

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A faggyúsejtek által termelt lipidek és fehérjék szerepe a dermális makrofágok és T-sejtek differenciálódásában, polarizációjában és funkciójában

Lovászi Marianna

Témavezető: Dr. Törőcsik Dániel



DEBRECENI EGYETEM
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2018

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A faggyúsejtek által termelt lipidek és fehérjék szerepe a dermális makrofágok és T-sejtek differenciálódásában, polarizációjában és funkciójában

Lovászi Marianna

Témavezető: Dr. Törőcsik Dániel



DEBRECENI EGYETEM
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2018

A faggyúsejtek által termelt lipidek és fehérjék szerepe a dermális makrofágok és T-sejtek differenciálódásában, polarizációjában és funkciójában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az *Egészségtudományok* tudományágban

Írta: **Lovászi Marianna**, okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok Doktori Iskolája (Megelőző Orvostan és Népegészségtan Programja) keretében

Témavezető: Dr. Törőcsik Dániel, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
tagok: Dr. Németh István Balázs, PhD
Dr. Széles Lajos, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem NK, Megelőző Orvostani Intézet,
Tárgyaló
2018. április 25. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Benkő Szilvia, PhD
Dr. Csoma Zsanett Renáta, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
tagok: Dr. Benkő Szilvia, PhD
Dr. Csoma Zsanett Renáta, PhD

Dr. Németh István Balázs, PhD
Dr. Széles Lajos, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme, 2018. április 25. 13 óra

1. BEVEZETÉS

A dermatológiában hosszú időn keresztül széles körben elfogadott nézet volt, hogy a faggyúmirigyek az emberi bőr atavisztikus maradványai, melyek csak az emlősökben töltenek be fontos szerepet. Ez a koncepció vezethetett oda, hogy a humán faggyúbiológiát évekig mellőzték a bőrgyógyászati kutatásokban. Ugyanakkor az utóbbi 25 évben olyan sejtvonalak létrehozásával, mint például az SZ95, a SEB-1 és a Seb-E6E7, valamint új molekuláris biológiai technikák bevezetésével, számos új jelátviteli útvonalat, transzkripciós faktort és enzimatikus molekulát sikerült azonosítani a szebocitákban. Bár a faggyúmirigyek elsődleges funkciójának továbbra is a bőr lipid-gát kialakításában szerepet játszó faggyútermelés tekinthető, azonban egyre több adat utal arra, hogy a faggyúmirigyek szerepet játszhatnak a különböző (pato)fiziológias folyamatokban, mint például az ultraibolya (UV) sugárzás által kiváltott bőr öregedés vagy akár a specifikus immunválasz.

Munkánk során ezért elsősorban a faggyúmirigyek gyulladásos folyamatokban betöltött szerepét és az ezek mögött álló mechanizmusokat vizsgáltuk, különös tekintettel az immunrendszer különböző sejtjeivel lehetségesen fellépő kölcsönhatásokra.

1.1 A faggyúmirigyek szerepe

A faggyúmirigyek az egész testfelületet beborítják a tenyér és a talp kivételével. Elhelyezkedésük a legtöbb esetben átfed a szőrrel borított területekkel, de kivételes esetekben, mint például a szemhéjon, a mellbimbókon és a nemi szervek környékén a szőrszállaktól függetlenül is jelen vannak. A faggyúmirigyek a szőrtüszökhöz kapcsolatosan a szőrmerevítő izommal kiegészülve alkotják a piloszebáceus egységet. A humán faggyúmirigyek elsődleges szerepének a faggyú termelése és kiválasztása tekinthető, amely hozzájárul az egészséges bőr lipid-gát kialakításához. Ezen felül az állatvilágban a faggyúmirigyek felelnek a bőr vízhatlanságának kialakításáért és a bőrfelszín síkosításáért, továbbá az apokrin mirigyekkel együtt szintén fontos szerepet játszanak a termoregulációban. Nem utolsósorban a faggyú védelmet nyújt számos környezeti veszélyforrás, mint például az UV sugárzás ellen és antimikrobiális tulajdonsága révén különböző mikrobák ellen is.

1.2 A faggyúmirigyek endokrin szabályozása

A szebociták proliferációját, differenciálódását, valamint faggyútermelését összetett endokrin folyamatok szabályozzák, amelyek közül a legfontosabb változások a pubertás során következnek be. Azonban a faggyúsejtek nem csak reagálni képesek a hormonális változásokra, hanem saját maguk is képesek többek között androgén, ösztrogén,

kortikotropin-felszabadító hormon (CRH), transz retinsav (ATRA), eikozanoidok, kortizol és D3 vitamin termelésére. Míg az androgénekről ismert, hogy fokozzák a faggyúmirigy proliferációját, differenciálódását és a szébumtermelést, addig az ösztrogének, a kortizol és az ATRA ellentétes hatást fejtenek ki: csökkentik a proliferáció és differenciáció mértékét, továbbá a lipidfelhalmozódást is mérséklék. Az androgénekhez hasonlóan a CRH is serkenti a szebocita proliferációt és közvetlenül fokozza a lipidszintézist. Ezeken felül a faggyúsejtek termelik a melanokortin receptorok (MC-R) ligandját, az α -melanocita stimuláló hormont (α -MSH) is, melyről kimutatták, hogy közvetlenül szabályozza a gyulladáscitokinek termelését szebocitákban.

A neuropeptidok szintén jelen vannak a faggyúmirigyekben, szerepük lehet a stressz okozta akne kialakulásában. A neuropeptidok közül a P anyag (SP) jelentős szerepet játszik a faggyúsejtek méretének és a termelt lipidcseppek mennyiségének befolyásolásában, ami arra utal, hogy az SP egyaránt elősegíti a szebocita proliferációt és differenciálódást.

Az étrend is fontos szerepet játszik a faggyútermelés szabályzásában. A faggyúmirigyekben már korábban azonosították inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF-1) receptorát (IGF-1R) és az is jól ismert, hogy a szénhidrátban gazdag étrend növeli az IGF-1 szintjét. Az emelkedett IGF-1 szint képes aktiválni a foszfatidil-inozitol 3-kináz / Akt / Forkhead box O1 (PI3K / Akt / FoxO1) útvonalat, felvetve, hogy a FoxO1-nek kulcsfontosságú szerepe lehet az emelkedett IGF-1 és inzulin szint által kiváltott szébumtermelés és gyulladáscitokinek kialakításában.

Korábbi kutatásaink során kimutattuk, hogy a leptin, a "jóllakottság" érzetének hormonja, képes kiváltani gyulladáscitokinek (pl. interleukin (IL) -6 és a CXCL-8) termelését, továbbá befolyásolja a lipogenezist a triglicerid (TG) szint emelésével, valamint megemeli az egyszerűen- (MUFA) illetve többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) arányát és nem utolsósorban csökkenti az antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező E-vitamin szintjét is.

A peroxisóma proliferátor aktivált receptorok (PPAR) a nukleáris hormon receptorok (NHR) családjához tartoznak, amelyek olyan transzkripciós faktorok, melyek állandó jelleggel vagy átmenetileg a sejtmagban helyezkednek el. A faggyúmirigyekben leírták a PPAR-ok mindhárom izotípusát, azonban a PPAR γ -nak különösen nagy szerep jut, mivel a szebociták apoptózisának gátlása révén megakadályozza a holokrin szekréciót, ami összességében csökkent faggyútermeléshez vezet.

A retinoidok olyan A-vitamin származékok, amelyeknek használatával jelentős javulást lehet elérni az aknés betegek kezelésében. A retinoidok célreceptorai a retinoid X (RXR) és retinsav (RAR) receptorok, amelyek mindegyike kifejeződik a faggyúmirigyekben. Míg az

RXR-nek a sejtek differenciálódásának befolyásolásában van szerepe, addig a RAR a sejtosztódást szabályozza.

Az NHR család tagjai a „liver X” receptorok is (LXR, α és β izoformák), melyek döntő szerepet játszanak a sejtek koleszterin (CH) és lipid anyagcseréjében. Szintén az LXR-ek szabályozzák a különféle ABC transzportereket, a zsírok metabolizáló enzimeit és más transzkripciós faktorokat, például a SREBP-1c-t.

1.3 A szébum összetétele és termelése

A sebociták érését egy sejt típus specifikus sejthalál követi, amely a faggyú holokrin szekrécióját eredményezi. A humán szébum sejttermeléséből és neutrális lipidekből álló keverék, amely megközelítőleg a következő módon épül fel: TG-k és zsírsavak [FA (57,5%)], viaszészterek (26%), szkvalének [SQ (12%)], koleszterin-észterek (3%) és CH (1,5%). Az emberi faggyú összetétele nagyban különbözik attól, amit az emlősállatokban megfigyelhetünk, az SQ, a szappansav és a szebalénsav kizárólag a humán szébumra jellemzők. Kiemelkedő lubrikáns és penetrációs hatékonyságának köszönhetően az SQ képes az UV sugárzás által kiváltott reaktív oxigénradikálok képződésének semlegesítésére a bőrben. Másrészt, a peroxidált SQ-k komedogének, továbbá részt vesznek más patológiás bőrelváltozások kialakításában is.

A faggyúsejtek képesek a véráramban keringő lipideket felvenni és acetát csoportok beépítésével meghosszabbítani a szénláncokat ezzel *de novo* poláris lipideket és TG-eket előállítva. A hosszú láncú zsírsavak (LCFA) a sebocitákra egyedien jellemző viaszészterek közvetlen elővegyületei, melyek felvételéért a sejtekben erősen kifejeződő zsírsav transzport fehérje 4 (FATP4) felel. A diglicerid-acil-transzferáz (DGAT) a faggyú TG szintézisben részt vevő fő enzim, a sztearil-CoA deszaturáz (SCD) pedig fontos szerepet játszik a telítetlen FA-k szintézisében. Az SCD kettős kötést kialakítására képes a sztearinsav [STA (18: 0)] 9. és 10. szénatomja között, ezáltal olajsavat [OA (18: 1 Δ 9)] állít elő. Az OA a szébum TG-k egyik fő omega-9 zsírsavja, erős antibakteriális és gyulladáscsökkentő hatásokat fejt ki, ezzel segítve a bőr védelmét. A linolsav [LA (18: 2, Δ 9,12)], egy omega-6 PUFA, és az α -linolénsav (18: 3, Δ 9,12,15), egy omega-3 PUFA az esszenciális zsírsavak közé tartoznak, tehát a sebociták nem képesek őket termelni, azonban a véráramból szintén hasznosulnak.

A zsírsav-deszaturáz 2 (FADS2) a palmitinsavat [PA (C16: 0)] szappansavvá (C16: 1 Δ 6) képes alakítani, amely szintén erős antibakteriális és gombaellenes hatással bír. A faggyúsejtek a szappansav szénlánc-hosszabbításával és további deszaturálás révén egy másik egyedi faggyúmirigy FA-t, szebaleinsavat (18: 2 Δ 5, 8) termelnek.

1.4 Megváltozott szébum-összetétel a különböző bőrbetegségekben

A különböző bőrbetegségekben megfigyelték a faggyú összetételének és mennyiségének változásait, amelyek nemcsak betegségjelzők, hanem jelentős szerepet játszanak a betegség lefolyásában is.

1.4.1 Akne

Az akne elsősorban a serdülők 60-80%-át érinti. Mind genetikai, mind környezeti tényezők hozzájárulnak kialakulásához, azonban a háttérben meghúzódó pontos mechanizmusokat még nem azonosították. Az utóbbi években számos tanulmány kimutatta, hogy az emelkedett faggyútermelés mellett az aknés betegek esetén jelentősen megváltozik a faggyú összetétele is. Az endogén deszaturázok, peroxidázok, valamint a bakteriális eredetű lipázok és foszfatázok következtében a telített és telítetlen FA-k aránya megváltozik, különösen a C16: 1 Δ 6 / C16: 0 lipid arány növekedése figyelhető meg, emellett a szébum LA tartalma is lecsökken. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy az FA-k deszaturálása az akne kialakulásához vezethet.

1.4.2 Szeborrheás dermatitisz

A szeborrheás dermatitisz egy olyan krónikus bőrgyulladás, melynek tünetei, mint például a bőrpír, a viszketés és a hámlás elsősorban a fejbőrön és az arcon jelennek meg. A szeborrheás dermatitisz tekintetében a vizsgálatok azt mutatják, hogy a *Malassezia* gombanemzetség által termelt lipázok és foszfatázok hidrolizálják a faggyú lipideket, csökkentik a TG-k szintjét és a szabad zsírsavak (FFA) szintjének növelésével váltják ki a jellegzetes bőrirritációt.

1.4.3 Rosacea

A rosacea krónikus gyulladáshoz vezető bőrbetegség, amely jellemzően az orcákra, a homlokra, az állra és az orr területére terjed ki, rendszerint vörösséget, duzzanatot és kitágult ereket eredményez. Annak ellenére, hogy a rosacea a bőr faggyúmirigy-gazdag területein fordul elő, a faggyú kiválasztás mennyisége érdekes módon nem változik a betegeknél az egészséges kontrollokhoz képest. Azonban a faggyú összetételében jelentős változások figyelhetőek meg. Az érintett személyeknél magas mirisztinsav (C14: 0) szinteket mértek, továbbá a telített LCFA-k csökkenő aránya jellemző. Ezek a lipidek fontos szerepet játszanak a bőrbarrier integritásának fenntartásában, ezért feltételezhető, hogy a megváltozott faggyú FA profil hozzájárul a rosaceára jellemző rendellenes bőrbarrier kialakulásához.

1.4.4 Psoriasis

A psoriasis egy krónikus gyulladáshoz vezető bőrbetegség, melyet hiperproliferáló „bőrpikkelyek” jellemeznek, ami súlyosan befolyásolja az életminőséget. A pikkelysömörös elváltozásokat

általában a faggyúmirigy-atrófia különböző fokai jellemzik, azonban a faggyúmirigyek mérete és a teljes Psoriasis Area Severity Index (PASI), illetve az erythema és a gyulladáso infiltráció súlyossága között nem találtak összefüggést. A faggyúmirigy-atrófia ellenére a faggyútermelés mennyisége nem változik jelentősen, azonban a pikkelysömörös betegek epidermiszében a foszfolipidek, a triacilgliceridek és a CH szintjének növekedése figyelhető meg, ami összefüggést mutat a pikkelysömör súlyosságával.

1.4.5 Atópiás dermatitisz (AD)

Az AD krónikus gyulladáso bőrelváltozás, amely gyakran a korai gyermekkorban kezdődik, száraz, vörös és viszkető bőrt eredményez. Bár az AD-t főleg a keratinocitákban termelődő rendellenes ceramidok jellemzik, ezen felül azonban a betegek bőrében súlyosan lecsökken a faggyútermelés, ami hozzájárul a bőr hidratációjának csökkenéséhez. Mivel a szébumlipidek aránya lecsökken az epidermális lipidekhez (pl. CH) képest, ezért a megváltozott faggyúmirigytermelés és a bőrbarrier hibás működése közötti kapcsolat valószínűleg hozzájárul a betegség kialakulásához, bár a pontos mechanizmusok még nem tisztázottak.

1.5 Terápiás szempontok a faggyúösszetétel szabályzásában

A különböző bőrbetegségekben megfigyelt megváltozott faggyúösszetétel felveti a faggyúműködés szabályozásának lehetőségét, mellyel terápiás megoldásokat lehetne kialakítani.

Új vegyületeket alkalmazhatunk az akne topikális kezelésében, például hosszú szénláncú PUFA-kat, amelyek antimikrobiális és gyulladáscsökkentő hatásuk révén kiválthatnák az antibiotikus kezelést a *P. acnes* és *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) fertőzések esetén. A PA-t, OA-t és a laurinsavat már korábban javasolták is az antibiotikum kezelés alternatívájaként *Acne vulgarisban*. Ezenfelül jelenleg is folyamatban vannak olyan klinikai vizsgálatok, ahol szebocita specifikus PPAR α agonistákat és PPAR γ antagonistákat fejlesztenek, amelyek előnyösen csökkenthetik a faggyútermelést és a gyulladást akne betegekben.

A lipidtermelés szabályozása nemcsak az aknebetegek számára lehet előnyös, ahol a faggyú túltermelése és összetételének megváltozása jelenti a fő problémát. Esetlegesen az AD betegeknél megfigyelt súlyos bőrszárazság is orvosolható az androgén vagy PPAR receptorok stimulálásával, ezáltal a faggyú normális összetételének helyreállításával. Továbbá az LXR-k szintetikus ligandokkal történő aktiválása szintén terápiás jelentőséggel bírhat, mivel növelheti a lipidtermelést és gyulladáscsökkentő hatással párosul.

Olyan újonnan vizsgált vegyületek, mint például az endokannabinoidok és kébbe kerültek a faggyúmirigyekkel kapcsolatos betegségek kezelésében. Nemrégiben Dobrosi és mtsai. leírták, hogy a szebociták expresszálják a kannabinoid receptor-2-öt, az arachidonoil-etanolamid/anandamidot, illetve a 2-arachidonoil-glicerolt, utóbbi kettőről igazolták, hogy fokozzák a faggyútermelést és apoptózist okoznak. Az endokannabinoidok általánosságban megemelik a lipidszintézisben részt vevő gének expresszióját, például a PPAR transzkripciós faktorokat, így a kannabinoid receptor-2 antagonisták vagy agonisták alkalmazhatók a faggyúmirigy rendellenességek kezelésében.

1.6 A faggyúmirigyekben lejátszódó gyulladási folyamatok

Bár a szebociták képesek megváltoztatni a faggyútermelésüket különböző gyulladási ingerek hatására, azonban az eddigi kutatások elsősorban az általuk termelt fehérjék gyulladási hálózatban betöltött szerepének azonosítására összpontosítottak. A legfrissebb eredmények szerint, a szebociták, hasonlóan az immun-kompetens sejtekhez, képesek *in vivo* és *in vitro* citokinek és kemokinek széles repertoárját termelni, mint például az IL-6, CXCL-8, IL-1 α , IL- β és a tumor nekrosis faktor (TNF) - α .

Ezenkívül a szebociták képesek különböző adipokinek, például adiponektin, leptin, serpin E1, rezisztin és viszfatin termelésére, rávilágítva arra, hogy az adipocitákhoz hasonlóan, a faggyúmirigyek is kapcsolatot teremthetnek a gyulladás és a lipidanyagcsere között.

A fehérjetermelés mellett a gyulladási folyamatokat lipid mediátorok jelenléte is jellemzi, mint pl. a prosztaglandinok (PG) és leukotriének (LT), amelyek az arachidonsav származékai, átalakításukért a ciklooxygenáz (COX) és lipoxigenáz (LOX) enzimek felelnek. A PG-k és az LT-k mindegyike meghatározó szerepet játszik a szebocita differenciálódás és lipogenezis terén, fiziológiás és patológiás körülmények között egyaránt.

1.7 A szébumlipidek immunfunkciói

A szébumlipidek, az epidermális eredetű lipidekkel együtt, fontos szerepet játszanak a lipid barrier integritásának fenntartásában, ezáltal hozzájárulva a szervezet első védelmi vonalához. Az egészséges emberi bőr felszínén egyedi mikrobiom található, melynek összetétele igen eltérő lehet a faggyútermelés és a hidratáltság mértékének függvényében, akár az arc különböző területein belül is. A normál mikrobiom részét képező egyik leginkább vizsgált anaerob baktérium a *P. acnes*, amely képes lipázok és peroxidázok révén metabolizálni a faggyúzsírokat. Ez a bakteriális lipázaktivitás nemcsak a bőr felületén vezet a szabad zsírsavak fokozott megjelenéséhez, hanem egyúttal megváltozott faggyúösszetételt is eredményez. Ezek a változások hiperkeratinizációhoz és krónikus gyulladásokhoz vezetnek,

amik tovább növelik a bőr kóros mikrobiális kolonizációját, ezáltal létrehozva az akne kialakulásának feltételeit. Mindezek mellett a szébum az antioxidánsok és antimikrobiális peptidok (katelicidin, pszoriazin, dermcidin és humán hBD-2) közvetítője is lehet. További vizsgálatok kimutatták, hogy a laurinsav és a szappansav szintén széles hatókörű antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkezik.

1.7. A bőrben elhelyezkedő immunsejtek

Prenatális csírasejt illetve főtális májeredetű rezidens makrofágok és dendritikus sejtek (DCk) megtalálhatók az epidermiszben (Langerhans sejtek, LC-k) és a dermiszben. Ezek a sejtek mind fenotípusukban, mind pedig funkciójukban jól elkülönülnek a csontvelő eredetű CD14⁺ monocitáktól és prekursor dendritikus sejtektől (pre-DC-k), amelyek a véráramban keringenek, ahonnan aktiváló stimulusok hatására az endotéliumon át a környező szövetekbe vándorolnak és differenciálódnak. Érdekes módon McGovern és mtsai. azt találták, hogy ezek a CD14⁺ sejtek a dermiszben gyors cserélődést mutatnak, a rezidens sejtekkel szemben, körülbelül 6 napig tartózkodnak a bőr dermális rétegében, majd apoptózis és fagocitózis révén elpusztulnak, helyüket a keringésből frissen érkező CD14⁺ sejtek veszik át. Az egyre újabb monocita/makrofág és DC sejtmarkerek felfedezésével folyamatosan új sejtpopulációkat azonosítanak, ezáltal a bőr mieloid sejtállománya nagyon heterogén, mindazonáltal a funkcióik jellemzésére szolgáló rendelkezésre álló kutatási módszerek igen korlátozottak.

1.7.1 Makrofágok és makrofág heterogenitás

Az immunrendszer legfontosabb fagocitái a makrofágok, felfogják és átalakítják a környezetükből érkező ingereket aktiválva a gyulladásos folyamatokat és az adaptív immunrendszert. Ezen összetett szerepek ellátása érdekében a makrofágok kiemelkedő morfológiai és funkcionális heterogenitást mutatnak mind az egészséges, mind a gyulladt bőrben, ezzel is mutatva az aktiválásuk mögött rejlő különböző ingerek fontosságát. Ezen ingerek alapján a széles körben elfogadott osztályozás a makrofágokat klasszikusan (M1) és alternatívan (M2) aktivált alcsoportokra különíti el. Míg az IL-4/IL-13 citokinek és különböző lipidek aktiválják az M2 makrofágokat, amelyek főként a szöveti integritás fenntartásáért, a sebgyógyulásért és a tumor mátrix kialakításáért felelnek, addig a klasszikusan aktivált makrofágok általában IFN- γ és/vagy TNF- α -val hatásra alakulnak ki, fő profiljuk pedig a gyulladásos citokinek termelése. Az M2 makrofágok klasszikus példái a *granuloma annulare* és *necrobiosis lipoidica* bőrbetegben kialakuló makrofágok, míg az M1 makrofágok a tuberculoid granulomákban vannak jelen. Egészséges körülmények között a humán dermális makrofágok jellemzően MHC-II, CD14 és XIII faktor A (FXIII-A) alegységeket

expresszálják, a DC-khez képest nagyobb fagocita funkcióval, ugyanakkor alacsonyabb T-sejt aktiváló képességgel rendelkeznek.

A tanulmányban használt makrofág markerek

A CD163 a hemoglobin-haptoglobin komplex nagy affinitású „scavenger” receptora. Jelentősége, hogy nemrégiben azonosították, mint a monocita/makrofág eredetű sejtek markerét.

A CD206, más néven mannoz receptor, egy C típusú lektin receptor, amely elsősorban makrofágok és éretlen DCk felületén jelenik meg. A receptor felismeri a terminális mannoz és az N-acetil-glükózamin részleteket, amelyek bizonyos mikroorganizmusok felületén találhatóak, így fontos szerepet játszik mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer működésében.

A CD209, más néven DC-SIGN, makrofágok és DCk felszínén jelen lévő C típusú lektin receptor. Makrofágok esetében a CD209 szintén felismeri a mannoz típusú szénhidrátokat, amelyek gyakran megtalálhatók a különböző kórokozókban, ezért a CD209 fontos szerepet játszik a fagocitózis aktiválásában.

A XIII faktor (FXIII) egy transzglutamináz, amely fontos tagja a véralvadási rendszernek, feladata a fibrin keresztkötése. A keringő FXIII két katalitikus alegységből (FXIII-A) és két hordozó alegységből (FXIII-B) áll, az alegységek közül az FXIII-A intracellulárisan megtalálható monocitákban/makrofágokban, ahol a génexpresszió szabályozásáért, valamint a sejtes funkciók, mint például a fagocitózis befolyásolásáért felel. A közelmúltban a FXIII-A-t az alternatív aktiváció markereként azonosították, és sikeresen alkalmazták a *granuloma annulare*-ban és *necrobiosis lipoidica*-ban található makrofágok kimutatására.

A lipid metabolizmus szerepe a makrofágok aktiválásában

A lipidmetabolizmus jelentőségét a makrofág aktivációban nemrégiben Ménégaut és mtsai. összegezték. Mind külső (táplálkozásból eredő), mind belső FA-források képesek befolyásolni a makrofágok polarizációját: az M2 polarizáció általában FA-oxidációval társul, míg az M1 polarizáció lipid termelő útvonalakhoz kapcsolódik. Számos tanulmány kiemelte a PPAR γ jelentőségét, amelyet oxidált FA-k vagy az IL-4 aktiválnak, és képes az M2 polarizációra kialakítására. A legújabb tanulmányok azt mutatják, hogy az FA-k szintézise közvetlenül hozzájárul az M1 makrofágok gyulladáshoz, azonban még nem tisztázott, hogy az M1 polarizációhoz szükség van-e az FA szintézis indukálására. Ezen felül, a telített szabad FA-k (FFA-k), mint például a PA, feltehetőleg kiválthatja a makrofágok metabolikus aktiválását a zsírszövetben. Egy másik tanulmányban Shi és mtsai. kimutatták, hogy az

adipociták által *in vivo* leadott FFA-k potenciálisan befolyásolják a makrofágok polarizációját. E megfigyelések alapján jogosan feltételezhetjük, hogy a faggyút alkotó lipidek szintén részt vehetnek a makrofágok polarizációjában.

1.7.2 DCk

A makrofágok mellett a bőr jól elkülönülő DC-populációkat is tartalmaz, melyeket egyedülálló morfológiájuk és a CD11c felszíni expressziója jellemez. A bőrben „járőröző” DC-k feladata, hogy a gyulladáshoz szükséges citokinek termelésével és antigének prezentálásával specifikus T-sejt választ alakítsanak ki. Elhelyezkedésüktől függően a bőrben lévő dendritikus sejtek két fő csoportra oszthatók: epidermális LC-k és csontvelő-eredetű dermális cDC-k, amelyek tovább osztályozhatók az 1-es típusú (cDC1) és a 2-es típusú (cDC2) alcsoportokba. A makrofágokhoz hasonlóan a DC-k is reagálnak az FA-k metabolizmusának változásaira. Érdekes módon az FA-k oxidációja olyan állapotot teremt, amelyben a DC-k tolerogénné válnak.

1.7.3 Helper T-sejt alcsoportok

A sejtes immunválaszt elsősorban a T-sejtek szabályozzák, érésük a csecsemőmirigyben zajlik. Azokat a T-sejteket, amelyek felszínükön a CD4 glikoproteint expresszálják, T-helper (Th) sejtekként tartjuk számon. A Th-sejtek a naiv CD4⁺ T-sejtekből differenciálódnak az egyedi citokin környezetnek megfelelően, amely révén aktivációjuk során speciális effektor funkciókat látnak el. A Th-sejteket először Th1 és Th2 alcsoportokba sorolták be az IFN- γ és az IL-4 citokinek jelenlététől függően, azonban a közelmúltban a Th család jelentősen kibővült Th9, Th17 és Th22 sejtekre is, amelyek szintén specifikus citokinprofillal rendelkeznek.

Mint ahogyan a makrofágok esetében is, a különböző Th-differenciálódási utakat meghatározó specifikus citokinek mellett, a lipidek is hozzájárulhatnak a Th polarizációhoz, például a transz-zsírsavak (TFA-k) igazoltan elősegítik a Th17 polarizációt.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az utóbbi két évtizedben rohamosan fejlődött a faggyúmirigy-kutatás; a szebocita sejt kultúra-modellek létrehozásával és új molekuláris technikák kifejlesztésével egyre több információ áll rendelkezésre a szebocita proliferáció, differenciálódás és működés tekintetében. Mindazonáltal a faggyúsejtek gyulladásos bőrbetegségek mediátoraként vagy akár iniciátoraként betöltött lehetséges szerepét még kételyek övezik. Továbbá eddig kevés tanulmány vizsgálta a szebociták legjellemzőbb tulajdonságát, nevezetesen a faggyútermelést és a faggyút alkotó lipidek lehetséges szerepét a különböző gyulladásos- és immunológiai folyamatok befolyásolásában. Kutatásunk során ezért célunk volt:

1. meghatározni, hogy a faggyút alkotó lipidek hozzájárulhatnak-e a dermális lipidtartalomhoz
2. megállapítani, hogy a szebociták képesek-e immunsejteket vonzani a gyulladásos bőrterületekre
3. megvizsgálni, hogy a szebociták hozzájárulhatnak-e a makrofágok differenciálódásához, polarizációjához és működéséhez az általuk kiválasztott lipidek és fehérjék révén
4. megvizsgálni a humán szebociták és a *P. acnes* közötti lehetséges kölcsönhatást homeosztatisz környezetben (szimbiózis), illetve gyulladásra adott válaszreakciók során, például az *Acne vulgarisban*
5. elemezni a szebociták és a T-sejtek közötti funkcionális kommunikációt.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Oil-Red-O festés

Az anonimizált fagyasztott bőr metszeteket 10 percig fixáltuk 4%-os paraformaldehidben (Sigma-Aldrich, Dorset, Nagy-Britannia). A mintákat 1 percig 100%-os propilén-glikolba (Amresco, Solon, OH, USA) helyeztük, majd desztillált vízzel mostuk. A metszeteket 7 percig, 0,7%-os Oil-Red-O (Sigma-Aldrich) oldattal festettük, majd 85%-os propilén-glikol oldattal mostuk. A sejtmagok festését metilén zölddel végeztük. Végül a tárgylemezeket „Quick Aqueous Mount Medium” alkalmazásával lefedtük (Bio Optica Milano, Olaszország).

3.2 Raman spektroszkópia

A Raman spektroszkópiai mérések kivitelezését és értékelését együttműködő partnereink, Dr. Gácsi Attila és Dr. Csányi Erzsébet, az SZTE Gyógyszer-technológiai Intézet munkatársai végezték. A bőr biopsziákat hasi rekonstrukciós műtétekből nyertük. Körülbelül 1 cm²-es bőrmintákat SQ, LA, OA, PA vagy STA zsírsavakkal kezeltünk 4 ml térfogatú Franz-diffúziós kamrákban fiziológias sóoldat (Biochrom, Berlin, Németország) alkalmazásával, hogy elkerüljük a bőr kiszáradását. A kezelés időtartama minden esetben 24 óra, a kezelt bőrterület pedig 66,5 mm² volt. A kezelt bőrterületekből fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket alumínium bevonatú tárgylemezekre helyeztünk. A minták Raman-spektrumát egy 532 nm-es diódás lézerrel felszerelt DXR Raman mikroszkóppal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vettük fel. A mérések értékelése az OMNIC Dispersive Raman 8.2 szoftver (Thermo Fisher Scientific) segítségével történt. Mintánként legalább 24 felvétel készült, a spektrális felbontás körülbelül 2 cm⁻¹, a spektrális ablak pedig 200 és 3200 cm⁻¹ között volt. A kezelt vagy kezeletlen minták összehasonlításakor az egyes zsírsavak egyedi spektrumát referenciaként használtuk fel.

3.3 Immunhisztokémia

3.3.1 CD163

Az immunhisztokémiai festéshez a Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottság jóváhagyásával, a Bőrgyógyászati Klinika Szövet-tani Laboratóriumából származó anonim, FFPE mintáit használtuk. A paraffin blokkokból készült metszeteket deparaffinizáltuk, rehidratáltuk, és 3% -os H₂O₂-ben 15 percig inkubáltuk az endogén peroxidázok gátlása végett. Az antigén feltárást Tris-EDTA pufferben (10 mM Tris Base, 1 mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9.0) végeztük, 120°C-on 25 percig és a nem specifikus kötőhelyek blokkolása PBS-ben oldott 5% borjú szérum albumin (BSA) oldatban történt 30 percig. A metszeteket CD163 elsődleges antitesttel (LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA) egy éjszakán át 4°C-

on inkubáltuk. SuperSensitive egylépcsős polimer-HRP-konjugált másodlagos antitestet (BioGenex, CA, USA) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. Negatív kontrollként a mintákat 2,5% BSA-PBS-ben inkubáltuk primer antitest nélkül. Az immunreakciót a Vector VIP Kit (Vector Laboratories Ltd, Cambridgeshire, UK) segítségével vizualizáltuk. A sejtmagokat metilén-zölddel festettük. A mikroszkópos felvételeket ImageJ szoftverrel elemeztük.

3.3.2 CD206, CD209 és XIII. Faktor A alegység (FXIII-A)

A fagyasztott metszeteket 10 percig jéghideg acetonnal fixáltuk, és 5% normál kecske szérummal (Dako, Glostrup, Dánia) blokkoltuk. A metszeteket FXIII-A antitesttel (Affinity Biologicals, Ancaster, Ontario, Kanada) 2 órán át, sötét nedves-kamrában, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A vizualizációt DyLight 488 másodlagos antitesttel (Vector Laboratories Ltd) értük el. A ko-expressziós vizsgálatokhoz monoklonális anti-humán CD antitesteket használtunk [CD206, CD209 (Abcam, Cambridge, UK), CD163 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)]. A normál lószérummal történő 10 perces blokkolást követően a második primer antitest specifikus kötődését DyLight 594 másodlagos antitest (Vector Laboratories Ltd) használatával tettük láthatóvá. A metszeteket PBS-ben mostuk és DAPI-t tartalmazó Vectashield médiummal (Vector Laboratories Ltd) fedtük. A felvételeket egy CCD IMAC kamerával (Sony, Tokió, Japán) és ISIS fluoreszcens képalkotó rendszerrel felszerelt Axioplan mikroszkóppal (Carl Zeiss, Oberkochen, Németország) készítettük (MetaSystems, Altlusheim, Németország).

3.3.3 IL-17 és CD4

A festéseket Dr. Natalie Garzorz-Stark, a müncheni ZAUM intézet munkatársa végezte. Az aknés betegek FFPE bőrbioptáit 25 percig 65°C-os szárító szekrénybe helyeztük, majd xilollal (2x10 perc), 100% izopropanollal (2x5 perc), 96% etanollal, 70% etanollal és dH₂O-val (1x5 perc) inkubáltuk. Az antigén feltárást citrát-pufferrel (pH 6) végeztük, blokkolásként 1 óráig 10%-os normál kecske és lószérumot (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) használtunk. A metszeteket primer ellenanyag-keverékkel vagy izotípus-kontrollokkal (IL-17, R&D Systems; CD4, Zytomed Systems) inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, majd éjszakán át 4°C-on. A vizualizáció másodlagos ellenanyag-keverék (Alexa Fluor 488, Life Technologies és NorthernLights 557, R&D Systems) segítségével történt. A szöveti autofluoreszcencia kiküszöböléséhez 0,1%-os Sudan Black (Sigma-Aldrich) festést alkalmaztunk. A sejtmagok festéséhez DAPI-t (Sigma-Aldrich) használtunk, végül a metszeteket VectaShield médiummal (Vector Laboratories Ltd) fedtük. A fluoreszcens

felvételeket egy Sense szoftverrel (Olympus, Tokió, Japán) felszerelt Olympus IX73 invertált fluoreszcens mikroszkóppal készítettük és ImageJ szoftverrel elemeztük.

3.4 Migrációs vizsgálat

A migrációs vizsgálatokat müncheni munkatársaink végezték. A monocitákat, neutrofil granulocitákat és T-sejteket egészséges donorok véreből izoláltuk CD14 és CD3 mágneses gyöngyök alkalmazásával (Miltenyi Biotech, Bécs, Ausztria) a gyártó protokollját követve. A sejteket 0,5% BSA-val (Amresco) kiegészített RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) médiumban vettük fel és számukat úgy állítottuk be, hogy az elérje a 2×10^6 sejt/ml koncentrációt. A migrációs vizsgálatokat 5 μm pórusú polikarbonát membránok (ChemoTx Disposable Chemotaxis System, NeuroProbe, Gaithersburg, MD, USA) segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint. A rekombináns CXCL-8 fehérje (PromoKine, Heidelberg, Németország) különböző koncentrációit (10 ng/ml, 50 ng/ml és 100 ng/ml) pozitív kontrollként alkalmaztuk. A sejteket 2 óra hosszat migráltattuk 37°C -on, 5% (v/v) CO_2 -t tartalmazó termosztátban, a migrált sejteket LSRFortessa (BD Biosciences New Jersey, NJ, USA) áramlási citométerrel vizsgáltuk. A migrált T-sejteket továbbá megfestettük CD4, CD8, CD56, CD45RO és CD45RA elleni antitestekkel. A CXCL-8 semlegesítéshez a felülúszót anti-CXCL-8 antitesttel (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) 1 óráig szobahőn inkubáltuk.

3.5 SZ95 szebocita sejtkultúra és kezelés

Az SZ95 immortalizált humán faggyúmirigy-sejtvonalat 37°C -on, 5% (v/v) CO_2 -t tartalmazó termosztátban, 10% FBS (Biowest, Rue de la Caille, Franciaország), 1 mM CaCl_2 (Sigma-Aldrich), 1% penicillin/sztreptomycin és 5 $\mu\text{g/ml}$ epidermális növekedési faktor (EGF) (Sigma-Aldrich) tartalmú Sebomed médiumban (Biochrom) tenyésztettük, amíg el nem érték a 80%-os konfluenciát. A felülúszó begyűjtését megelőzően a tápfolyadékot EGF mentes, 0,5% FBS-t és 1 mM CaCl_2 oldatot, illetve 1% penicillint/sztreptomocint opcionálisan tartalmazó Sebomed médiumra cseréltük. A 24 órás felülúszót összegyűjtöttük és 0,2 μm -es szűrővel (Sarstedt, Nümbrecht, Németország) történő szűrést követően kísérletekre használtuk. Az SZ95 szebocita felülúszó lipid mentesítéséhez Cleanascite lipid tisztító reagenst (Biotech Support Group, Monmouth Junction, NJ, USA) használtuk a gyártó utasításai szerint. Az etanol: DMSO (1:1) elegyében beoldott lipideket (SQ, LA, OA, PA és STA; Sigma-Aldrich) a tisztítást követően egyesével visszapótoltuk 150 μM -os koncentrációban.

A T-sejt- és DC tenyésztési kísérletekben az SZ95 szebocitákat rekombináns citokinekkal (50 ng/ml) vagy lipopoliszacharid/lipoteichoinsav-al (LPS/LTA) (1 $\mu\text{g/ml}$) vagy *P. acnes* 888-al

(50:1 arányban) 6 óráig kezeltük, majd intenzív mosást követően további 24 órán át tenyésztettük a szebocitákat Sebomed médiumban. Az így nyert SZ95 szebocita felülúszókat összegyűjtöttük és 0,2 µm-es szűrővel (Sarstedt) szűrtük, és kísérletekben való felhasználásig -20°C-on fagyasztva tároltuk.

3.6 *P. acnes* törzsek

A *P. acnes* 889 törzset 5% szarvasmarhavérrel, K1 vitaminnal és heminnel kiegészített Columbia agaron (Oxoid, Basingstoke, UK) anaerob körülmények között 37°C-on tenyésztettük (Ruskinn Concept 400 anaerob munkaállomás Pencoed, UK) a Debreceni Egyetem Mikrobiológiai Tanszékén. A baktériumok 72 órás tenyészetét 10^5 - 10^6 telepképző egység (CFU)/ml koncentrációban begyűjtöttük, majd PBS-ben (Lonza, Verviers, Belgium) mostuk, és 1 ml RPMI 1640 antibiotikum mentes médiumban vettük fel (Sigma-Aldrich).

3.7 Monocita izolálás és differenciáltatás

3.7.1 Makrofág differenciáltatás és tenyésztés

A monocitákat egészséges donorok véréből izoláltuk mágneses CD14 mikrogyöngyök (Miltenyi Biotech) alkalmazásával, a gyártó protokollját követve. Lyukanként 1×10^6 monocitát RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) tápfolyadékban 24 lyukú lemezre szélesztettünk, és 40% vagy 80% SZ95 szebocita felülúszóval kezeltük. Kontrollként Sebomed tápfolyadékot alkalmaztunk. A monocitákat SZ95 szebocita felülúszó vagy Sebomed táptalaj jelenlétében 5 napig 37°C-on 5% (v/v) CO₂-t tartalmazó termosztátban differenciáltattuk majd kísérletekre használtuk. A monociták további differenciálódásához és aktiválásához IL-4-t (20 ng/ml) IFN- γ -t (20 ng/ml) vagy *P. acnes* 888-t (1:50) használtunk. A bemutatott eredményeket a dózisfüggőség megerősítése után minden esetben 80% SZ95 szebocita felülúszó alkalmazásával kaptuk meg.

3.7.2 DC-k differenciáltatása és a kevert leukocita reakció

A kísérleteket Dr. Martina Mattiivel közreműködésével, a müncheni ZAUM intézetben végeztük el. 1×10^6 CD14⁺ monocitákat raktunk ki 24 lyukú lemezre, amely 500 µl RPMI 1640-t (Invitrogen) és 500 µl SZ95 szebocita felülúszót, valamint IL-4-t és GM-CSF-t (100-100 egység/ml) (PromoKine) tartalmazott. A sejteket 5 napig differenciáltattuk 37°C-on, 5% (v/v) CO₂-t tartalmazó termosztátban, majd az ötödik napon a DC-eket LPS-el (1 µg/ml, Invitrogen) kezeltük és 24 órán keresztül stimuláltuk. Az így kapott sejteket, kétszer mostuk PBS-sel, és egy 96 lyukú lemezen 1:10 arányban CD4⁺CD45RA⁺ vagy CD4⁺CD45RO⁺ T-sejtekhez adtuk. A CD4⁺CD45RO⁺ effektor T-sejtek felülúszóját a 3. napon összegyűjtöttük, a CD4⁺CD45RA⁺ naiv T-sejteket 6 napig tenyésztettük, majd ezt követően α CD3-al és α CD28-

al (0,75-0,75 µg/ml) (BD Biosciences) aktiváltuk, végül ezeket a felülúszókat is begyűjtöttük. A mintákat duplikátumokban vizsgáltuk.

3.8 Áramlási citometria

Az áramlási citometriás analízishez a makrofágokat összegyűjtöttük, PBS-sel (5 perc, 1500 fordulat/perc) mostuk és újraszuszpendáltuk a festő-pufferben [1% BSA-t tartalmazó PBS (Amresco)]. A sejteket monoklonális CD206, CD209 phycoerythrin (PE) konjugált antitestekkel (BD Biosciences) jelöltük 30 percig 4°C-on; PE konjugált IgG1κ-t (BD Biosciences) használtunk izotípus kontrollként. Az adatokat FACSCalibur (BD Biosciences) áramlási citométerrel gyűjtöttük és Flowing Software (Cell Imaging Core, Turku, Finnország) segítségével elemeztük.

3.9 Fagocitózis vizsgálata

A lipid mentes vagy teljes SZ95 felülúszó jelenlétében differenciáltatott makrofágokat FITC-el jelzett *P. acnes* 888-al inkubáltuk 2 órán át 37°C-on, hogy lehetővé vegyük a baktériumok bekebelezését. A fagocitózist jéghideg PBS-sel leállítottuk, és a sejteket 4% PFA-val fixáltuk. Az adatokat FACSCalibur (BD Biosciences) áramlási citométerrel gyűjtöttük és Flowing Software (Cell Imaging Core) segítségével elemeztük.

3.10 Western blot

A sejteket a *P. acnes* kezelést követő 12. órában összegyűjtöttük és feldolgoztuk a Western blot analízishez, a fehérjekoncentrációt a BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztuk meg. A fehérjéket anti-IL-1β (R & D Systems), anti-FXIII-A (Acris Antibodies, Herford, Németország) és anti-β-aktin (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) antitestekkel inkubáltuk. Az antigén-antitest komplexeket megfelelő HRP-konjugált másodlagos antitestekkel (Bio-Rad Laboratories) jelöltük és Immobilon Western HRP szubsztrát készlet segítségével (Millipore, Bedford, MA, USA) vizualizáltuk.

3.11. Kemokinek és citokinek kimutatása

3.11.1. Enzimakapcsolt immunszorbens teszt (ELISA)

Az SZ95 sebecita felülúszó, *P. acnes* 889 vagy megfelelő kontrollok jelenlétében tenyésztett makrofágok felülúszóit 12 óra, 24 óra vagy 36 óra elteltével gyűjtöttük össze, és -20°C-on tároltuk mindaddig, amíg CXCL-8, IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-17, IL-22, IFN-γ ELISA Duokitek (R&D Systems) illetve IL-4 ELISA kit (BD Biosciences) alkalmazásával a gyártó utasításait követve meghatároztuk a citokinek/kemokinek szintjét.

3.11.2 Bio-Plex vizsgálat

A kísérleteket a müncheni ZAUM intézet munkatársai végezték. A Bio-Plex analízist a Bio-Plex Pro humán citokin 27-Plex teszttel (Bio-Rad Laboratories) végeztük a gyártó utasításai szerint. A fehérjetartalom számszerűsítését a Bio-Plex 200 rendszerrel (Bio-Rad Laboratories) határoztuk meg.

3.12 A naiv és effektor CD4⁺ sejtek tisztítása és stimulálása

A kísérleteket Dr. Martina Mattiivel közreműködésével, a müncheni ZAUM intézetben végeztük el. A T-sejteket a mágneses CD4 T-sejt izolációs készlet (II) alkalmazásával tisztítottuk ki, majd pozitív szelekciót alkalmazva CD45RO vagy CD45RA mágneses gyöngyökkel (Miltenyi Biotech) különítettük el az effektor és naiv T-sejteket a gyártó utasításait követve. 2×10^5 sejtet 96 lyukú lemezre raktunk ki, melyeket α CD3-al és α CD28-al (0,75-0,75 μ g/ml) (BD Biosciences) aktiváltuk 100 μ l SZ95 szebocita felülúszó és 100 μ l RPMI 1640 (Invitrogen) jelenlétében 37°C-on, 5% (v/v) szén-dioxiddal dúsított termosztátban. A CD4⁺CD45RO⁺ effektor T-sejtek felülúszóját a 3. napon összegyűjtöttük. A CD4⁺CD45RA⁺ naiv T-sejteket 6 napig tenyésztettük, majd α CD3-al és α CD28-al (0,75-0,75 μ g/ml) (BD Biosciences) újra stimuláltuk a felülúszó gyűjtés előtt.

3.13. Semlegesítési kísérletek és fehérje eltávolítás

A kísérleteket a müncheni ZAUM intézet munkatársai végezték. Az SZ95 szebocita felülúszókat 1 óra hosszat inkubáltuk a következő antitestekkel: anti-IL-1 β (1 ng/ml), anti-TGF β (1 ng/ml), anti-IL-6 (0,8 ng/ml) vagy anti-CXCL-8 (0,8 μ g/ml) (R&D Systems). A fehérje emésztéshez az SZ95 szebocita felülúszókat 0,5 mg/ml proteináz K-val (Qiagen, Hilden, Németország) 56°C-on 30 percig kezeltük, majd 80°C-on inkubáltuk 10 percig az enzim inaktiválásához.

3.14 Statisztikai elemzés

A statisztikai kiértékelést a ZAUM intézettel közös projektünk esetében Dr. Alexander Konstantinow végezte. A további elemzéseket Janka Eszter Anna ellenőrizte. Minden kísérletet technikai duplikátumban és legalább biológiai triplikátumokban végeztünk. A statisztikai számolásokat Graph Pad Prism és Excel szoftverekkel segítségével végeztük. A statisztikai szignifikancia meghatározására páros Wilcoxon próbát vagy ANOVA-t, kiegészítésként pedig Tukey post-hoc tesztet használtunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A faggyúmirigyekben gazdag bőrnek magas a dermális lipidtartalma

Vizsgálataink kiindulási pontjaként Oil-Red-O festés alkalmazásával világosan bebizonyítottuk, hogy a faggyúmirigy-gazdag területekből származó mintákban a lipidfestés a dermiszben nagyobb intenzitású volt, mint a faggyúmirigyekben szegényebb régiókban. Érdekes módon ez az intenzitáskülönbség a szubepidermális részeken és a faggyúmirigyek körül volt a legjelentősebb. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a sebociták elsődleges szerepet játszhatnak a dermisz lipidekkel történő ellátásában.

4.2 A faggyút alkotó lipidek képesek áthatolni az epidermiszen és felhalmozódni a dermiszben

Ezt követően SQ, OA, PA, LA és STA zsírsavakkal egyedileg kezeltünk meg faggyúmirigyekben szegény bőrmintákat, majd Raman spektroszkópiát használva vizsgáltuk a lipidek penetrációjának és felhalmozódásának mértékét a dermiszben.

Eredményeink azt mutatták, hogy a vizsgált lipidek mindegyike áthatolt az epidermiszen, anélkül, hogy megbontaná annak szerkezetét. Amíg a PA-t nagy koncentrációban detektáltuk a dermisz teljes mélységében, addig az SQ és az LA csak a felsőbb régióban halmozódtak fel. Érdekes módon az STA kiemelkedő bedúsulást mutatott az intermedier dermális régióban, míg az OA csak mérsékelt mennyiségben volt jelen, viszont elszórt eloszlást mutatott a bőr teljes mélységében. Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a faggyú lipidek bonyolultabb élettani szereppel bírhatnak, mint csupán lokális hidratáló szerek.

4.3 Az alternatív módon aktivált makrofágok jellemző eloszlást mutatnak az epidermisz alatt és a faggyúmirigyek körül

Nagyobb számban előforduló makrofágokat már korábbi kutatások is leírták az epidermisz alatt és a faggyúmirigyek környékén. Vizsgálataink során megerősítettük ezeket a megfigyeléseket a faggyúmirigyek körüli, az epidermisz alatti és a "semleges területeken" található CD163⁺ dermális makrofágok számának összehasonlításával élettani körülmények között. Fontos megjegyezni, hogy a makrofágok jellegzetes eloszlást mutattak, mivel szinte kizárólag a faggyúmirigyek bazális sejtrétegével párhuzamosan helyezkedtek el, jelezve, hogy jelenlétük nem véletlenszerű esemény.

A felhalmozódó makrofágok további jellemzésére kettős immunfluoreszcens festést használtunk a FXIII-A és a CD206 vagy CD209 markerkombinációk alkalmazásával. Megállapítottuk, hogy az észlelt makrofágok egészséges bőrben az alternatív aktiváció

markereit (FXIII-A⁺/CD209⁺/CD206⁺) fejezték ki, míg klasszikusan aktivált makrofágokat (CD163⁺/FXIII-A⁻) csak patológias körülmények között tudtunk kimutatni, például aknéban. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a faggyúmirigyek körüli lokális mikro környezet szerepet játszhat a makrofágok felhalmozódásában és aktiválásában, amelyekhez a szebociták potenciálisan aktívan hozzájárulhatnak.

4.4 Th17 sejtek veszik körül a faggyúmirigyeket

FFPE akne minták festése azt is kimutatta, hogy CD4⁺IL-17⁺ kettős pozitív T-sejtek veszik körül a faggyúmirigyeket nem csak aknéban, hanem egészséges bőrbopsziákban egyaránt, jelezve a Th17 sejtek és szebociták között fennálló potenciális kommunikációt a gyulladás folyamatokon túlmenően fiziológias körülmények között is.

4.5 A szebociták CXCL-8 termelésük révén immunsejteket vonzzanak maguk köré

A szövettani megfigyeléseik alapján, miszerint a makrofágok és a T-sejtek a faggyúmirigyek köré csoportosulnak az egészséges bőrben, megvizsgáltuk, hogy a szebociták képesek-e aktívan vonzani ezeket a sejteket. Bio-Plex technológiával elemeztük az SZ95 szebocitákról gyűjtött felülúszók összetételét, amely számos kemokin és citokin jelenlétét kimutatta, mint pl. a CXCL-8, CCL-2, CCL-5 és a CXCL-10.

Mivel a CXCL-8-nak ismert a kemoattraktáns szerepe, ezért elemeztük a monociták, neutrofil granulociták és T sejtek migráló kapacitását SZ95 szebocita felülúszó jelenlétében. Mindhárom sejt típus szignifikáns növekedést mutatott a szebocita felülúszó felé történő migrációban a kontroll Sebomed tápfolyadékhoz képest. A CXCL-8 migrációban betöltött szerepének megerősítéséhez semlegesítettük a CXCL-8-at az SZ95 szebocita felülúszóban az újabb migrációs vizsgálatokat megelőzően, ami az eredeti migrációs kapacitást eredményezte. Ezután megvizsgáltuk, hogy bizonyos gyulladásos körülmények (IFN- γ , TNF- α IL-17, LPS, LTA, *P. acnes* 888 és IL-4 kezelés) megváltoztatják-e a szebociták által termelt fehérjék szekrécióját, valamint a sejtek ezt követő migrációját. Minden esetben fokozott CXCL-8, CCL-5 és CXCL-10 termelést detektáltunk és azt is megállapítottuk az IFN- γ , az IL-17, az LPS és az LTA voltak a szebociták domináns aktivátorai. Emellett az immunsejtek migrációjának intenzitása is egybecsengett az indukált kemokinek szintjének növekedésével. Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy a nyugalmi állapotban lévő szebociták képesek *in vitro* immunsejteket vonzani CXCL-8 függő módon, és ez a kemoattraktáns hatás tovább fokozódik gyulladásos környezetben.

4.6 Az SZ95 szebociták elősegítik a monocita eredetű makrofágok alternatív polarizációját

A szebociták és makrofágok közötti feltételezett kommunikáció vizsgálatához *in vitro* modellt készítettünk, ahol a perifériás vér monocitákat makrofágokká differenciáltuk SZ95 szebocita felülúszó jelenlétében.

Először az SZ95 szebocita felülúszó makrofágok polarizációjára gyakorolt hatását vizsgáltuk, olyan széles körben elfogadott markerek expressziójának vizsgálatával, mint a FXIII-A (Western blot) valamint a CD206 és CD209 (áramlási citometria). Az összes vizsgált marker fokozott kifejeződését figyeltük meg, amikor a monocitákat az SZ95 szebocita felülúszó jelenlétében differenciáltattuk. Fontos megjegyezni, hogy a lipid mentesített SZ95 szebocita felülúszó alkalmazása során a FXIII-A szintje nagymértékben lecsökkent és a CD206, CD209 markerek expressziója szinte teljesen elmaradt, amely a faggyú lipidek makrofág-differenciálódásban betöltött lehetséges szerepére utal.

Az OA, LA, PA, STA és SQ lipidek egyedi visszapótlásával megállapítottuk, hogy elsősorban az LA és az OA felel az alternatív makrofágok aktiválásért, míg az SQ, STA és PA nem voltak hatással.

Az alternatív aktiváció felé mutató erős polarizáló hatás ellenére az SZ95 szebocita felülúszóval kezelt makrofágok megtartották klasszikus aktiváció lehetőségét, amely azt sugallja, hogy a polarizáló hatás felülírható veszélyjelzés esetén.

4.7 Szebocita eredetű lipidek hozzájárulnak a makrofágok fokozott *P. acnes* felvételéhez

Az alternatív módon aktivált makrofágok egyik legfontosabb funkcionális jellemzője a fokozott fagocitózis. Mivel a *P. acnes*-ről kimutatták, hogy szerepet játszik az akne patogenezisében, ezért lemértük a FITC-jelölt *P. acnes* baktériumok fagocitózisát SZ95 szebocita felülúszóval és anélkül tenyésztett makrofágok esetében. Megállapítottuk, hogy a szebociták által termelt lipidek, mégpedig főként az LA és az OA jelenléte fokozottan képessé teszi a makrofágokat a baktériumok bekebelezésére.

4.8 A faggyút alkotó lipidek modulálják a *P. acnes* makrofág aktiváló potenciálját

A *P. acnes* kulcsfontosságú szerepet játszik az akne patogenezisében azáltal, hogy a makrofágokat fokozott IL-1 β termelésre készíti, azonban méréseink során *in vitro* körülmények között csak nagyon csekély szintű IL-1 β termelést tudtunk kimutatni, ami arra utal, hogy más tényezők is szükségesek a patológiás szerepének betöltéséhez. Ezért ELISA és Western blot mérésekkel megvizsgáltuk, hogy a SZ95 szebocita felülúszó jelenlétében történő differenciálódás megváltoztathatja-e az IL-1 β szinteket *in vitro* *P. acnes*-kezelt makrofágokban. A kísérletek kimutatták, hogy a faggyút alkotó lipidek különböző hatással

vannak az IL-1 β szekrécióra. Míg a PA és az STA jelenléte fokozta az IL-1 β termelést, addig az LA-nak egyértelműen anti-inflammatorikus hatása volt, egyaránt csökkentette a vizsgált IL-1 β , IL-6 és TNF- α termelést. Érdekes módon az OA csökkentette mind az IL-6, mind a TNF- α szintjét, de az IL-1 β termelődést fokozta, ami azt sugallja, hogy az OA különféle gyulladásos jelátviteli utakon keresztül szelektíven járul hozzá a szebociták által kialakított gyulladásos környezethez.

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a szebociták szerepe a makrofágok szabályozásában nem korlátozódik pusztán polarizációjuk megváltoztatására, hanem integrálhatóak olyan betegség specifikus esetekre is, mint az akne, ahol a szebociták a gyulladást a biológiailag aktív lipidek szekrécióján keresztül szabályozzák.

4.9 A szebociták nem befolyásolják a CD4⁺CD45RO⁺ effektor T-sejtek citokin szekrécióját

Mivel a CD4⁺CD45RO⁺ effektor T-sejtek migráltak a legnagyobb mértékben az SZ95 szebocita felülűszó jelenlétben, ezért megvizsgáltuk, hogy a vérből származó CD4⁺CD45RO⁺ sejteket SZ95 szebocita felülűszó jelenlétben differenciáltatva, majd α CD3 és szolubilis α CD28 aktivátorokkal stimulálva változik-e a T-sejtek citokin termelése. Az IL-17, IFN- γ , TNF- α és az IL-4 szekréciójában nem észleltünk szignifikáns változást, azonban az IL-22 szekréciója kis mértékben megnövekedett.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az SZ95 szebocita felülűszó képes-e befolyásolni az effektor T-sejtek citokin profilját DC mediált módon. Ezért CD14⁺ monocitákat differenciáltuk SZ95 szebocita felülűszó vagy kontroll tápközeg jelenlétében DCk-ké, majd LPS aktivációt követően hozzáadtuk a DC-ket az allogén CD4⁺CD45RO⁺ sejtekhez (kevert leukocita reakció). Az SZ95 felülűszó nem befolyásolta a DC érés vagy a T-sejt aktiválódás folyamatát, ami azt mutatta, hogy a faggyúsejtek sem közvetlenül, sem közvetve nem befolyásolják az effektor T-sejtek citokin termelését.

4.10 A szebociták Th17 immunválaszt váltanak ki naiv T-sejtekben

Mivel az SZ95 szebocita felülűszó a naiv T-sejteket szintén fokozott migrációra bírta, ezért megvizsgáltuk a szebociták CD4⁺CD45RA⁺ naiv T-sejt differenciálódásra gyakorolt hatását is. A felülűszó vagy kontroll tápoldat jelenlétében differenciáltatott T-sejteket α CD3 és szolubilis α CD28 aktivátorokkal stimuláltuk és ELISA-val megmértük a termelt citokinek szintjeit. Méréseink jelentős IL-22 és IL-17 termelést mutattak (Th17 fenotípus), ezzel összhangban az SZ95 szebocita felülűszó jelenlétében generált DC-k szintén képesek voltak a naiv T-sejtek polarizációját a Th17 fenotípus felé eltolni az IL-17 és IL-22 fokozott

expressziójával. *In vitro* adataink tehát azt sugallják, hogy a szebociták képesek befolyásolni a T-sejtes immunválaszt.

4.11 A faggyúsejtek a Th17 differenciálódást az IL-1 β szekrécióján keresztül indukálják

Mivel a lipid mentesített SZ95 szebocita felülúszó kezeléseket nem eredményeztek változást a citokinprofilban, ezért feltételeztük, hogy a megfigyelt Th17 polarizációért valamely a faggyúsejtek által termelt fehérje felel. Ezt kísérleteink igazolták is, mivel a szebocita felülúszó proteináz K kezelését követően elvégzett differenciáltatási kísérletekben a korábban megfigyelt Th17 fenotípus megjelenése elmaradt.

A szebociták normál és patológias körülmények közt is szekretálnak olyan citokineket (IL-1 β , IL-6, TGF- β), amelyekről ismert, hogy hozzájárulnak a Th17 polarizációhoz. Az SZ95 felülúszóban ezeket a citokineket egyesével semlegesítve megállapítottuk, hogy az IL-1 β semlegesítése az IL-17 szekréció 35% -os csökkenéséhez vezetett a differenciált T-sejtekben, míg a TGF- β és az IL-6 semlegesítése csak marginális hatással volt. Ezzel szemben mindhárom citokin kivonása majdnem teljesen meggátolta az IL-17-termelést. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a szebociták nagyrészt IL-1 β termelése révén Th17 immunválaszt indukálnak naiv T-sejtek esetén.

4.12 A *P. acnes* nem befolyásolja az immunsejtek toborzását, de befolyásolja a DC-k priming kapacitását

Annak kiderítésére, hogy a *P. acnes* megerősíti-e a helyi szimbiózist és/vagy immunválaszt megvizsgáltuk kölcsönhatásukat a faggyúsejtekkel. Az SZ95 szebocitákat 24 órán át előkezeltük szonikált *P. acnes* 889 törzsszel, majd alapos mosást és tápcserét követően, további 24 óra elteltével begyűjtöttük a sejtek felülúszóját. A migrációs vizsgálatokban a *P. acnes* nem változtatta meg a szebociták kemoattraktáns potenciálját a kezeletlen SZ95 felülúszóhoz képest, mivel a neutrofilek, monociták és limfociták migrációja nem változott.

Azonban, ha DC-eket differenciáltattunk *P. acnes* pre-stimulált SZ95 felülúszó jelenlétében, és ezt követően alkalmaztuk allogén CD4⁺CD45RA⁺ naiv T-sejtek differenciálására, ezek a T-sejtek enyhe, de nem szignifikáns növekedést mutattak IL-17 és IL -22 termelésükben. Érdekes módon az SZ95 szebocita felülúszóval érlelt DC-k (mind a nem stimulált, mind a *P. acnes* által stimulált) szignifikánsan lecsökkentették az IFN- γ , egy tipikus Th1 citokin, termelését, míg a TNF- α és IL-4 szintek nem változtak jelentősen.

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a szebociták Th17 polarizációt indukálnak, és a *P. acnes* közvetetten hozzájárul a jelenséghez a Th1 differenciáció gátlásával.

5. MEGBESZÉLÉS

A makrofágok begyűlését a faggyúmirigyek köré egészséges bőrben már korábbi kutatások is kimutatták, azonban ezek a megállapítások a megfigyelések szintjén maradtak. Ezenkívül a szebociták patológiás körülmények között történő aktivitását az olyan betegségek is alátámasztják, mint például a akne, ahol jellemző a faggyúmirigyek köré beszűrődő immunsejtek (pl. Th17) megjelenése, ami azt sugallja, hogy a szebocitáknak összetett szerepe lehet a gyulladásos folyamatokban. A korábbi megfigyelések értelmezésének hiánya valószínűleg azzal magyarázható, az SG-eket évtizedekig csak atavisztikus maradványoknak tekintették, amelyek a fokozott faggyútermeléssel hozzájárulnak az akne kialakulásához. Az elmúlt 20 év tanulmányai azonban rámutattak arra, hogy a faggyúmirigy-metabolizmus bonyolult szabályozás alatt áll, amelyet különböző gyulladásos ingerek befolyásolhatnak. Ezen túlmenően, aktiváló stimulusok révén a szebociták képesek különböző citokinek és kemokinek termelésére, amely olyan potenciális (pato)fiziológiás szerepet sugall, mint például a lipid metabolizmus és a sejtszintű gyulladás közötti kapcsolat közvetítése. Ezek a jellemzők nagyban hasonlítanak az adipocitákra, amelyek a legjobb példát szolgáltatják az elsősorban lipidek metabolizálására berendezkedett, de ugyanakkor immunmoduláló szereppel rendelkező sejttípusra.

Annak elfogadása, hogy egyes bőrsejt típusok immunológiailag kompetensek lehetnek, anélkül, hogy mieloid vagy limfoid eredettel rendelkeznének, sokáig nagy kihívást jelentett a bőr kutatásában. Több évtizedes kutatás eredménye, hogy a keratinocitákat elsősorban citokin termelésük révén immár elfogadják, mint az immunrendszer képviselőit, amelyek fontosak különböző gyulladásos megbetegedések, például pikkelysömör és az AD patogenezisében. Ezzel ellentétben a faggyúmirigyeket sokáig, csak, mint a bőr lipid gát kialakításához hozzájáruló függelékeket tartottak számon. Azonban, ahogyan ez munkánkból is kiderült, már a dermális lipiddtartalomban is jelentős különbségek vannak a faggyúmirigy szegény illetve gazdag bőr között.

A legfontosabb kérdést, hogy vajon a faggyú lipidek is hozzájárulhatnak-e a dermális lipiddtartalomhoz, először az 1950-es években vizsgálta Butcher, aki kimutatta, hogy a faggyút alkotó lipidek, az STA (radioaktív jelölés), OA és LA (fluoreszcens jelölés) fokozott felszívódást és felhalmozódást mutattak a dermiszben, patkány bőrön végzett kísérletekben. Az STA esetében jelentős felhalmozódást figyelt meg a faggyúmirigy körül, míg az LA még a véráramba is bekerült a kapillárisokon keresztül. Kutatásaink során kiterjesztettük és kiegészítettük a faggyút alkotó lipidek vizsgálatát, Raman spektroszkópiával követtük a

lipidek penetrációját az epidermiszen keresztül és kimutattuk, hogy az összes vizsgált lipid (STA, LA, OA, PA és SQ) képes volt áthatolni az epidermiszen, annak roncsolása nélkül, végül felhalmozódtak a dermiszben. Míg Butcher-nek az volt az elképzelése, hogy a lipidek többnyire a piloszebáceus csatornán keresztül hatolnak be a dermiszbe, eredményeink azt támasztják alá, hogy az epidermiszen keresztül is átjutnak és hozzájárulhatnak a dermális lipid környezet kialakításához.

A citokinek és kórokozók mellett a lipidek kulcsszerepet játszanak a különböző immunsejtek differenciálódásában és aktiválásában is, ezért kutatásunk célja volt a sebociták makrofágokkal és limfocitákkal való interakciójának vizsgálata. A korábbi megfigyelések megerősítésére, miszerint a faggyúmirigyek körül jelentős számban halmozódnak fel makrofágok, a jelenleg rendelkezésre álló szövettani módszerekre és markerekre támaszkodtunk a makrofágok különböző alcsoportjainak megkülönböztetésére. A szöveti környezet függvényében a makrofágok differenciálódhatnak az alternatív útvonal irányába, amelynek elsősorban az IL-4/IL-13 citokinek, de a különböző lipidek is kiváltói lehetnek. Ez az aktiváltsági állapot az, amit a bőr „rezidens” makrofágjai képviselnek, amelyek az összes jellemző alternatív markert expresszálják (CD206, CD209 és FXIII-A) és amelyek központi szerepet játszanak a szöveti környezet fenntartásában. A spektrum másik végén a klasszikusan aktiváltak makrofágok szerepelnek, ahol az IFN- γ és a TNF- α a legfontosabb kiváltó citokinek. Munkánk során osztályoztuk a faggyúmirigyek közelében elhelyezkedő makrofágokat a fenti besorolásnak megfelelően és megállapítottuk, hogy fiziológiás körülmények között csak alternatív módon aktivált makrofágok vannak jelen, míg a klasszikusan aktiváltak, csak olyan patológiás környezetben voltak megfigyelhetőek, mint az akne. Megfigyeléseink alapján úgy gondoljuk, hogy fiziológiás körülmények között az alternatív módon aktivált makrofágok kizárólagos jelenléte egy folyamatos "non-danger" jel következménye lehet, amely kialakításában a sebociták is részt vesznek. Az SZ95 sebociták alap állapotban is számos kemokint és citokint szabadítanak fel, úgy, mint a CXCL-8, IL-6 és IL-1 β . A CXCL-8-ről ismert, hogy kulcsszerepet játszik immunsejtek, például monociták és neutrofil granulociták toborzásában, képes ezeket a sejteket odavonzani a gyulladás környezetébe. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a makrofágok mellett a T-limfociták is jelentős számban begyűlnek a gyulladásos elváltozások területére. Figyelembe véve a sebociták holokrin szekrécióját, az SZ95 sebociták sejtmentes felülűszóját migrációs kísérletekben felhasználva azt találtuk, hogy CXCL-8 által közvetített módon a sebociták képesek monocitákat, neutrofileket és különböző T-sejteket, például CD4⁺CD45RO⁺ effektor és CD4⁺CD45RA⁺ naiv T-sejteket migrációra bírni. Gyulladásos stimulusokra (citokinek

és/vagy bakteriális termékek) a szebociták tovább aktiválódtak és még fokozottabb kemokin és citokin termeléssel reagáltak. Ezzel összhangban az előre aktivált SZ95 szebociták még fokozottabb kemoattraktáns potenciált mutattak, amely elsősorban a tovább emelkedett CXCL-8 koncentrációjának volt köszönhető.

Ezek a megállapítások azt sugallják, hogy a szebociták által termelt CXCL-8 kulcsfontosságú lehet a faggyúmirigy körüli immunsejtek felhalmozódásának megindításában és felgyorsításában.

A lehetséges további kölcsönhatások feltérképezéséhez megvizsgáltuk a szebociták makrofágokra gyakorolt hatásait, például a differenciálódási makrofág markerek kifejeződésének szabályozását, a fagocita funkciót, illetve a *P. acnes*-fertőzött makrofágok citokin termelését.

Hisztológiai megállapításaink alátámasztásaként, bemutattuk, hogy az SZ95 szebocita felülúszóval kezelt monociták az alternatív makrofág-aktiválási útvonal felé polarizálódtak, mivel az összes széles körben elfogadott alternatív marker (CD206, CD209 és FXIII-A) expressziója fokozódott. Ez azt sugallja, hogy a szebociták IL-4/IL-13 független módon befolyásolhatják a makrofágok polarizációját. Ezenkívül a felülúszóval kezelt makrofágok *in vitro* fokozott *P. acnes* felvételre voltak képesek, amely mutatja, hogy a szebociták nemcsak a makrofág markerek expressziójára, hanem működésükre is hatnak. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a szebocita eredetű lipidek aktívan hozzájárulnak a bőr homeosztázisához, amely összhangban van azzal közelmúltbeli megállapítással, hogy a faggyúmirigy gazdag egészséges bőrben egy egyedi nem-gyulladásos immunsejt populáció van jelen.

Azokból a megfigyelésekből kiindulva, hogy a faggyú lipid összetétele dinamikusan változik a környező ingereknek megfelelően, továbbá akne betegek esetén is megfigyelték, hogy a faggyú lipidek mennyisége és főként összetétele jelentősen befolyásolhatja a gyulladást okozó folyamatokat, kísérleteinket kiterjesztettük *P. acnes*-kezelt makrofágok vizsgálatára is.

Megvizsgáltuk a szebociták által termelt lipidek szerepét az IL-1 β és más gyulladást mediátorok, mint például az IL-6 és a TNF- α szekréciójában *P. acnes*-fertőzött makrofágok esetében. Vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy a fő lipid komponensek mindegyike jól definiált módon befolyásolja a gyulladást okozó citokinek termelését. Érdekes módon a PA és az STA, akár a *P. acnes* jelenléte nélkül is hatásosan fokozták az IL-1 β , IL-6 és TNF- α termelését. Továbbá azt találtuk, hogy míg a *P. acnes* önmagában csak kismértékben befolyásolta az IL-1 β szekrécióját, addig az LA és az OA, jelentősen szenzitizálták a makrofágok választ a baktérium jelenlétére, részben magyarázatot szolgáltatva arra, hogy

egy egyébként kommenzális baktérium miként válthat ki gyulladást olyan betegségekben, mint az akne. Eredményeink rávilágítanak a faggyú lipidek és azok arányának alapvető szerepére a gyulladást okozó folyamatokban. A lipidfrakciók arányának változásai meghatározhatják a makrofágok *P. acnes* és más kórokozók jelenlétére adott választ. A tanulmányunk korlátait szem előtt tartva, olyan adatokkal szolgálunk, amelyek alátámasztják az LA szint és az akne betegek faggyújára jellemző megnövekedett OA/LA arányának fontosságát. Eredményeink előrevetítik, hogy az LA kulcsfontosságú szereplő lehet nemcsak a komedo-képződésben, hanem a mikrobák és makrofágok közötti felborult szimbiózisban is, elsősorban gyulladáscsökkentő hatása révén, amelyet tovább befolyásol az OA erős és szelektív IL-1 β indukáló szerepe. Ezek az eredmények teljes mértékben igazolják, hogy a faggyú lipogenezis nem csak a faggyú felhalmozódásához járul hozzá, hanem számos összehangolt akció eszköze is, beleértve a makrofágokkal történő kommunikációt is.

Ezen eredmények alapján arra a következtetésre juthatunk, hogy a sebociták, hasonlóan a keratinocitákhoz, hozzájárulhatnak a gyulladást okozó környezethez kialakításához, azonban elsősorban a dermisz homeosztázisának fenntartásáért felelnek, koordinálva a lipidek, citokinek és rezidens baktériumok egyedülálló szimbiotikus közegét. Ezenkívül előtérbe kell helyoznunk a faggyú lipidfrakciók elemzését megvizsgálva a potenciális immunszabályozó szerepüket, amelyek új magyarázatot adhatnak a különböző kóros állapotok pl. az akne és a rosacea megváltozott lipidprofiljának vonatkozásában.

A tanulmány második részében bizonyítékot szolgáltatunk a sebociták és a T-sejtek közötti funkcionális kommunikációra is, ami egy Th17-domináns immunválasz indukálását eredményezte. Másrészt bemutattuk a *P. acnes* sebociták és DC-k által közvetített gyulladási indukáló hatását olyan betegségekben, mint az akne.

Mivel a T-sejtek fontos szerepet játszanak a szöveti gyulladást okozó válaszban, ezért azt vizsgáltuk, hogy a faggyúmirigyek a makrofágokban megfigyeltekhez hasonlóan befolyásolják-e a T-sejtek differenciálódását. Kimutattuk, hogy a sebociták által kibocsátott faktorok nem befolyásolják a CD4⁺CD45RO⁺ effektor T-sejtek citokin szekrécióját, jelezve, hogy a sebociták nem tudják felülírni a korábban meghatározott T-sejt fenotípust. Egyetlen kivétel az IL-22 termelés enyhe növekedése volt, amely azt feltételezi, hogy a sebociták gátló homeosztázist biztosítanak az IL-22/TNF- α tengely támogatásával.

Az effektor sejtekkel ellentétben azt találtuk, hogy a sebociták hatással vannak a CD4⁺CD45RA⁺ naív T-sejtek differenciálódására. Az általunk végzett Bio-Plex vizsgálatok alapján a sebociták különféle citokineket, legfőképpen IL-6-ot és IL-1 β -t termelnek, amelyek a Th17 sejtek *de-novo* differenciálódásához kulcsfontosságú citokinek. Bemutattuk, hogy a

szebocita felülúszó önmagában képes a naiv T-sejtek Th17 irányú polarizációjára, melynek kulcs eleme az IL-1 β termelés. Mivel a T-sejtek érése nem a perifériás szövetekben történik, ezért feltételezzük, hogy a szebociták hozzájárulnak egy olyan helyi mikrokörnyezet kialakításához, amely a naiv T-sejtek differenciálódását a Th17 fenotípus felé tolja el a nyirokcsomókban.

A Th17 populáció hidat képez a veleszületett és adaptív immunitás között és kulcsszerepet játszik a szervezet védelmében. Külön-külön vagy szinergista módon a Th17 sejtek effektor citokinjei (IL-17 és IL-22) antimikrobiális peptidek sorát indukálják ezáltal robusztus antimikrobiális választ kiváltva. A Th17 sejtek azonban képesek kóros gyulladás kialakítására is, számos gyulladásos bőrbetegséghez társulnak, mint például a pikkelysömör, atópiás ekcéma és allergiás kontakt dermatitisz. Ezenkívül a közelmúltban leírták a Th17 sejtek szerepét az akne patogenezisében is, ahol a Th17-hez fenotípushoz társított citokinek és differenciálódási faktorok fokozott expressziója figyelhető meg léziós bőrben. Saját adatainkkal egybeesően Agak és mtsai. bemutatták, hogy Th17 sejtek vannak jelen a komedok perifolikuláris infiltrátumjában. Azonban ellentétben a mi megállapításainkkal, a szerzők azt feltételezték, hogy a Th17 immunválaszt leginkább a *P. acnes* szabályozza. Hasonlóképpen, egy nemrégiben végzett vizsgálat kimutatta, hogy a *P. acnes* Th1/Th17 kevert válaszreakciót indukál, annak ellenére, hogy az akne patogenezisét korábban szigorúan Th1 típusú immunitással társították. Adataink azt mutatják, hogy a szebociták nem indukálnak sem Th1, sem Th2 sejtdifferenciálódást, viszont az általuk kiváltott Th17 közvetített immunválaszt tovább fokozza a *P. acnes* jelenléte.

Ezenkívül SZ95 szebocitákban beszámoltak arról, hogy a *P. acnes* hatékonyan indukálja az IL-1 β szekréciót az NLRP3 gyulladásos útvonal aktiválásával. Az IL-1 β szintjének emelkedését mi is észleltük *P. acnes* kezelést követően, azonban ez nem eredményezett fokozott Th17 differenciációt, ami a nyugalmi állapotban is magas szinten termelődő IL-1 β jelenlétével magyarázható. Adataink arra utalnak, hogy a szebociták stabilan indukálják a Th17 sejtek termelődését a bőr homeosztázisának fenntartása érdekében. Azonban ha a piloszebáceus egységet patogén körülmények között *P. acnes* kolonizálja, a Th17 válasz tovább fokozódik *in vivo*. Ennek megfelelően az egészséges egyéneknél csak ritkán észleltünk CD4⁺IL-17⁺ sejteket a faggyúmirigyek környékén, míg ezek a sejtek nagy számban jelentek meg a faggyúmirigy körül akne léziókban.

Számos *in vitro* vizsgálat kimutatta, hogy a *P. acnes* sejtek vagy sejtfrakciók stimulálják a citokin felszabadulást az immunsejtekből, keratinocitákból és szebocitákból TLR2 aktiváción keresztül. Azonban a mechanizmus, amellyel a *P. acnes* aktivitását *in vivo* gyakorolja, még

nem ismert. A *P. acnes* a dermisz mélyebb rétegeiben a szőrtüszők környezetében gyakran előfordul, azonban magukban a faggyúmirigyekben csak nagyon ritkán. Amikor ez a kommenzális baktérium elszaporodik, akkor érintkezésbe léphet a DC-kkel és aktiválhatja az érésüket, amelyet egyedi immunválasz követ, amit döntően befolyásol a helyi mikrobiom összetétele, a biofilm-képzés és a szöveti sejtekből származó további jelek. Kimutatták, hogy a *P. acnes*-szel stimulált DC-kben megnövekedik az adhéziónak és citokinek szintézise, amely hasonlít az LPS által aktivált DC-kben lezajló folyamatokhoz. Ezen felül a naiv T-sejtek jelenlétében a *P. acnes* által aktivált DC-k erős IFN- γ szekréciót mutattak, amely szintén egybevág az LPS aktivált DC-k profiljával, megerősítve a *P. acnes* szerepét egy erős Th1-típusú immunválasz kiváltásában. A szebocita felülűző jelenléte azonban csökkentette a Th1 válasz indukálására való képességet, és helyette a *P. acnes* szimbiotikus és/vagy immunválaszát a Th17 elkötelezettség felé irányította. Összefoglalva feltételezzük, hogy a szebociták feladata a bőrbarrier fenntartása: i) a Th17 immunválasz indukálása révén, ii) hatékony gyulladáshoz vezető válaszok indítása és iii) az IFN- γ termelés csökkentése a gyulladás utáni homeosztázis elérése érdekében.

Vizsgálataink bebizonyították, hogy a szebociták aktív szerepet játszanak a bőr gyulladáshoz vezető folyamataiban az immunsejtek aktív toborzása és a T-sejtekkel történő funkcionális kommunikáció révén, amely határozott Th17 differenciációhoz vezet. Ez a kölcsönhatás fontos lehet az *Acne vulgaris* patogenezisében; azt azonban további vizsgálatoknak kell tisztáznunk, hogy a szebocita-Th17 tengely előnyös védekezést biztosít a kórokozókkal szemben vagy öngerjesztő gyulladáshoz vezető folyamatokat aktivál.

Annak érdekében, hogy megismerjük azokat a feltételeket és ingereket, amelyek képesek a szebocitákat a gyulladáshoz vezető fehérjék és lipidek termelésének összehangolására és egyensúlyozására, valamint még több immunológiailag aktív lipidet azonosíthatunk további kutatások szükségesek. Eddigi eredményeink megalapozhatják a tudományos és terápiás érdeklődésre irányuló kutatások számos olyan új területét, amelyek új fehérje és lipid természetű szereplők azonosításához vezethetnek a gyulladáshoz vezető ingerek/szebociták/immunsejtek tengelyében, különböző bőrbetegségek kapcsán.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A faggyúmirigy, mely a szőrtüszővel és szőrszállal együtt alkotja a pilosebaceus egységet, elsődleges funkciója a bőr zsírosítása a faggyútermelésen keresztül. A faggyúmirigynek ugyanakkor a gyulladáshoz vezető folyamatokban is szerepe lehet, elsősorban a mintázatfelismerő

receptorokon keresztül, mint például a TLR2, a TLR4 és a TLR6 révén. Bár számos betegségnek, így az akne kialakulásának jellegzetessége a mennyiségében és minőségében megváltozott faggyútermelés, felvetve, hogy a termelt faggyú megváltozott lipid-összetétele és a gyulladás között kapcsolat lehet, a közelmúltig a faggyúmirigyekre csak, mint a gyulladásos folyamatok passzív résztvevőire tekintettek.

Munkánk során célul tűztük ki annak megvizsgálását, hogy a faggyúsejtek, milyen formában képesek részt venni a gyulladásban, középpontba állítva az immunesejtekkel való esetleges interakciójukat, és ezáltal lehetnek-e akár aktív kezdeményezői is az immun-folyamatoknak.

Raman-spektroszkópiai eredményeink alapján bemutattuk, hogy a faggyú nem csupán a bőr felszíni zsírosításához képes hozzájárulni, de áthatolva az epidermiszen felhalmozódik a bőr dermális régiójában is, felvetve, hogy a faggyút alkotó zsírok hatással lehetnek az immunsejtekre is. Ennek további vizsgálatához kísérleteinket makrofágokon és T-sejteken végeztük, melyeket jelentős számban azonosítottunk a piloszebáceus egység környezetében.

Az *in vitro* modellünkben, ahol SZ95 sebocita felülűszó jelenlétében differenciáltunk monocitákat, illetve T-sejteket, migrációs mérések segítségével meghatároztuk, hogy CXCL-8 termeléssel a sebociták kemotaxison keresztül képesek magukhoz vonzani az összes fent említett sejtípust.

További munkánkkal bebizonyítottuk, hogy a faggyúban jelenlevő lipidek, elsősorban a linol- és olajsav elősegítették a monocita eredetű makrofágok alternatív aktiválását, és hozzájárultak a makrofágok fokozott *P. acnes* felvételéhez. Ezenkívül bemutattuk, hogy a faggyú komponens lipidek szelektív és differenciált módon járulnak hozzá a *P. acnes* makrofág aktiváló képességéhez.

Vizsgálva egy lehetséges faggyúsejt - T-sejt interakciót, megállapítottuk, hogy abban elsősorban a faggyúsejtek által termelt fehérjék vehetnek részt, mely közül az IL-1 β -t találtuk kulcsfontosságúnak, mely termelésével a Th17 immunválaszt indukálhatják a faggyúsejtek.

Végül bemutatjuk, hogy a *P. acnes* nem befolyásolja az immunsejtek toborzását, de befolyásolja a DC-k priming kapacitását.

Eredményeink rámutatnak arra, hogy faggyúsejtekkel, az általuk termelt zsírokkal és fehérjékkel, egyaránt számolnunk kell a bőr (pato)fiziológiás működésének megértésében. Ahogy ma egy-egy bőrgyógyászati betegség esetében kulcskérdés a résztvevő citokinek azonosítása, úgy vizsgálataink felvetik annak is a szükségességét, hogy megismerjük a faggyúzsír „mintázatot” is, melynek egyaránt lehet diagnosztikai és terápiás hasznosíthatósága is, ezáltal érdekes távlatokat megnyitva mind az akadémiai mind pedig az ipari kutatás/hasznosíthatóság terén.

7. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/13/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Lovászi Marianna
Neptun kód: JOW8FK
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10053302

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. *Mattii, M., ***Lovászi, M.**, Garzorz, N., Atenhan, A., Quaranta, M., Lauffer, F., Konstantinow, A., Küpper, M., Zouboulis, C. C., Kemény, L., Eyerich, K., Schmidt-Weber, C. B., Törőcsik, D., Eyerich, S.: Sebocytes contribute to skin inflammation by promoting the differentiation of Th17 cells.
Br. J. Dermatol. [Epub ahead of print], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bjd.15879>
IF: 4.706 (2016)
2. **Lovászi, M.**, Mattii, M., Eyerich, K., Gácsi, A., Csányi, E., Kovács, D., Rühl, R., Szegedi, A., Kemény, L. V., Stähle, M., Zouboulis, C. C., Eyerich, S., Törőcsik, D.: Sebum lipids influence macrophage polarization and activation.
Br. J. Dermatol. 177 (6), 1671-1682, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bjd.15754>
IF: 4.706 (2016)



*Megosztott első szerzős közlemény



További közlemények

3. Szentkereszty-Kovács, Z., **Lovászi, M.**, Zatik, Z., Duró, E., Kovács, D., Törőcsik, D.: Perspektívák a faggyúmirigy kutatásban.
Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 93 (3), 126-135, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2017.93.3.7>
4. **Lovászi, M.**, Szegedi, A., Zouboulis, C. C., Törőcsik, D.: Sebaceous-immunobiology is orchestrated by sebum lipids.
Dermatoendocrinol. 2017, 1-11, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19381980.2017.1375636>
5. Kovács, D., **Lovászi, M.**, Póliska, S., Oláh, A., Bíró, T., Veres, I., Zouboulis, C. C., Stähle, M., Rühl, R., Remenyik, É., Törőcsik, D.: Sebocytes differentially express and secrete adipokines.
Exp. Dermatol. 25 (3), 194-199, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.12879>.
IF: 2.679
6. Törőcsik, D., Kovács, D., Camera, E., **Lovászi, M.**, Cseri, K., Nagy, G. G., Molinaro, R., Rühl, R., Tax, G., Szabó, K., Picardo, M., Kemény, L., Zouboulis, C. C., Remenyik, É.: Leptin promotes proinflammatory lipid profile and induces inflammatory pathways in human SZ95 sebocytes.
Br. J. Dermatol. 171 (6), 1326-35, 2014.
IF: 4.275

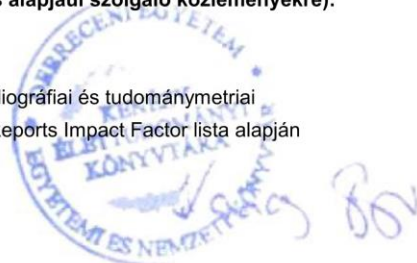
A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,366

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

9,412

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

Debrecen, 2018.01.12.



8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is szeretnék köszönetet mondani Dr. Töröcsik Dánielnek az elmúlt öt évben tanúsított türelemért, folyamatos támogatásáért és tudományos útmutatásáért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Stefanie Eyerichnek és Dr. Martina Mattiinak, közös kutatásunkban tett hatalmas erőfeszítésükért, továbbá a ZAUM központban dolgozó kollégáknak, különösen Kilian Eyerich Professzornak Úrnak, Dr. Natalie Garzorz-Starknak, Anne Atenhannak és Jana Sängerneknak.

Hálás vagyok Dr. Kovács Dórának, segítségéért és bátorítása nélkül, ezt a munkát nem lehetett volna megvalósítani.

Szeretnék köszönetet mondani szegedi együttműködő partnereinknek, Dr. Csányi Erzsébetnek és Dr. Gácsi Attilának, segítségük és szaktudásuk nagyban hozzájárult a munka sikeres kivitelezéséhez.

Külön köszönet illeti Christos C. Zouboulis Professzor Urat és Kemény Lajos Professzor Urat, amiért tudományos ismereteikkel és konstruktív javaslataikkal támogattak.

Kiemelkedő technikai támogatásukért köszönetet mondok Toka-Farkas Tündének, Bana Sándorné Ágnesnek, Vágóczki Erzsébetnek és Csapóné Sandra Ildikónak.

Köszönettel tartozom Dr. Remenyik Éva Professzorasszonynak, hogy biztosította a Bőrgyógyászati Tanszéken végzett munkám feltételeit.

Továbbá szeretném kifejezni hálámat minden kollégámnak, akik pozitív munkakörnyezetet biztosítottak az elmúlt években.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak szeretetükért, támogatásukért, türelmükért és amiért mindig mellettem álltak.

Munkámat támogatta a TÁMOP 4.2.2.A-11/1 / KONV-2012-0031 projekt, a Magyar Nemzeti Kutatási Alap (OTKA NN117020), az Emberi Erőforrások Minisztériumának Új Nemzeti Kiválósági Programja, a Marie Skłodowska-Curie pályázat (627547 RNasebgland FP7-PEOPLE-2013-IEF), a Fondation Acteria és a Helmholtz Egyesület. A disszertáció elkészítését a GINOP2.3.2-15-2016-00050 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.