluminescent Substrate kit segítségével tettük láthatóvá, KODAK Gel Logic 1500 Imaging System készülék felhasználásával. A kapott immunjelek digitális rögzítését *Kodak MI 4.0.5* programmal, míg a sávok szemikvantitatív denzitometriás analízisét *ImageJ 1.49v* szoftverrel végeztük. Ahol jelezve van, az egyenlő mintafelvitel ellenőrzésére a membránokat β-aktin vagy β-tubulin

ellenes antitestekkel is inkubáltuk, majd az egyes sávok optikai denzitását a mintafelviteli kontrollra normáltuk. Az ERK1/2 és p-ERK1/2, valamint a FAAH Western blotok egy részének technikai kivitelezéséért *Ambrus Lídiá*-t és *Uzonyi Renátá*-t illeti köszönet.

A citokinfelszabadulás vizsgálata (ELISA)

A citokinfelszabadulás vizsgálatának technikai kivitelezésében *Ambrus Lídia* és *Szabó-Papp Judit* nyújtott segítséget. A standardizált módon szélesztett sejteket a jelzett módokon kezeltük 24 órán keresztül. Ezt követően a felülúszókat begyűjtöttük és a további felhasználásig -80°C-on tároltuk, majd OptEIA kitek segítségével, a gyártó protokollját követve meghatároztuk a felszabadult IL-6 és IL-8 mennyiségét.

A FAAH-aktivitásának in vitro mérése

A FAAH-aktivitás mérését kollaborációs partnereink (*Simon Nicolussi* és *Jürg Gertsch*) végezték. Az enzim aktivitásának vizsgálata az NHEK és HPV-KER sejtekben a radioaktívan jelölt [etanolamin-1-^{3}H]-AEA hidrolízisének mérésével történt a korábban optimalizált protokoll szerint.

Szelektív géncsendesítés RNS interferencia technikával (RNS$_i$)

Az SZ95 szebocitákat OptiMem médiumban 40 nM humán TRPV1-, TRPV2-, illetve TRPV4-, valamint NRIP1- és TRIB3-specifikus, duplaszálú, kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal transzfektáltuk Lipofectamine® 2000 transzfekciós reagens segítségével. Kontrollként a sejteket Stealth RNAi Negative Control „medium" duplaszálú siRNS-sel transzfektáltuk, ami semmilyen ismert mRNS szekvenciájával sem mutat homológiát („scrambled" siRNS).

Az intracelluláris cAMP koncentráció meghatározása

Az SZ95 szebocitákat 1 órán át kezeltük CBD-lal (10 μM) vagy oldószerrel (1 [V/V]‰ abszolút etanol), majd a gyártó által javasolt protokollt követve a

sejteket 10^7 sejt/ml-es denzitásban lizáltuk, és Parameter Cyclic AMP Assay segítségével vizsgáltuk. A kapott eredmények kiértékeléséhez a *MyAssays Ltd. on-line* elérhető elemző alkalmazását használtuk (http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay).

Patch-clamp mérések (teljes sejtes elrendezés)

Az elektrofiziológiai kísérleteket *Pál Balázs*, *Tóth István Balázs* és *Thomas Voets* végezték. A transzmembrán áramok mérésére a sejtek membránpotenciálját 2 másodpercenként 400 ms-os ciklushosszal széles membránpotenciál tartományban változtatva került sor. A tartópotenciál 0, illetve -60 mV volt.

Fluoreszcens Ca^{2+}-mérés

A szebociták Ca^{2+}-homeosztázisát Hank oldatban, Fluo-4 AM jelölés segítségével szobahőmérsékleten (20-22°C) vizsgáltuk. A mérést FlexStation™ II^{384}, illetve FlexStation 3 készülék segítségével „Flex" módban végeztük el. A kezelés előtti alapjelek átlagértékét a kiértékelés során minden esetben kivontuk a mért értékekből, ezzel azonos alapvonalra normalizálva és könnyen összehasonlíthatóvá téve méréseinket.

Teljes vastagságú humán bőr szervkultúra (hSOC)

A hSOC kísérleteket lübecki kollaborációs partnereink (*Koji Sugawara*, *Jennifer Kloepper* és *Ralf Paus*) végezték. A kísérletek a Lübecki Egyetem Intézményi Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával (*engedélyszám: 06-109*), a Helsinki Deklaráció irányelveinek betartásával történtek. A donorok a megfelelő tájékoztatást követően írásban hozzájárultak bőrmintáik kutatási célú felhasználásához. A megfelelő kezeléseket követően a faggyúlipid-tartalom meghatározása *Oil Red O festés*, míg a proliferáció vizsgálata *Ki67 immunjelölés* segítségével történt.

Az AD állatmodellje: kísérletek NC/Tnd egereken

A kísérleteket a *BioTox Sciences* (BTS) munkatársai végezték. A kísérleti tervet, valamint az állatok fenntartását és kezelését az Intézményi Állatjólléti és Felhasználási Bizottság felügyelte (*engedélyszám: 1109-05*). A kísérletek és az állatok fenntartási körülményei megfeleltek a BTS állatjólléti szabályainak, és mindenben a „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition National Academy Press, Washington, DC, 2010*" irányelveit követték. A tanulmányban 8-9 hetes hím NC/Tnd (korábban NC/Nga-ként ismert) egerek vizsgálatára került sor csoportonként 8-9 egérrel, két részletben. Ezen egerek speciális, patogénmentes tenyésztési körülmények között tünetmentesek, azonban „hétköznapi" allergénekkel történő találkozást követően a humán AD-re klinikai és szövettani szempontból nagyon emlékeztető, viszkető bőrgyulladás alakul ki bennük. Az AD-szerű elváltozások kiváltása standardizált poratka kivonatokkal (15.000 AU/ml *Dermatophagoides pteronyssinus* és *D. farinae*) segítségével történt. Az állatok a teljes betegségpontszám (TBP) alapján lettek véletlenszerűen csoportosítva úgy, hogy minden csoportban a kiindulási átlagos pontszám 1 körül legyen. A TBP megállapítására a nyak alsó, illetve a hát felső részének vizsgálatával került sor egy 0-tól 3-ig terjedő szubjektív skála (0: tünetmentes; 1: enyhe tünetek; 2: közepesen súlyos tünetek; 3: súlyos tünetek) segítségével, melynek során a bőrpír, az ödémaképződés/papuláció, illetve a váladékozás, pörkképződés és vérzés fennállása/súlyossága volt a vizsgálódás tárgya. A TBP és a teljes fülvastagság mérésére hetente kétszer, a jelzett időpontokban került sor.

Statisztikai analízis

Az adatokat az *IBM SPSS Statistics 19*, illetve *Origin Pro Plus 6.0* szoftver segítségével, Student-féle párosított (patch-clamp analízis), illetve kétoldalú, kétmintás *t*-próbával (páros összehasonlítások) vagy egyutas ANOVA-t követő Bonferroni és Dunnett *post hoc* tesztekkel (többszörös összehasonlítás)

vizsgáltuk, és a $P<0,05$ értékeket tekintettük szignifikáns különbségnek. A variancia homogenitását Levene teszttel vizsgáltuk. Amennyiben ez inhomogenitást jelzett, a Bonferroni helyett Games-Howel tesztet végeztünk. A grafikonokat *Origin Pro Plus 6.0* szoftver segítségével ábrázoltuk.

EREDMÉNYEK

A CBD komplex anti-acne hatásokat mutat in vitro és ex vivo

Kísérleteink kezdetén arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a CBD miként befolyásolja a sejtek lipidtermelését. Megállapítottuk, hogy szemben az eCB-ok esetén tapasztaltakkal, a CBD nem befolyásolta a szebociták bazális lipidtermelését (*Oil Red O* és *Nile Red jelölés*). Érdekes módon azonban dózisfüggő módon képes volt teljes mértékben kivédeni nemcsak az eCB AEA, hanem az ECS-től független útvonalakon ható egyéb lipogén, „*pro-acne*" ágensek (arachidonsav [AA], valamint linolsav+tesztoszteron kombináció) lipidszintézist fokozó hatását is. Mindez arra utalt, hogy a CBD 1-10 μM-ban tapasztalt liposztatikus hatása nem kannabinoid rendszer specifikus, hanem egy univerzális lipidszintézist csökkentő jelpálya aktiválódásával magyarázható (*Nile Red jelölés*). Megállapítottuk azt is, hogy a CBD az 1-100 nM-os koncentrációtartományban nem befolyásolta sem a bazális, sem pedig az AA-val indukált lipidtermelést (*Nile Red jelölés*), ami arra utal, hogy a biológiai aktivitásának irodalmi adatok alapján ismert bifázisos kinetikájával a szebociták lipidszintézisére gyakorolt hatások esetén nem kell számolnunk. Végezetül a szebocita lipidom vizsgálatával kimutattuk, hogy a CBD nemcsak kvantitatív, hanem kvalitatív értelemben is normalizálja az AA-val indukált, az *acnet*, illetve a szeborreát modellező faggyúlipid-túltermelést (*RR-RP-HPLC-ToF/MS analízis*).

Mindezen adatok arra utaltak, hogy a CBD hatékony *anti-acne* szer lehet. Esetleges további, jótékony *anti-acne* hatások után kutatva megállapítottuk, hogy a CBD dózisfüggő módon csökkentette a szebociták proliferációját az 1-10 μM-os koncentrációtartományban (*CyQUANT assay*). *MTT-assay*t és kombinált *DilC$_1$(5)-SYTOX Green jelölés*t alkalmazva kimutattuk azt is, hogy a sejtszámcsökkentő hatás hátterében nem citotoxicitás, hanem valóban „tisztán" anti-proliferatív aktivitás állt. A nagy (50 μM) dózisú, illetve alacsonyabb

koncentrációban (10 μM) hosszú távon (6 nap) alkalmazott CBD azonban apoptózist indukált, és csökkentette a faggyúlipid-termelést.

Eredményeink szerint tehát létezik olyan koncentráció-időtartam kombináció, amiben teljes értékű szebosztatikus (egyidejű liposztatikus és anti-proliferatív) hatások alakulnak ki a bazális faggyúlipid-termelés és a szebociták életképességének csökkentése nélkül. Mindez egy izgalmas és rendkívüli mértékben célzott *acne* terápiás lehetőségre világít rá: nevezetesen az egészséges FM-ek alapvető működésének befolyásolása nélkül válhat elérhetővé az *acnetól* sújtott területek izolált kezelése, aminek a jelentősége a reménybeli mellékhatásmentes terápia szempontjából igen nagy.

Eredményeink *in vivo* relevanciájának növelésére (adekvát állatmodellek hiányában) a CBD szebosztatikus hatását hSOC technika segítségével is megvizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a CBD hatékonyan csökkentette az AEA-dal indukált lipidtermelést, valamint hosszútávú kezelések során visszafogta a bazális faggyútermelést is (*Oil Red O*). Hasonlóképpen, a CBD szignifikánsan csökkentette a proliferáló (*Ki67 pozitív*) szebociták arányát is. Mindezen eredményeink arra utaltak, hogy a CBD *in vitro* tapasztalt kedvező szebosztatikus hatásai minden valószínűség szerint *in vivo* is kialakulhatnak.

A fokozott mennyiségű és megváltozott minőségű faggyútermelés mellett az *acne* patogenezisének fontos „szebocita-specifikus” lépése a lokális gyulladásos reakció. Ezért egy potens *acne-ellenes* szer esetén kívánatos, hogy szebosztatikus aktivitása mellett gyulladásgátló hatású is legyen. Ennek vizsgálatára fenomenológiai kísérleteink utolsó lépéseként különböző gyulladás-modelleket alkalmaztunk a szebocitákon. Kimutattuk, hogy a CBD egyidejű alkalmazása normalizálta a lipopoliszachariddal (LPS), lipoteichnoinsavval (LTA), valamint linolsav+tesztoszteron kombinációval indukált citokinexpresszió-fokozódást (*Q-PCR*), azaz a kiváltó stimulus jelátvitelétől független, „univerzális” gyulladásgátló hatást mutatott.

A CBD liposztatikus és anti-proliferatív hatását a TRPV4 közvetíti

Miután kimutattuk, hogy a CBD liposztatikus hatása a CB_1 és CB_2 metabotróp kannabinoid receptoroktól függetlenül alakul ki (*Nile Red jelölés*), megkezdtük a további lehetséges célpontok szisztematikus vizsgálatát. *Konvencionális patch-clamp technika* teljes sejtes elrendezését alkalmazva megállapítottuk, hogy a 10 μM-os koncentrációban alkalmazott CBD kifelé egyenirányító áramot indukált, és pozitív irányba tolta el a reverzálpotenciált. Ezen eredmények arra utaltak, hogy a CBD alkalmazása sejtfelszíni kationcsatornák megnyílásához vezethet a szebocitákon, ami figyelmünket az ionotróp CBD-érzékeny receptorokra, a TRP csatornákra irányította. Munkacsoportunk a korábbiakban kimutatta, hogy egy ilyen csatorna, a TRPV1 serkentése kapszaicinnel a CBD most feltárt lipidszintézist csökkentő hatásához hasonló liposztatikus aktivitás kialakulásához vezet. Mindezek alapján kísérleteink következő lépéseként megvizsgáltuk, hogy a TRP csatornáknak lehet-e szerepe a CBD hatásainak közvetítésében.

Megállapítottuk, hogy a humán szebociták mind mRNS (*Q-PCR*), mind fehérje szinten (*IF, Western blot*) expresszálják a TRPV1, -2 és -4 ionotróp kannabinoid receptorokat. Kimutattuk azt is, hogy a szebociták funkcionálisan aktív formában fejezik ki a TRPV4-et (*patch-clamp; Fluo-4 AM-alapú fluoreszcens Ca^{2+}-mérés*), és a CBD ezen csatornát aktiválva fokozza a szebociták intracelluláris Ca^{2+} koncentrációját (*Fluo-4 AM-alapú fluoreszcens Ca^{2+}-mérés*). Ezt követően farmakológiai receptor modulátorok és *RNS_i technika* segítségével megállapítottuk, hogy a CBD liposztatikus aktivitást a TRPV4 aktivációja közvetíti, míg a TRPV1 és -2 nem vesz részt a folyamatban (*Nile Red jelölés*). Végezetül a további *anti-acne* modalitások vizsgálata során azt is kimutattuk, hogy az anti-proliferatív hatás szintén TRPV4-függő (*CyQUANT assay*), míg a gyulladásgátló aktivitás TRPV4-független módon alakult ki (*Q-PCR*).

A CBD TRPV4-függő szebosztatikus hatását az ERK1/2 MAPK gátlása és a „nuclear receptor interacting protein 1” (NRIP1) szintén TRPV4-függő down-regulációja közvetíti

Miután kizártuk számos fontos intracelluláris szabályozómolekula (különféle PKC izoformák, PI3K, PKA, kalcineurin) részvételét a lipidszintézist csökkentő hatás kialakításában, kísérleteinket *teljes genom microarray* vizsgálatokkal folytattuk. Három független kontroll és CBD-kezelt (10 μM, 24 óra) mintapárt összehasonlítva az elvégzett *GSEA* és *BiNGO* analízis egyértelműen alátámasztotta a komplex *anti-acne* hatások kialakulását. Megállapítottuk azt is, hogy a CBD 80 gén expresszióját csökkentette és 72-ét fokozta szignifikáns mértékben. Ezek között *Q-PCR* segítségével megerősítettük, hogy a „*nuclear receptor interacting protein 1*” (NRIP1; a zsírsejtek triglicerid felhalmozását pozitívan szabályozó gén) és a Ki67 proliferációs marker TRPV4-függő módon down-regulálódott, míg a lipogén ERK útvonal endogén inhibitorának, a „*Rho GTPase activating protein 9*”-nek (ARHGAP9) az expressziója (szintén TRPV4-függő módon) fokozódott. Kimutattuk azt is, hogy a CBD TRPV4-függő módon gátolta az AEA-által indukált ERK1/2 MAPK aktivációt (*Western blot*), az NRIP1 (a CBD celluláris hatását utánzó) RNS_i-mediált down-regulációja pedig a CBD-hoz hasonlóan csökkentette az AA lipogén hatását (*Nile Red jelölés*).

A CBD gyulladásgátló hatásának hátterében a P65-NF-κB-útvonal vélhetőleg „tribbles homolog 3” (TRIB3) általi gátlása áll

A szebosztatikus aktivitás hátterében álló sejtélettani folyamatok részletes tanulmányozását követően a gyulladásgátló hatás mélyreható vizsgálatára kerítettünk sort. A már említett *microarray* adatok *Q-PCR* validálása során megállapítottuk, hogy a CBD (előbbi adatainkkal összhangban) TRPV4-független módon up-regulálta több immunológiai funkcióval bíró gén (az NF-κB-útvonalat gátló „*tribbles homolog 3*” [TRIB3], valamint az AMP LL-37

katelicidin) kifejeződését is. Kimutattuk azt is, hogy a TRIB3 szelektív géncsendesítése kivédi a CBD gyulladásgátló hatását (*RNS_i, Q-PCR*), de nem befolyásolja a liposztatikus hatást (*Nile Red jelölés*). Mivel a TRIB3 a P65-NF-κB-útvonal ismert endogén inhibitora, azt is megvizsgáltuk, hogy a CBD miként befolyásolja az LPS-indukált NF-κB aktivációt. Megállapítottuk, hogy az irodalmi adatokkal és saját eddigi eredményeinkkel összhangban a CBD TRPV4-független módon kivédte az inhibitorikus I-κB-α és a P65-NF-κB LPS-által indukált foszforilációját (*Western blot*). Mindez tehát azt jelenti, hogy a látott gyulladásgátló hatás hátterében az NF-κB-útvonal (minden bizonnyal TRIB3-mediált) gátlása állhat.

A CBD az A_{2A} adenozin receptor aktiválásával fejti ki gyulladásgátló hatását

A gyulladásgátló TRIB3 up-reguláció „*up-stream*" jelátvitelét kutatva megállapítottuk, hogy a CBD fokozta a szebociták intracelluláris cAMP koncentrációját (*ELISA*). Tekintve, hogy a CBD ismert célmolekulái között egyedüliként az A_{2A} adenozin receptor G_s-fehérjéhez kapcsolt, *Q-PCR*, *Western blot* és *IF jelölés* segítségével megvizsgáltuk a kifejeződését. Megállapítottuk, hogy a szebociták mind mRNS, mind fehérje szinten expresszálják az A_{2A} receptort, aminek a gátlása kivédte (i) a CBD-indukált TRIB3 up-regulációt (*Q-PCR*); (ii) a gyulladásgátló hatás kialakulását (*Q-PCR*); és (iii) az NF-κB-útvonal gátlását is (*Western blot*).

Eredményeink alapján tehát humán szebocitákon a CBD gyulladásgátló hatásáért a P65-NF-κB útvonal A_{2A} receptor → cAMP↑ → TRIB3↑ jelátviteli „tengely" általi gátlása lehet felelős.

A Toll-like receptor 2 (TLR2) aktiváció fokozza a FAAH expresszióját és aktivitását humán epidermális keratinocitákon

Vizsgálataink második felében az ECS gyulladásos folyamatok szabályozásában betöltött szerepének jobb megismerésére tettünk kísérletet epidermális keratinocitákon.

Kísérleteink első lépéseként sikerrel reprodukáltuk azokat az irodalmi adatokat, melyek szerint az eCB-okat lebontó talán legfontosabb enzim, a FAAH funkcionálisan aktív formában fejeződik ki a humán epidermális keratinocitákon. Ismert, hogy a FAAH által szabályozott lokális eCB-tónus egy állandó, „homeosztatikus" gyulladásgátló hatást tart fenn a keratinocitákon. Mindezek ismeretében feltételezhető, hogy a lokális gyulladásos folyamatok elindítása során az eCB-tónus FAAH-mediált negatív irányú szabályozása is hozzájárulhat a válasz mértékének finomhangolásához. Ezen hipotézissel összhangban kimutattuk, hogy a TLR2 aktiváció (az mRNS szintű kifejeződés befolyásolása nélkül; *Q-PCR*) jelentősen fokozta a FAAH fehérje szintű expresszióját (*Western blot; FAAH-aktivitás mérés*) epidermális keratinocitákban.

A FAAH gátlása a CB_1 és CB_2 receptorok indirekt aktivációjával jelentős gyulladásgátló hatáshoz vezet

A FAAH (kór)élettani jelentőségének további vizsgálata során a TLR2-t aktiváló LTA-val váltottunk ki gyulladásos választ humán epidermális keratinocitákon, amit különféle gyulladásos citokinek (IL-1α, IL-1β, IL-6 és IL-8) expressziójának (*Q-PCR*) és felszabadulásának (IL-6 és IL-8 *ELISA*) a mérésével követtünk nyomon. Kereskedelmi forgalomban kapható (URB597), illetve kollaborációs partnerünk által újonnan kifejlesztett (WOBE440 és WOBE479) szelektív FAAH-inhibitorok alkalmazásával megállapítottuk, hogy a FAAH gátlása hatékonyan csökkenti az LTA-val indukált *in vitro* gyulladásos választ (*Q-PCR, ELISA*). Szelektív antagonisták alkalmazásával kimutattuk azt is, hogy a FAAH-inhibitorok gyulladásgátló hatásának hátterében a CB_1 és CB_2 receptorok (fokozott eCB-tónus általi) indirekt aktiválása állt (*Q-PCR*).

A FAAH-inhibitorok a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazhatók

A következőkben a FAAH-gátlók életképességre gyakorolt hatásait vizsgáltuk meg. Megállapítottuk, hogy az inhibitorok 8 és 24 órás kezelések

során nem befolyásolták a HPV-KER sejtek életképességét (*MTT-assay*), és nem indukáltak korai, sejtszámváltozással még nem járó apoptotikus vagy nekrotikus sejthalál folyamatokat sem (*DilC_1(5)-SYTOX Green jelölés*). Kísérleteinket hosszabb távú (72 óra) kezelések alkalmazásával is megismételve szintén úgy találtuk, hogy a FAAH-inhibitorok citotoxikus hatása csak több nagyságrenddel a korábban hatékonynak talált gyulladásgátló koncentrációk fölött jelentkezik (*MTT-assay*).

A FAAH-inhibitorok kedvezően befolyásolják az NC/Tnd egerek bőrtüneteit

Kísérleteink zárásaként egy jelentős klinikai relevanciával rendelkező *in vivo* modellben azt vizsgáltuk meg, hogy a FAAH-inhibitorok topikális alkalmazást követően is hatékonynak bizonyulnak-e.

A kérdés megválaszolására partnereink a korábban NC/Nga-ként ismert, és az AD széles körben elfogadott modelljeként számon tartott NC/Tnd egértörzsön vizsgálták a FAAH-inhibitorok hatékonyságát, „pozitív" kontrollként kalcineurin-inhibitort (tacrolimus) alkalmazva. A kísérletek során megállapítást nyert, hogy a két újonnan szintetizált FAAH-inhibitor topikálisan alkalmazva a tacrolimusszal gyakorlatilag megegyező hatékonysággal enyhítette az egerek bőrtüneteit (TBP) és fogta vissza a gyulladásos folyamatok aktivitásának általános jelzőjeként számon tartott ödémás fülduzzadás kialakulását; ráadásul a 30 napos vizsgálati periódus alatt semmilyen nyilvánvaló makroszkópos mellékhatásra vagy viselkedésbeli változásra sem derült fény. Mindezen eredményeink arra utalnak, hogy a topikálisan adagolt FAAH-gátlók *in vivo* is hatékonyak lehetnek a különböző bőrgyulladások kezelésében.

DISZKUSSZIÓ

A bőr (kór)élettani folyamatainak mélyebb megismerése és megértése számos nagy prevalenciájú megbetegedés kezelésében kecsegtet az előrelépés reményével. Az ECS és a(z endo)kannabinoid szignalizáció egy olyan újonnan felfedezett, dinamikusan bővülő szabályozó rendszer, amelyről irodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy döntő jelentőségű az immunrendszer működéseinek finomhangolásában. Diszregulációja ennek megfelelően az emberi bőr vonatkozásában is számos gyakori, gyulladásos folyamatokkal kísért betegség (pl. az AD vagy az *acne* stb.) patogenezisében játszhat szerepet, így pedig a molekuláris medicina egyik kulcsfontosságú jövőbeli célpontja lehet. Jelen értekezésben arra tettünk kísérletet, hogy megvizsgáljuk egy nem-pszichotróp FK, a CBD hatásait humán szebocitákon, illetve, hogy több információt szerezzünk az egyik legfontosabb eCB-lebontó enzim, a FAAH működéséről és jelentőségéről a humán epidermális keratinociták immunológiai sajátságainak szabályozásában.

A FAAH mint lehetséges célpont a bőrgyulladások kezelésében

Ismert, hogy az epidermális keratinociták különféle kemokinek és citokinek felszabadítása révén kulcsfontosságúak a „professzionális" immunsejtek toborzásában és működésük szabályozásában; biológiai aktivitásuk ily módon jelentős szerepet játszik a bőrgyulladások elindításában és lefolyásuk alakulásában. Bár a FAAH epidermális expressziója már régóta ismert, jelen kísérleteink során elsőként mutattuk ki, hogy a FAAH aktivitása (érdekes módon az mRNS szintű kifejeződés módosulása nélkül) szignifikánsan fokozódott a TLR2-t aktiváló LTA-val történő 24 órás kezelések során mind immortalizált, mind pedig primer humán epidermális keratinociták esetén. Így az enzim aktivitásának poszttranszkripciós szabályozása (vélhetőleg a homeosztatikus eCB tónus *in situ* csökkentésén keresztül) bizonyos esetekben hozzájárulhat a gyulladásos folyamatok kiteljesedéséhez.

Mindezen eredmények alapján a TLR-jelátvitel által fokozott FAAH aktivitás normalizálása egy teljesen új, célzott gyulladásgátló terápia esélyét vetítette előre a bőr gyulladásos folyamatainak kezelésében. Ezen hipotézis tesztelésére megvizsgáltuk, hogy egy kereskedelmi forgalomban már elérhető (URB597), illetve két, kollaborációs partnereink által újonnan kifejlesztett, potens és szelektív FAAH-inhibitor (WOBE440 és WOBE479) miként befolyásolja az LTA indukálta gyulladásos válasz kialakulását. Megállapítottuk, hogy a gátlószerek jelentősen csökkentették az LTA-ra adott pro-inflammatórikus reakciót. A hatás hátterében az irodalmi adatokkal összhangban a CB_1 és CB_2 kannabinoid receptorok indirekt aktiválása állt. Mindezen keratinocitákon nyert eredményeink arra utaltak, hogy a FAAH-inhibitorok *in vivo* is képesek lehetnek hatékony gyulladásgátló válasz kialakítására. Ráadásul, elméleti megfontolások alapján, ezt a hatást egyéb lokális tényezők is erősíthetik, hiszen az epidermális eCB-tónus fokozódása (elvileg) pl. a Langerhans sejtek és az érzőideg-végződések biológiai viselkedését is anti-inflammatórikus irányba befolyásolhatja.

A lehetséges klinikai felhasználás szempontjából kulcskérdés, hogy szisztémás vagy topikális úton kívánjuk-e alkalmazni az adott szereket. Tekintettel arra, hogy a topikális alkalmazás esetén sokkal célzottabb (és esetleg nagyobb dózisú) kezelésre nyílik lehetőség, az esetleges mellékhatások minimalizálása érdekében mindenképpen a közvetlenül a bőrre történő adagolás tűnik a legcélravezetőbbnek. Mindezen megfontolások alapján kísérleteink zárásaként az AD általánosan elfogadott modelljéül szolgáló NC/Tnd egerek felhasználásával is meg kívántuk vizsgálni a FAAH-gátlók topikális alkalmazást követő gyulladásgátló hatékonyságát.

Megállapítottuk, hogy a bőrfelszínre adagolt FAAH-inhibitorok a klinikai gyakorlatban széles körben használt és ezért jelen kísérleteink során pozitív kontrollként alkalmazott tacrolimushoz hasonló hatékonysággal enyhítették az állatok gyulladásos folyamatainak mértékét indirekt módon jelző fülduzzadást,

és szignifikánsan csökkentették a TBP-ot is úgy, hogy az egy hónapos vizsgálati periódus során nem okoztak megfigyelhető mellékhatást. Mindezek alapján a most bemutatott, komplementer *in vitro* és *in vivo* kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy a FAAH gátlása célzott, hatékony és az állatkísérletes adatok tanúsága szerint nagy valószínűséggel mellékhatásmentes terápiás eszköz lehet a különféle bőrgyulladások jövőbeli kezelésében.

A CBD komplex anti-acne hatásai és azok mechanizmusa

Az *acne* az egyik leggyakoribb emberi bőrbetegség, melynek kezelése a mai napig sem teljes mértékben megoldott. Kísérleteink során humán, immortalizált szebociták (SZ95 sejtek), illetve hSOC alkalmazásával megállapítottuk, hogy a neurológiai klinikai gyakorlatban a *sclerosis multiplex* adjuváns kezelésében már évek óta alkalmazott FK CBD komplex *anti-acne* hatásokat vált ki. Eredményeink alapján a CBD az életképesség és a bazális faggyúlipid-termelés befolyásolása nélkül mind kvantitatív, mind kvalitatív értelemben normalizálta a szebociták *pro-acne* ágensekkel indukált lipidtermelését, valamint anti-proliferatív és gyulladásgátló hatást mutatott. Szebosztatikus hatása ráadásul „*in vivo*-szerű" körülmények között, hSOC-ban is kialakult.

Az előzőekben tárgyalt hármas celluláris *anti-acne* aktivitás mellett irodalmi adatok alapján a CBD topikális alkalmazását további, a betegség kezelése szempontjából előnyös hatások kialakulása is kísérheti. A CBD-ról ugyanis a közelmúltban bebizonyosodott, hogy jelentős anti-bakteriális hatással bír, és bár esetleges *P. acnes* ellenes hatékonyságát ez ideig még senki sem vizsgálta, felmerül, hogy az egyébként is valószínűsíthető indirekt (pl. LL-37 katelicidin up-reguláció által mediált) hatásait direkt anti-bakteriális aktivitás is kiegészítheti. A CBD emellett gátolja a hiperproliferatív keratinociták osztódását és differenciációját is. Ennek, valamint az *acnera* jellemző kóros lipidom kvalitatív normalizálásának és a gyulladásoscitokin-termelés csökkentésének pedig a *comedo* képződésre lehet jótékony hatása, aminek

eredményeként már a betegség valamennyi patogenetikai lépését lefedő, globális *anti-acne* aktivitás alakulhat ki.

A kedvező hatások fenomenológiai karakterizálása után azok mechanizmusának részletekbe menő vizsgálatára igyekeztünk sort keríteni. Számításba véve a CBD lehetséges célmolekuláinak ismert sokszínűségét, ez meglehetősen komplex vállalkozásnak ígérkezett. Egyes korábbi eredményeink (ti., hogy a TRPV1 aktivációja a CBD esetében látotthoz hasonló liposztatikus hatások kialakulásához vezet) ugyanakkor arra engedtek következtetni, hogy esetünkben is ionotróp kannabinoid receptorok aktiválódása állhat a hatások hátterében. Ennek megfelelően a következőkben elektrofiziológiai, farmakológiai és molekuláris biológiai módszerek széles tárházát felvonultatva igazoltuk, hogy a CBD liposztatikus és anti-proliferatív aktivitása a TRPV4 ioncsatorna aktivációjához és a következményes Ca^{2+}-beáramláshoz kötődik, míg a gyulladásgátló hatás ettől függetlenül alakul ki.

Ezen a ponton érdemes megjegyezni, hogy a lipidszintézis Ca^{2+}-hoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak általi negatív regulációja nem példanélküli az irodalomban, ugyanis a szebociták mellett zsírsejteken is leírtak már hasonló mechanizmust. Adatainkkal összhangban ráadásul mások is beszámoltak arról, hogy a CBD hatékony, de a „klasszikus" agonistákhoz és más FK-okhoz (pl. (-)-Δ^9-tetrahidrokannabivarin [THCV]) képest kis hatáserősségű aktivátora a TRPV4-nek. Nem publikált, valamint jelenleg bírálati szakban lévő eredményeink alapján ugyanis a CBD-nál potensebb TRPV4 aktivátor THCV az 1-10 μM-os koncentrációtartományban a CBD-hoz nagyon hasonló szebosztatikus hatásokat vált ki, 10 μM-ban azonban már csökkenti a bazális faggyúlipid-termelést, és az azonos koncentrációban adagolt CBD alkalmazásakor jellemzőnél nagyobb Ca^{2+}-jelet vált ki.

Az *anti-acne* hatások mechanizmusának mélyebb megismerésére végzett *microarray analízis* alapján számos potenciális célgén került érdeklődésünk középpontjába. Az ezek közül *Q-PCR* megerősítésre kiválasztott gének

validálása addigi eredményeinkkel teljes összhangban azt mutatta, hogy a lipidszintézishez (NRIP1 és ARHGAP9), valamint proliferációhoz (Ki67) köthető gének TRPV4-függő, míg az immunológiai funkciókhoz kötődő gének (TRIB3, LL-37 katelicidin) TRPV4-független módon regulálódtak.

Ezen eredményekből kiindulva megállapítottuk, hogy a liposztatikus hatás a lipogén ERK1/2 MAPK kaszkád TRPV4-függő gátlása, illetve a triglicerid raktározást pozitívan szabályozó NRIP1 szintén TRPV4-függő down-regulálása révén alakul ki. A gyulladásgátló hatás hátterében ezzel szemben a pro-inflammatórikus P65-NF-κB útvonal vélhetőleg A_{2A} adenozin receptor → cAMP↑ → TRIB3↑-jelpálya általi gátlása áll.

Összességében adataink egy potenciálisan igen hatékony *anti-acne* szerként láttatják a CBD-t, ami valódi „többcélpontú polifarmakonként" egyszerre lehet képes az *acne* patogenezisében lényeges valamennyi kulcsmozzanat kedvező befolyásolására. Az a tény, hogy a CBD biztonságosságát már számos tanulmány, illetve a klinikai gyakorlat is igazolta, különösen annak fényében teszi vonzóvá ezt a molekulát, ha tekintetbe vesszük a jelenleg elérhető legsokoldalúbb *anti-acne* szer, az izotretinoin jelentős potenciális mellékhatásprofilját. Mindezen irodalmi adatok a most prezentált eredményekkel együtt egy költséghatékony és vélhetőleg jól tolerálható, ám mégis rendkívül hatékony CBD-alapú *acne* terápia lehetőségére mutatnak rá.

Bár a CBD farmakokinetikája az emberi testben nem minden részletében ismert, joggal remélhető, hogy ez az erősen lipofil molekula a zsírokban gazdag FM-ekben relatíve magas, terápiás szempontból is releváns koncentrációt érjen el akár szisztémás alkalmazást követően is. Másfelől azonban a szisztémás alkalmazásnál sokkal ígéretesebbnek tűnik a topikális beviteli mód. Ez már csak azért is igen izgalmas lehetőségnek ígérkezik, mert ebben az esetben a CBD nagyfokú lipofilitása miatt elsődlegesen a transzfollikuláris úton penetrál a bőr mélyebb rétegei felé, és így jó eséllyel éppen a megcélozni kívánt FM-ekben halmozódik fel.

Bár a „tiszta” CBD szeborrea, illetve *acne* ellenes hatékonyságát eleddig senki sem vizsgálta megfelelően kontrollált klinikai kísérletekben, egy közelmúltban megjelent cikk mégis a CBD klinikai hatásosságára enged következtetni. Ebben a közleményben a pakisztáni szerzőpáros egy 12 hetes, egyesvak, placebo-kontrollált klinikai kísérletről számol be, amelyben 3%-os kendermagkivonatot, illetve placebót tartalmazó krémmel kezelték szeborreás betegek egyik és másik arcfelét („osztott arc” vizsgálat), ahol a kendermagkivonat szignifikánsan csökkentette a faggyútermelést és a bőrpírt a vivőanyaggal kezelt arcfélhez képest.

Összegezve, fentebb tárgyalt eredményeink alapján a CBD (különösen a hozzáférhető irodalmi adatok fényében, lásd fentebb) rendkívül ígéretes, hatékony és kedvező mellékhatásprofilú *anti-acne* szer lehet, így mindenképpen indokoltnak tűnik mihamarabb megfelelően kontrollált klinikai tanulmányokban megvizsgálni, hogy *in vivo* valóban olyan hatékony-e, amilyennek eredményeink és az irodalmi adatok alapján ígérkezik. A kísérleteink során feltárt, ezt megelőzően teljesen ismeretlen szebosztatikus (TRPV4→Ca^{2+}↑→ERK1/2 MAPK↓ és NRIP1↓), valamint gyulladásgátló (A_{2A}→cAMP↑→TRIB3↑→P65-NF-κB↓) jelátviteli útvonalak pedig további, célzott, nagy hatékonyságú és kedvező mellékhatásprofilú *anti-acne* szerek fejlesztése előtt nyithatnak kaput.

ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen kísérleteink során egy nem-pszichotróp fitokannabinoid, a CBD, valamint egy, a gyulladásgátló eCB-tónus szabályozásában kulcsfontosságú enzim, a FAAH biológiai szerepét vizsgáltuk meg humán szebocitákon, epidermális keratinocitákon és NC/Tnd egereken.

Megállapítottuk, hogy a FAAH fehérje szintű expressziója és aktivitása fokozódik TLR2 aktivációra mind immortalizált, mind pedig primer humán epidermális keratinociták esetén, így a gyulladásgátló eCB-tónus FAAH-mediált csökkentése elméletileg hozzájárulhat a TLR2 által kiváltott gyulladásos folyamatok kialakulásához. Különféle FAAH-inhibitorok segítségével igazoltuk továbbá, hogy a következményesen kialakuló fokozott eCB-tónus jelentős CB_1 és CB_2 receptor-mediált anti-inflammatórikus hatással bír *in vitro* humán keratinocitákon és *in vivo* NC/Tnd egereken is, ami alapján felvetődik a FAAH-inhibitorok terápiás alkalmazásának lehetősége a bőr különböző gyulladásos folyamatainak jövőbeli kezelésében.

CBD-lal végzett kísérleteink során kimutattuk, hogy ez a neurológiai klinikai gyakorlatban már régebb óta mellékhatásmentesen alkalmazott szer jelentős, komplex *anti-acne* aktivitást mutat (kombinált liposztatikus, anti-proliferatív és gyulladásgátló hatások), melyek hátterében általunk azonosított szebosztatikus (TRPV4→Ca^{2+}↑→NRIP1↓ és ERK1/2 MAPK↓), valamint gyulladásgátló (A_{2A}→cAMP↑→TRIB3↑→P65-NF-κB↓) útvonalak aktiválása állt.

Minthogy irodalmi adatok alapján a CBD jó eséllyel az *acne* patogenezisében fontos további elemekre (comedo képződés, *P. acnes* kolonizáció) is kedvező hatást gyakorolhat, eredményeink felvetik ezen FK jövőbeli terápiás felhasználásának lehetőségét az *acne* kezelésében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok mindenekelőtt a DE ÁOK Élettani Intézet jelenlegi és volt igazgatójának **Prof. Dr. Csernoch László** és **Prof. Dr. Kovács László** professzor uraknak, akik előbb TDK, majd PhD hallgató koromban biztosították a munkámhoz szükséges feltételeket.

Köszönöm témavezetőmnek **Prof. Dr. Bíró Tamás** egyetemi tanárnak az évek során nyújtott szakmai és emberi segítséget, a belém fektetett bizalmat és azt, hogy számomra mind szakmai, mind emberi szempontból fontos példát adott, és nagyon sokat tanulhattam tőle.

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 legközvetlenebb munkatársaim, **Dr. Tóth István Balázs**, **Dr. Mihály Johanna**, **Dr. Szöllősi Attila Gábor**, **Dr. Dobrosi Nóra**, **Dr. Czifra Gabriella**, **Dr. Géczy Tamás**, **Dr. Borbíró István**, **Ambrus Lídia, Angyal Ágnes, Herczeg-Lisztes Erika, Zákány Nóra, Balogh Norbert, Dr. Szabó Imre Lőrinc, Dr. Vasas Nikolett, Markovics Arnold, Szabó-Papp Judit, Uzonyi Renáta, Hollósi Erika, Furin Lilla, Bánhalminé Szilágyi Szilvia, Galicz Anita** és „pótanyánk", **Dr. Varga Attiláné „Ibcsike"** segítségéért vagyok múlhatatlanul hálás.

Köszönöm kollaborációs partnereink (**Prof. Dr. Ralf Paus**, **Prof. Dr. Mauro Picardo**, **Prof. Dr. Christoph Abels**, **Dr. Michael Soeberdt**, **Prof. Dr. Christos C. Zouboulis** és még sokan mások) felbecsülhetetlen értékű segítségét.

Az évek során az a szerencse ért, hogy számos kimagaslóan tehetséges, odaadó, a tudomány iránt elkötelezett és szorgalmas TDK hallgató társtémavezetője lehettem. Hálásan köszönöm **Dr. Aranyász Andrea**, **Dr. Bereczki Dániel**, **Dr. Czakó Nóra**, **Daubner Roland**, **Fazekas Eszter**, **Dr. Paragh Lilla**, **Sós Katalin Eszter**, **Dr. Szabó Pálma Tímea** és **Takács Erika** munkáját; mindig nagy örömmel gondolok az együtt töltött időre.

Nehéz szavakba önteni azt a hálát, amit szüleim és testvérem iránt érzek, hiszen nélkülük nem jutottam volna el eddig a pontig. Még náluk is nagyobb köszönet illeti azonban feleségemet, aki hősiesen tűrte az olykor hetven-nyolcvan órás munkaheteket, a sok távollétet, stresszt és fáradtságot a „jó, csak még be kell szaladnom egy kicsit az Élettanra" típusú komplikációkat, és olyan szeretettel vett körül, ami mindig feltöltött energiával az új kihívások előtt.

Soli Deo Gloria. *Köszönöm!*

*A kutatás a **Richter Gedeon Talentum Alapítvány**, valamint a **Nemzeti Kiválóság Program Jedlik Ányos Doktorjelölti Ösztöndíj** (TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001) támogatásával, a „Lendület" program keretében (LP2011-003/2015) valósult meg.*

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR

Nyilvántartási szám: DEENK/274/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Oláh Attila
Neptun kód: ZGIB8K
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10034478

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Oláh, A.**, Ambrus, L., Nicolussi, S., Gertsch, J., Tubak, V., Kemény, L., Soeberdt, M., Abels, C., Bíró, T.: Inhibition of fatty acid amide hydrolase exerts cutaneous anti-inflammatory effects both in vitro and in vivo.
Exp. Dermatol. "Accepted by Publisher" (2016)
IF:3.762 (2014)

2. **Oláh, A.**, Tóth, I.B., Borbíró, I., Sugawara, K., Szöllősi, A.G., Czifra, G., Pál, B., Ambrus, L., Kloepper, J., Camera, E., Ludovici, M., Picardo, M., Voets, T., Zouboulis, C.C., Paus, R., Bíró, T.: Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes.
J. Clin. Invest. 124 (9), 3713-3724, 2014.
DOI: http://dx.doi.org/10.1172/JCI64628
IF:13.215

További Közlemények

3. Ambrus, L., **Oláh, A.**, Oláh, T., Balla, G., Saleem, M.A., Orosz, P., Zsuga, J., Bíró, K., Csernoch, L., Bíró, T., Szabó, T.: Inhibition of TRPC6 by protein kinase C isoforms in cultured human podocytes.
J. Cell. Mol. Med. 19 (12), 2771-2779, 2015.
DOI: http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12660
IF:4.014 (2014)

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ¤ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ¤ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu ¤ Honlap: www.lib.unideb.hu

4. Kovács, D., Lovászi, M., Póliska, S., **Oláh, A.**, Bíró, T., Veres, I., Zouboulis, C.C., Ståhle, M., Rühl, R., Remenyik, É., Törőcsik, D.: Sebocytes differentially express and secrete adipokines.
Exp. Dermatol. Epub ahead of print (2015)
DOI: http://dx.doi.org/10.1111/exd.12879.
IF:3.762 (2014)

5. Tóth, I.B., **Oláh, A.**, Szöllősi, A.G., Bíró, T.: TRP channels in the skin.
Br. J. Pharmacol. 171 (10), 2568-2581, 2014.
DOI: http://dx.doi.org/10.1111/bph.12569
IF:4.842

6. Szöllősi, A.G., **Oláh, A.**, Tóth, I.B., Papp, F., Czifra, G., Panyi, G., Bíró, T.: Transient receptor potential vanilloid-2 mediates the effects of transient heat shock on endocytosis of human monocyte-derived dendritic cells.
FEBS Lett. 587 (9), 1440-1445, 2013.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.03.027
IF:3.341

7. **Oláh, A.**, Szöllősi, A.G., Bíró, T.: The channel physiology of the skin.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 163, 65-131, 2012.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007%2F112_2012_7
IF:1

8. Géczy, T., **Oláh, A.**, Tóth, I.B., Czifra, G., Szöllősi, A.G., Szabó, T., Zouboulis, C.C., Paus, R., Bíró, T.: Protein Kinase C Isoforms Have Differential Roles in the Regulation of Human Sebocyte Biology.
J. Invest. Dermatol. 132 (8), 1988-1997, 2012.
DOI: http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.94
IF:6.193

9. Tóth, I.B., **Oláh, A.**, Szöllősi, A.G., Czifra, G., Bíró, T.: "Sebocytes' makeup": Novel mechanisms and concepts in the physiology of the human sebaceous glands.
Pflugers Arch. 461 (6), 593-606, 2011.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00424-011-0941-6
IF:4.463

10. Tóth, I.B., Dobrosi, N., Dajnoki, A., Czifra, G., **Oláh, A.**, Szöllősi, A.G., Juhász, I., Sugawara, K., Paus, R., Biró, T.: Endocannabinoids Modulate Human Epidermal Keratinocyte Proliferation and Survival via the Sequential Engagement of Cannabinoid Receptor-1 and Transient Receptor Potential Vanilloid-1.
J. Invest. Dermatol. 131 (5), 1095-1104, 2011.
DOI: http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.421
IF:6.314

11. Borbiró, I., Lisztes, E., Tóth, I.B., Czifra, G., **Oláh, A.**, Szöllősi, A.G., Szentandrássy, N., Nánási, P.P., Paus, R., Kovács, L., Bíró, T.: Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth.
J. Invest. Dermatol. 131 (8), 1605-1614, 2011.
DOI: http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.122
IF:6.314

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 57,22
A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 16,977

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, 2016.01.06.

DEBRECENI EGYETEM KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR