

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Az endokannabinoid jelátvitel új aspektusainak vizsgálata
humán korneális epitélsejteken és szebocitákon**

Angyal Ágnes

Témavezető: Dr. Oláh Attila



**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2022**

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés.....	6
3. Irodalmi áttekintés.....	7
3.1. A kannabinoid jelátvitel	7
3.1.1. Az endokannabinoid rendszer (ECS) főbb elemei	7
3.1.2. A kannabinoid receptorok	8
3.1.3. Az eCB-ok.....	10
3.2. A bőr.....	12
3.2.1. A bőr, mint barrier.....	12
3.2.2. A faggyúmirigyek.....	13
3.2.3. Az akne.....	15
3.2.4. Az SZ95 humán, immortalizált szebocita sejtvonal	18
3.3. A szaruhártya.....	19
3.3.1. A szaruhártya felépítése	19
3.3.2. A humán korneális epitélium (kór)élettanának a disszertáció szempontjából releváns vonatkozásai	20
3.3.3. A humán korneális epitélisejtek in vitro modellje: a humán, immortalizált korneális epitélisejtek (HCEC-ek)	23
4. Célkitűzés	24
5. Anyagok és módszerek.....	25
5.1. A kísérletek során felhasznált kémiai ágensek áttekintése	25
5.2. Sejtenyésztés	26
5.3. A szebociták intracelluláris lipidtartalmának meghatározása	26
5.4. Az életképesség vizsgálata (MTT-assay)	27
5.5. Az apoptózis és a nekrozis vizsgálata	28
5.6. A proliferáció vizsgálata (CyQUANT proliferációs assay)	29
5.7. Áramlási citometria	30
5.8. UVB besugárzás.....	30
5.9. Reverz transzkripciót követő kvantitatív, valós idejű polimeráz lánreakció (Q-PCR).....	31
5.10. Western blot	31
5.11. Foszfokináz-array	33
5.12. A GPR119 immunhisztokémia kimutatása	34
5.13. A GPR119 expresszióváltozásának szemikvantitatív vizsgálata aknéban	35
5.14. Az ECS tagjainak kimutatása HCEC-eken (immunfluoreszcens jelölés)	37
5.15. Az ECS tagjainak kimutatása humán szaruhártyán (immunfluoreszcens jelölés).....	37
5.16. Az intracelluláris 3'5'-ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) koncentráció meghatározása (cAMP ELISA).....	38

5.17.	A citokin felszabadulás vizsgálata (IL-6 és IL-8 ELISA)	39
5.18.	Fluoreszcens Ca^{2+} mérés.....	39
5.19.	Szelektív géncsendesítés (siRNS transzfekció).....	40
5.20.	Statisztikai analízis	41
6.	Eredmények.....	42
6.1.	Az endokannabinoid jelátvitel vizsgálata humán faggyúmirigyekben.....	42
6.1.1.	Az OEA elősegíti a sebociták differenciálódását	42
6.1.2.	Az OEA gyulladáshoz vezet ki humán sebocitákon	45
6.1.3.	Az OEA lipogén hatása nem a PPAR α útvonalon keresztül valósul meg.....	46
6.1.4.	A GPR119 kifejeződik humán sebocitákon in vitro és in situ is	46
6.1.5.	A GPR119 szelektív géncsendesítése csökkenti az OEA lipogén hatását.....	47
6.1.6.	Az OEA lipogén hatásának kialakításában több kináz kaskád is részt vesz.....	49
6.1.7.	A GPR119 down-regulálódik a sebocitákban.....	52
6.2.	Az eCB jelátvitel vizsgálata humán korneális epitelsejteken	54
6.2.1.	A humán korneális epitelsejtek kifejezik az ECS legfontosabb tagjait	54
6.2.2.	A TLR3 aktivációval és UVB besugárzással kiváltott gyulladáshoz vezet időfüggést mutat HCEC-eken	55
6.2.3.	Az AEA hatásai a gyulladáshoz vezet citokinek expressziójára és felszabadulására jelentős koncentráció- és modellfüggést mutat HCEC-eken	57
7.	Diszkusszió.....	60
7.1.	A „nem-klasszikus” eCB jelátvitel vizsgálata humán faggyúmirigyekben.....	60
7.2.	Az ECS vizsgálata HCEC-eken.....	66
8.	Összegzés	70
9.	Summary	71
10.	Irodalomjegyzék.....	72
10.	Kulcsszavak.....	87
11.	Key words.....	87
11.	Köszönetnyilvánítás	88
12.	Függelék – Saját közlemények jegyzéke.....	89

1. Rövidítések jegyzéke

(-)-cis-PET: „(-)-perrottetinene”	ECS: endokannabinoid rendszer
18S RNS: 18S riboszomális RNS	EMT: eCB membrántranszporter
2-AG: 2-arachidonoil-glicerol	ERK1/2: extracelluláris szignál–regulált kináz 1/2
5-HT: szerotonin	FAAH: zsírsavamid-hidroláz
AA: arachidonsav	FBS: magzati szarvasmarha szérum
ABDH: „ α/β -domain containing hydrolase”	FM: faggyúmirigy
AD: atópiás dermatitisz	GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
AEA: anandamid	GLP-1: glükagonszerű peptid-1
AML: antimikrobiális lipid	HCEC: humán korneális epitélsejt
AMP: antimikrobiális peptid	IL: interleukin
BSA: szarvasmarha szérumalbumin	JNK: c-Jun N-terminális kináz
cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát	LA: linolsav
CB ₁ /CB ₂ : kannabinoid receptor 1 és 2	LOX: lipoxigenáz
CBC: (-)-kannabikromén	LPS: lipopoliszacharid
CBD: (-)-kannabidiol	MAGL: monoacilglicerol-lipáz
CBDV: (-)-kannabidivarin	MAPK: mitogén-aktiválta protein kináz
CBG: (-)-kannabigerol	MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid
CBGV: (-)-kannabigerovarin	NAAA: N-aciletanolamint hidrolizáló savamidáz
CBN: (-)-kannabinol	NAPE-PLD: N-acil-foszfatidil-etanolamin-specifikus foszfolipáz D
CCCP: karbonil-cianid m-klorofenil-hidrazon	NAT: N-acil-transzferáz
COX: ciklooxigenáz	NF- κ B: „nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells”
CREB: „cAMP response element-binding protein”	OEA: oleoil-etanolamin
DAGL: diacilglicerol-lipáz	PBS: foszfát-pufferelt sóoldat
DMSO: dimetil-szulfoxid	
eCB: endokannabinoid	

pCB: fitokannabinoid

p(I:C): poliinozin-policitidilsav

PKA: protein kináz A

PKB: protein kináz B (Akt)

PPAR: peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptor

PTPN22: „protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22”

SCR: scrambled RNS

STAT: „signal transducer and activator of transcription”

T: tesztoszteron

THC: (-)-*transz*- Δ^9 -tetrahidrokannabinol

THCV: (-)- Δ^9 -tetrahidrokannabivarin

TLR: Toll-like receptor

TRP: tranziens receptorpotenciálú ioncsatorna

TRPA: a tranziens receptorpotenciálú ioncsatornák „ankirin” alcsaládja

TRPM: a tranziens receptorpotenciálú ioncsatornák „melasztatin” alcsaládja

TRPV: a tranziens receptorpotenciálú ioncsatornák „vanilloid” alcsaládja

2. Bevezetés

Munkacsoportunk fő kutatási területe az emberi bőr különböző betegségeinek tanulmányozása és molekuláris hátterének feltérképezése, különös tekintettel az endokannabinoid rendszer (ECS) lehetséges szerepének vizsgálatára.

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a helyileg termelődő endokannabinoidok (eCB), mint az anandamid (AEA) és a 2-arachidonoil-glicerol (2-AG), a CB₂ receptor → extracelluláris szignál–regulált kináz (ERK)-1/2 mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) → peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptor (PPAR)- γ útvonal aktiválásával fokozzák a faggyúlipidek szintézisét. Kimutattuk azt is, hogy a humán szebociták mind mRNS, mind fehérje szinten kifejezik az eCB-ok szintézisében és lebontásában szerepet játszó kulcsenzimeket, az eCB membrántranszporter farmakológiai gátlása pedig (az eCB-tónus emelése révén) mérsékelten fokozta a faggyúlipid-termelést és gyulladáscsökkentő hatást eredményezett. Kísérleteink emellett arra a nemvárt eredményre vezettek, hogy az AEA és a 2-AG mellett a szebociták részt vesznek a „nem-klasszikus” eCB oleoil-etanolamid (OEA) metabolizmusában is. Tekintettel arra, hogy az OEA, illetve legfontosabb receptora, a GPR119 kifejeződéséről és lehetséges szerepéről a humán faggyúmirigyekben még nem állt rendelkezésre semmilyen irodalmi adat, kísérleteink első felében az OEA biológiai hatásait vizsgáltuk meg humán szebocitákon.

Kísérleteink második felében a bőr után egy másik fontos barrier, a szaruhártya ECS-ét vizsgáltuk meg. Ennek során humán korneális epitélisejtek segítségével arra a kérdésre kerestük a választ, hogy ezek a sejtek kifejezik-e az ECS tagjait, valamint, hogy az AEA hogyan befolyásolja a virális keratitist (Toll-like receptor 3 aktiváció), illetve fénykárosodást (UVB besugárzás) kísérő gyulladáisos választ *in vitro*.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A kannabinoid jelátvitel

3.1.1. Az endokannabinoid rendszer (ECS) főbb elemei

A *Cannabis sativa* (vadkender) az emberiség által az egyik legrégebben termesztett haszonnövény, mely már az ősi egyiptomi kultúrában is jelen volt (1). Empirikus alapon a történelem folyamán lényegében folyamatosan alkalmaztak különféle kenderkészítményeket különböző betegségek és kórállapotok kezelésére, valamint „sajátos” pszichés állapotok elérésére. A növényből származó biológiailag aktív hatóanyagokat vizsgáló tudományos igényű kutatás a XIX. században kezdődött el; ekkor azonosították ugyanis az első növényi, azaz fitokannabinoidot (pCB), a (-)-kannabinolt (CBN). Az 1930-as, 1940-es években már ismert volt a CBN szerkezete is, valamint azonosították a (-)-*transz*- Δ^9 -tetrahidrokannabinolt (THC) és a (-)-kannabidiolt (CBD) is (2). A fenti korai eredmények után az igazi áttörést az 1960-as években Raphael Mechoulam munkacsoportjának a felfedezései hozták, amelyekben pontosították a pszichotróp hatásokért döntően felelős THC szerkezetét, és módot találtak a THC szintetikus előállítására is (3). Ezen felismerések után egy hosszú vitafolyamat vette kezdetét arról, hogy mi lehet a THC élettani hatásának a mechanizmusa. Sokáig az volt az uralkodó nézet, hogy a THC és a pCB-ok (lévén, hogy erősen lipofil molekulák) egyszerűen a sejtmembránba oldódva és membránperturbációt okozva befolyásolják a sejtek működését. Ennek a vitának a végére tett pontot az első („CB₁”), majd néhány év múlva a második („CB₂”) kannabinoid kötésre képes receptor azonosítása (4,5). Ezt követően az 1990-es évek első felében sikerült azonosítani a receptorok első endogén ligandjait, az arachidonoil-etanolamin (ismertebb nevén „anandamid”*, AEA), illetve a 2-arachidonoil-glicerol (2-AG) néven ismertté vált „klasszikus” endokannabinoidokat (eCB) (6,7).

* A közismert „anandamid” elnevezés érdekessége, hogy a szanszkrit „ānanda” (आनन्द) kifejezésből származik, ami boldogságot jelent.

A modern kannabinoid kutatásban az ECS egy komplex jelátviteli hálózattá nőtte ki magát. Felépítésében a definíció szigorúságától függően akár több tucat endogén ligand, számos ezeket érzékelni képes metabotróp (pl. CB₁, CB₂, GPR55, GPR119 stb.), ionotróp (különböző tranziens receptorpotenciálú [TRP] ioncsatornák), illetve intranukleáris (PPAR) receptor, valamint a ligandok szintézisében és lebontásában résztvevő enzim- és transzporterrendszer vesz részt (**1. ábra**) (8–10). A helyzetet tovább bonyolítja, hogy a jólismert CBD-n és THC-n túl napjainkra már több mint száz „klasszikus” pCB, illetve számos egyéb, kémiai szerkezetükben eltérő, de receptoraffinitásuk alapján a kannabinoidokkal rokonítható „nem-klasszikus” pCB azonosítására került már sor (11). A különféle pCB-ok celluláris célpontjai között pedig olyan „nem kannabinoid” célpontok is szerepelhetnek, mint egyes opioid vagy éppen szerotonin receptorok (**1. ábra**) (8).

Ligands	Endocannabinoids (eCB) and related molecules			Other modulators	Phytocannabinoids
	“Classical” ligands Anandamide 2-Arachidonoylglycerol	Peptide ligands Pepcans	“ECS-related” molecules Palmitoylethanolamine Oleoylethanolamide	N-arachidonoyl amino acids, Pregnenolon, Lipoxin A4	“Classical” THC, THCV, CBD, CBN, CBG, CBGV, CBC, CBDV “Non-classical” e.g. β-caryophyllene, (-)-cis-PET
Receptors	“Classical” CB ₁ , CB ₂	Ionotropic TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1, TRPM8	“Novel” (?) GPR3, -6, -12, -18, - 55, -92, -119	Nuclear PPARα, PPARγ PPARδ	“Non-cannabinoid” targets 5-HT _{1A} , GlyR, A _{2A} , α ₂ R, 5-HT ₃ , μR, δR, A ₃
Enzymes	Synthesis DAGLα, DAGLβ, NAPE-PLD, PTPN22			Degradation MAGL, FAAH1, -2, ABHD6, ABHD12, NAAA, COX ₂ , LOX	
Transporters	Extracellular eCB transporters	eCB membrane transporter(s)?		Intracellular eCB transporters	

1. ábra Az ECS általános felépítése. A kép forrása: (8). A nem triviális rövidítések magyarázatát lásd a szövegben, illetve a Rövidítések jegyzékében.

3.1.2. A kannabinoid receptorok

A „klasszikus” kannabinoid receptorok 7 transzmembrán régióval rendelkező G-protein-kapcsolt metabotróp receptorok (12). Amint arról már szó esett, az első kannabinoid receptort, a CB₁-et az 1990-es évek elején azonosították (4). A CB₁-ről azóta kiderült, hogy a központi idegrendszerben az egyik legnagyobb gyakorisággal előforduló metabotróp receptorféleség, és

számos élettani folyamatot szabályoz (pl. étvágy, hangulati élet, memória stb.) (13). Későbbi kutatások során kimutatták, hogy a CB₁ receptor a központi idegrendszeren kívül számos perifériás szövetben is kifejeződik, így (a teljesség igénye nélkül) jelen van a gasztrointesztinális traktus, a máj, a szív, illetve a női és férfi reproduktív szervek, valamint a bőr bizonyos sejtfeleségein is (8). A CB₁ (és a vele szerkezetileg nagyfokú rokonságot mutató CB₂ receptor is) általában G_i/G_o fehérjéhez van kapcsolva, így aktivációja csökkenti a cAMP szintet (8). Mindkét receptorra jellemző, hogy nem kizárólag monomer, hanem homo- és heteromultimer formában (azaz más G-protein kapcsolt receptorokkal komplexet alkotva) is előfordulhat (8,14).

A CB₁ receptorral ellentétben a CB₂ inkább a perifériás szövetekben mutat magasabb kifejeződést (5,8,9,15). Jelen van egyebek mellett számos professzionális immunsejten (pl. makrofágokon, B limfocitákon vagy NK sejteken), így fontos szabályozó szerepet tölt be az immunválasz kialakításában (16), de emellett megtalálható a bőr számos sejtfeleségén is (8,9).

Amint arról már fentebb szó esett, az utóbbi évtized során számos kutatás alátámasztotta, hogy a különböző kannabinoid vegyületek a „klasszikus” receptorokon kívül számos más, korábban „árvareceptor”-ként azonosított 7 transzmembrán doménnel rendelkező receptort is aktiválhatnak, melyek között az egyik legismertebb a GPR119 (17). A GPR119 aktiválódása jellemzően G_s-fehérjéhez kapcsolt útvonalon keresztül emeli az intracelluláris cAMP szintet (18), ugyanakkor irodalmi adatok alapján jellemző rá, hogy ligandumtól függően különböző hatékonysággal több alternatív jelátviteli útvonalat is aktiválhat („elfogult agonizmus”) (19). Ezek között kiemelkedő jelentőséggel bír a β-arresztin útvonal, amely nemcsak a G-fehérje-kapcsolt receptorok deszenzitizálásáért felelős, hanem (egyebek mellett) az ERK1/2 MAPK kaskád aktiválására is képes (20). Ezzel összhangban, egy nemrégiben megjelent tanulmányban kimutatták, hogy az oleoil-lizofoszfátidil-inozitolnak a glükagonoszerű peptid (GLP)-1 szekrécióra gyakorolt hatásait L-sejteken a GPR119 közvetítette, mégpedig az

ERK1/2 MAPK és a cAMP – protein kináz A (PKA) – „cAMP response element-binding protein” (CREB) útvonalak aktiválása révén (21), míg egy másik tanulmány tanúsága szerint a GPR119 aktiválását Ca^{2+} -szint emelkedés is követheti (22).

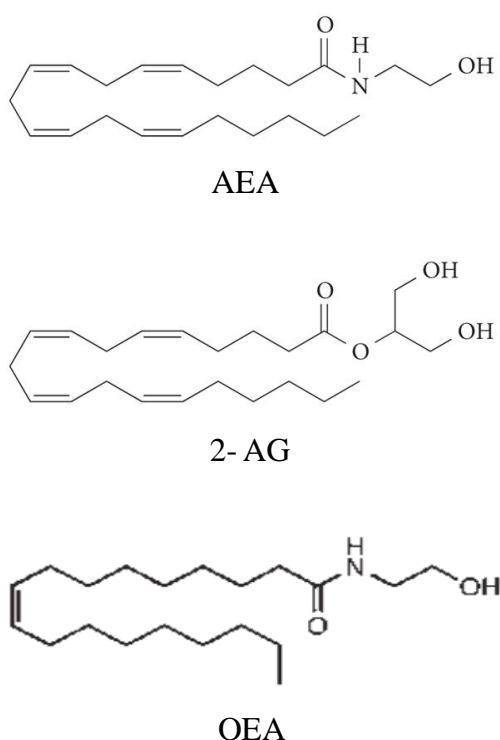
Kezdetben a GPR119-et „árvareceptor”-ként klónozták (23), és úgy találták, hogy expressziója a hasnyálmirigyben és a gyomor-bélrendszerben a leginkább kifejezett, ezen belül is az inzulint szekretáló β -sejtekben és a GLP-1-termelő L-sejtekben a legmagasabb (24–28). Emellett nagymértékű expressziója figyelhető meg a glükózdependens inzulinotróp peptidet, a kolecisztokinint, a glükagont, valamint a pankreatikus polipeptidet termelő K-, I-, α -, illetve PP sejtekben, de kimutatták már rágcsálók agyában és emberi májban is (28–34). Mindezek fényében nem meglepő, hogy az elmúlt években több különböző aktivátorát is tesztelték már kettes típusú cukorbetegség kezelését célzó klinikai vizsgálatokban (pl.: NCT01043445; NCT01453842; NCT04432090; NCT03774095; (35,36))[†]; arról azonban, hogy a bőrben kifejeződik-e, kísérleteink idején még nem állt rendelkezésre irodalmi adat.

3.1.3. Az eCB-ok

Amint arról fentebb már szó esett, a „klasszikus” kannabinoid receptorok azonosítását követően néhány évvel később izolálták az első „klasszikus” eCB-okat, az AEA-ot és a 2-AG-t (6,7). Az AEA prekursora az N-arachidonoil-foszfátidil-etanolamin, aminek az átalakulását az N-acil-transzferáz (NAT) katalizálja, a végleges szerkezet kialakítását pedig az N-acil-foszfátidil-etanolamin specifikus foszfolipáz D (NAPE-PLD) végzi. A vegyület lebontásáért felelős legfontosabb enzim a zsírsavamid-hidroláz (FAAH), amely az AEA-ot arachidonsavra és etanolaminra bontja (37,38). A másik prototipikus eCB, a 2-AG szintézisében elsősorban a diacilglicerol-lipáz (DAGL)- α és - β játszik szerepet, az arachidonsavra és a glicerolra történő lebontásáért pedig döntően a monoacilglicerol-lipáz (MAGL) felel (37,38).

[†] Sajnálatos módon az ígértes állatkísérletes eredmények ellenére humán vizsgálatokban a GPR119 aktivátorok eleddig nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket (36).

A „klasszikus” eCB-ok (2. ábra) jellemzően nem raktározódnak, hanem a szükségleteknek megfelelően termelődnek és szabadulnak fel a szervezetben (39). Érdekes módon, bár lipofil molekulákról van szó, transzmembrán transzportjuk minden valószínűség szerint facilitált diffúzióval történik, amit egy mind ez ideig fehérje szinten még nem azonosított, hipotetikus transzporter molekula, az eCB membrántranszporter (EMT) (40)[‡] mediál.



2. ábra Az AEA, a 2-AG és az OEA szerkezete (41)

Különbféle funkcionális assay-k adatai alapján az EMT számos szövet- és sejtféleségben jelen lehet. Munkacsoportunk közelmúltban publikált adatai szerint ezen sejtek közé tartoznak a faggyúmirigyek (FM) sejtei, a szebociták is. Az EMT biológiai hatásainak vizsgálatakor ráadásul kimutattuk azt is, hogy farmakológiai gátlása nemcsak a „klasszikus” eCB AEA, hanem egy „eCB-szerű” molekula, az OEA szintjét is fokozza (39). Az OEA-t eredetileg

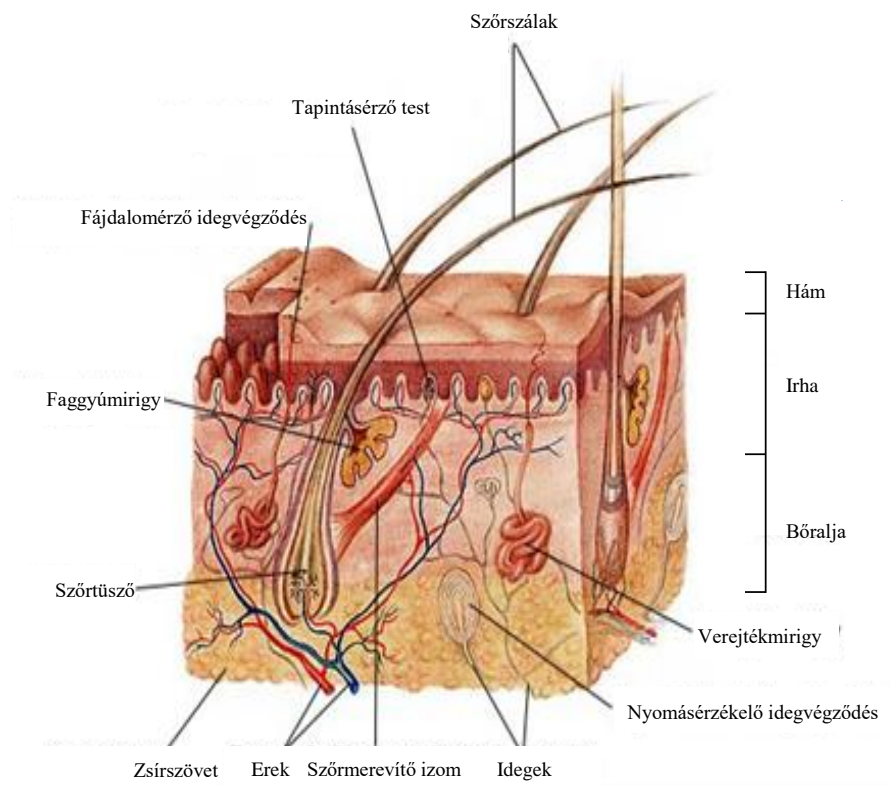
[‡] Bár magát a molekulát még nem azonosították, az EMT létezésére meggyőző funkcionális adatok utalnak (40), és léteznek szelektív farmakológiai inhibitorai is (a szabadalmi bejegyzés azonosítója: US10414721B1).

anorexigén lipidként írták le, amely testsúlycsökkenést idéz elő különféle rágszálómodellekben (42–44), később pedig kiderült róla, hogy hatásait több lehetséges célpontot (TRPV1, PPAR α , illetve GPR119) aktiválva is kifejezheti (45–50), a bőrben játszott lehetséges szerepéről azonban kísérleteink idején még nem állt rendelkezésre irodalmi adat.

3.2. A bőr

3.2.1. A bőr, mint barrier

A bőr (**3. ábra**) a maga mintegy 1,8 m²-es felszínével (átlagos felnőtt) az emberi test egyik legnagyobb szerve. Amellett, hogy egy jól felépített védőpajzsként szolgál a potenciálisan veszélyes fizikokémiai és biológiai ártalmakkal szemben, fontos szerepe van a szervezet hő- és a vízháztartásának szabályozásában is. Emellett képes különféle hormonok termelésére, valamint tápanyagraktárként és érzékszervként is funkcionál (51).



3. ábra A bőr szerkezete és felépítése (52)

Szövettanilag a bőrt három nagyobb rétegre oszthatjuk: epidermisz (hám), dermisz (írha) és szubkutisz (bőralja) (51). A már említett összetett védelmi feladatait fizikokémiai, immunológiai, illetve mikrobiológia barriert létrehozva látja el. A fizikokémiai barrier legfontosabb összetevője az epidermisz, azon belül is a stratum corneum. Ezen réteg terminálisan differenciált keratinocitákból áll, melyeket egy extracelluláris lipidmátrix vesz körül (53). Ezen protektív lipidrétet egészíti ki a faggyúmirigyek által termelt és a bőrfelszínre juttatott olajos, viaszos faggyú (szébum) (54–57). A mikrobiológiai barriert a bőrünkön élő „hasznos” mikroorganizmusok hozzák létre (58,59). Ezek a mikrobák egyfelől a kolonizációs rezisztencia révén kiszorítják a potenciális patogéneket, másfelől pedig folyamatosan kommunikálnak a bőr különböző sejtjeivel és szabályozzák azok működését: segítik egyebek mellett a megfelelő hámsejtérést, illetve befolyásolják a bőr különböző sejtjeinek immunológiai viselkedését is (60,61). Az immunológiai védőfunkció a bőrben megtalálható rezidens sejtípusok (pl. keratinociták, szebociták stb.) és az adaptív immunrendszer tagjainak szoros együttműködése révén valósul meg. Fontos megjegyezni, hogy a bőr sejtjei kifejeznek számos patogén-asszociált molekuláris mintázatot felismerő receptort (pl. különféle Toll-like receptorokat [TLR] stb.), illetve antimikrobiális peptidek (AMP) és lipidek (AML) mellett citokineket és kemokineket is termelnek, amelyek révén szabályozhatják a professzionális immunsejtek toborzását és aktivitását, így magát az immunválaszt is (54,62–65).

3.2.2. *A faggyúmirigyek*

Munkacsoportunk évek óta foglalkozik az emberi bőr élettani folyamatainak különböző aspektusaival, beleértve a különféle bőrfüggelékek, így a faggyú- és a verejtékmirigyek, valamint a szőrtüszők vizsgálatát is. A faggyúmirigyek jellemzően a szőrtüszőkhöz kapcsolódnak, és holokrin szekrécióval folyamatosan faggyút bocsátanak a bőrfelszínre (66,67). A felszabaduló faggyú a szőracsatornán keresztül jut a bőrfelszínre, és védőréteget

képez az epidermisz és a szőrszálak körül. A faggyú emellett antimikrobiális és antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkezik, illetve (zsírsavtartalma révén) hozzájárul[§] a „savköpeny” kialakításához is (54,68–71), egyes faggyúlipidek pedig képesek befolyásolni a perifollikuláris makrofágok és egyéb immunsejtek aktivitását is (72–74).

A fentiek fényében könnyen érthető, hogy a faggyútermelés mellett a faggyúmirigyek immunológiai szerepe is számottevő. A szebociták számos patogén-asszociált molekuláris mintázatot felismerő receptorral rendelkeznek (pl. TLR-ok, CD14 stb.), melyek képesek felismerni a különféle patogéneket (70,75). Emellett számos gyulladáshoz köthető citokin (pl. interleukin [IL]-6, IL-8, tumor nekrozis faktor- α stb.) felszabadítása révén jelentős szerepet játszanak a lokális gyulladáshoz köthető folyamatok elindításában és szabályozásában, és termelnek AMP-eket (pl. LL-37 katelicidin, β -defenzinek stb.), illetve AML-eket is (pl. szapiénsav, palmitinsav [C16:1], olajsav [C18:1], laurilsav [C12:0] stb.) (62–65).

A faggyú emellett (a verejték viszkozitását befolyásolva) részt vesz a hőszabályozásban, és hozzájárul a bőr fénykárosodással szembeni védelméhez, valamint hatással van a szőrnövekedésre is (76). Végezetül azt is fontos megemlíteni, hogy a faggyúmirigyek expresszálják a szteroidszintézishez szükséges enzimeket, és képesek androgén hormonok *in situ* termelésére, valamint őssejttraktároként is funkcionálnak (56).

A fenti, sokrétű feladatok fényében nem meglepő, hogy a faggyúmirigyek működésének zavarai szerepet játszanak különböző bőrbetegségek patogenezisében (71,77–79). A fokozott mennyiségű és/vagy megváltozott minőségű faggyútermelés az egyik leggyakoribb bőrbetegség, az akne egyik fő jellemzője (80), míg a faggyúmirigyek atrófiája egyebek mellett pikkelysömörös léziókban fordul elő (81).

[§] Újabb adatok alapján ez a hozzájárulás kevésbé tűnik jelentősnek, mint azt korábban feltételezték (68).

Amint arról fentebb már szó esett, a faggyútermelés holokrin szekréció révén valósul meg. Ennek során a sejtek előbb lipideket halmoznak fel a citoplazmájukban, majd apoptotizálnak, és a membránjaik széttöredeznek. A faggyú összetétele erősen fajspecifikus. Az emberi faggyú lipidfrakciójának fő összetevői a trigliceridek, a digliceridek és a szabad zsírsavak (~57,5%), kisebb mennyiségben pedig viaszészterek (~26%), szkvalén (~12%) és koleszterin (~4,5%) is előfordul benne (82). Más fajoknál egyes összetevők vagy hiányoznak (például a szkvalén) vagy eltérő mennyiségben vannak jelen (69). A lipidek mellett jelentős fajspecifikus különbségek vannak a faggyúmirigyek szerkezetét és a szövettani markereit illetően is (83,84). Vélhetőleg döntően ezek az eltérések magyarázzák, hogy miért különböznek a faggyúmirigyhez társuló betegségek az egyes fajok között, és miért (szinte)** kizárólag az emberekre jellemző az akne kialakulása.

3.2.3. Az akne

Az akne a faggyúmirigyekhez köthető legismertebb, legjellemzőbb bőrbetegség. Egyes becslések szerint világszerte ez a 8. leggyakoribb betegség (87), amely csak az Egyesült Államokban évente közel 50 millió embert (főleg serdülőket és fiatal felnőtteket) érint (88). A betegség hosszú távú következménye lehet maradandó hegek, illetve pigmentációs zavar kialakulása. Az akne természetesen nem okoz közvetlenül életveszélyt, de (különösen a súlyos formái) nagymértékben ronthatják a betegek életminőségét, és másodlagos pszichés zavarok kialakulásához vezethetnek (89). A serdülőkor köztudottan olyan időszak, amely különösen sok pszichés zavarral, szorongással jár, és a serdülők hajlamosak arra, hogy érzékenyen reagáljanak testüket és megjelenésüket érintő változásokra. Nem meglepő módon a pattanásosság kialakulása rontja a serdülők életminőségét, és hatással van az önértékelésükre is (90,91). A pattanásos fiatalok elégedetlenek a testükkal, gyakran haszontalannak érzik magukat, és

** Kutya és macska esetében előfordulhatnak aknéra hasonlító elváltozások, de ezek kialakulásának mechanizmusa nem teljes mértékben tisztázott, és vélhetőleg bizonyos elemeiben különbözik az emberre jellemző akne esetén megfigyelhetőtől (85,86).

kevésbé büszkék magukra, mint egészséges társaik (92). Az akne emellett szorongás, depresszió, valamint (súlyos esetben) akár öngyilkossági gondolatok megjelenéséhez is vezethet (93). Ráadásul az akne kezelésére világszerte elköltött pénz 2027-re egyes becslések szerint eléri majd az évi 7,19 milliárd USD-t (94), így a pszichés mellett adott esetben jelentős anyagi terhet is jelenthet a benne szenvedőknek.

Az akne kialakulásában több egymással összefüggő tényező vesz részt. Ezek közül a legfontosabbak a megváltozott mennyiségű és minőségű faggyútermelés, a patogén *Cutibacterium* (korábban *Propionibacterium*) *acnes* törzsek kolonizációja, a faggyúmirigyek kivezetőcsöveinek hiperkeratinizációja, illetve kóros gyulladási folyamatok elindulása (95–99). A *C. acnes* a normál bőrflóra része, azonban a különböző *C. acnes* törzsek képesek a keratinociták, makrofágok és szebociták esetében is indukálni egyes gyulladási citokinek (pl. IL-1 β , IL-8 és IL-17) termelődését (96–99). A megnövekedett citokintermelés ezután tovább fokozza a faggyútermelést, illetve hozzájárul a kivezetőcső hiperkeratinizációjához és ezzel a komedók kialakulásához is (54,70).

Amint arról már fentebb szó esett, a faggyútermelés nemcsak mennyiségében fokozódik, hanem minőségében is megváltozik. Ezek a változások (pl. a fokozott zsírsav-deszaturáció, a lipidperoxidok jelenléte, valamint a faggyú E-vitamin tartalmának csökkenése) szintén elősegítik az infundibuláris hiperkeratinizációt és ezzel a komedók kialakulását. Végezetül a komedóképződés elősegíti az anaerob (aerotoleráns) patogén *C. acnes* törzsek további szaporodását, ami további gyulladási folyamatokat indít el. Ezek a folyamatok tovább növelik a faggyútermelést, és ezzel bezárják a patogenezis „ördögi kör”-ét (**4. ábra**) (54,70,95).



4. ábra Az akne klinikai képe

A kép forrása: <https://step2.medbullets.com/dermatology/120041/acne-vulgaris> Letöltve: 2021.04.12.

Az aknéban szenvedő betegek a bőrelváltozások száma és típusa alapján enyhe, közepes vagy súlyos kategóriába sorolhatók. Kezelésükre több készítmény is a rendelkezésre áll; a megfelelő kezelés kiválasztása a betegség súlyosságán és az adott szer tolerálhatóságán alapul. Jelenleg az akne kezelésének a gerincét a lokális és/vagy szisztémás izotretinoin (13-*cis*-retinsav) kezelés jelenti, melyet (a hegeképződés veszélyének csökkentésére) az újabb adatok alapján érdemesnek tűnik a betegség minél korábbi fázisában alkalmazni. Az izotretinoin képes gátolni az akne kialakulásának minden lényeges mozzanatát, így a fokozott faggyútermelést, a hiperkeratinizációt és a kóros gyulladást is; sőt, még a *C. acnes* kolonizációt kedvező irányba befolyásolja. Használatát azonban sajnálatos módon komoly mellékhatások (pl. a vérlemezkeszám csökkenése, allergiás reakciók, bőrszárazság, fényérzékenység, májkárosodás, teratogenitás vagy pszichés problémák) kísérhetik (70,100–102). Az izotretinoin mellett (illetve esetenként helyett) természetesen más gyógyszerek (pl. antibiotikumok, anti-androgének, azelainsav, benzoil-peroxid stb.), és egyéb terápiás megoldások (pl. lézerterápia, fényterápia, kémiai hámlasztás) is szóba jöhetnek (88), ezek terápiás értéke azonban jellemzően elmarad az izotretinoinétól. Tekintetbe véve az izotretinoin fentebb részletezett lehetséges mellékhatásait, könnyen érthető, hogy jelentős igény mutatkozik új, hatékony, de lehetőleg kedvező mellékhatásprofilú szerek azonosítására, ami viszont nem képzelhető el a

faggyúmirigyek biológiájának jobb megismerése nélkül. Mindezek dacára érdekes módon az elmúlt két évtizedben nem törzkönyveztek új hatásmechanizmussal működő anti-akne készítményt az Egyesült Államokban (103).

3.2.4. Az SZ95 humán, immortalizált sebocita sejtvonal

A humán faggyúmirigyek vizsgálatára sajnálatos módon nem áll rendelkezésre megfelelő állatmodell (104); a primer humán sebociták pedig természetes differenciálódásuk során apoptotikus sejthalálfolymaton mennek keresztül, és végül a sejtek egésze faggyúvá alakul (holokrin szekréció) (70). Mindezek alapján érthető, hogy a primer sebocitákat izolálásukat követően csupán néhány passzázsra lehet tenyészteni, ami jelentősen korlátozza a kísérletes célokra elérhető maximális sejtszámot (105). A probléma kiküszöbölésében és ezzel a sebociták biológiájának jobb megismerésében hatalmas szerepe volt Christos C. Zouboulisnak és munkatársainak, akik egy 87 éves nő arcbőréből sikeresen izoláltak sebocitákat, melyeket SV40 vírus „T” antigénjével transzfektálva immortalizáltak, így létrehozva az első humán sebocita sejtvonalat, amit „SZ95”-nek neveztek el (106).

Az elmúlt évtizedek során az SZ95 sebociták a humán faggyúmirigyek jó modelljének bizonyultak, hiszen megtartották a primer humán sebociták főbb tulajdonságait (pl. morfológia, faggyúlipid-összetétel, antigénexpressziós-profil stb.) (105–107), és a primer sebocitákhoz hasonlóan reagálnak androgén, valamint retinoid kezelésre (106,108,109). Immundeficiens egerekbe xenotranszplantálva emellett képesek voltak faggyúmirigyszerű struktúrákat létrehozni (110).

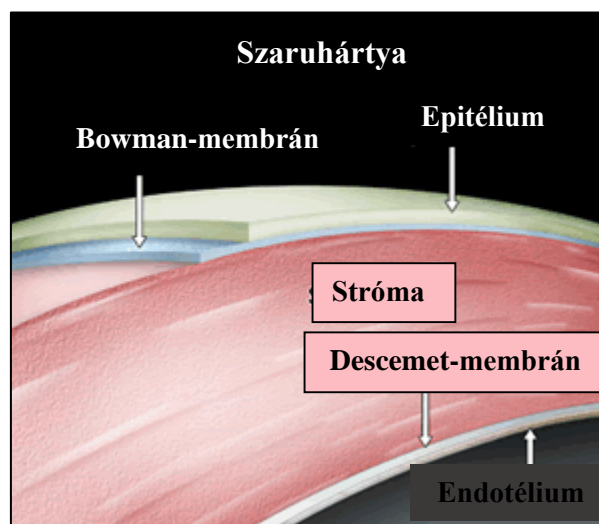
Az évek során más munkacsoportok is létrehoztak immortalizált sebocita sejtvonalakat (SEB-1, illetve Seb-E6E7), és az eddigi eredmények alapján az ezek felhasználásával szerzett adatok nem mutatnak lényeges eltérést az SZ95 sebociták vizsgálatával nyertektől (54,56,107). Mivel munkacsoportunk az évek során számos alkalommal használta sikerrel az

SZ95 szebocitákat (39,111–116), a jelen dolgozat alapjául szolgáló kísérletek során is ezzel a sejtvonallal dolgoztunk.

3.3. A szaruhártya

3.3.1. A szaruhártya felépítése

A szaruhártya (kornea) a szemgolyó külső védőburkának az elülső, áttetsző része. A szem szaruhártyájának fontos funkciói közé tartozik a szem belsejében levő struktúrák védelme, emellett pedig kulcsszerepe van a szembe belépő fény törésében is, hiszen körülbelül 40–44 D a fénytörési képessége, amely a szem teljes törőerejének kb. 65-70%-át teszi ki (117). A szaruhártya átlátszó, élettani esetben avaszkuláris szövet (118). Kívülről befelé haladva 5 rétegre oszthatjuk: a többrétegű, el nem szarusodó hámból álló korneális epitéliumra, a Bowman-hártyára, a strómára, a Descemet-membránra és az egyrétegű endotéliumra (119) (5. ábra).



5. ábra A szaruhártya felépítése sematikusán

A kép forrása: <http://www.corneabank.hu/corn=5.php> (letöltve: 2020.03.08.).

A korneális epitélium körülbelül 50 µm vastagságú, 5-6 sejtsorból álló el nem szarusodó laphám, a bazális rétegben henger alakú, a felszín felé egyre laposabb sejtekkel, ami egy egységes, sima felületet biztosít (117). Az epitélium külső felszínén lévő könnyréteg mucin

komponensét a kötőhártya kehelysejtjei termelik (120). A szaruhártya epiteliális sejtjeinek élettartama 7-10 nap. A korneális epitél strukturális integritását tight junction-ök, valamint további sejtkapcsoló komplexumok (dezmoszómák, gap junction-ök, illetve adharens junkciók) biztosítják. A korneális epitélium bazális sejtsora az alatta található bazális membránnal hemidezmoszómákon keresztül létesít kapcsolatot, amelyek megakadályozzák az epitélium leválását az alatta lévő rétegekről (121). A következő réteg a Bowman-membrán. Vastagsága átlagosan 6-9 μm , jellemzően I-es és V-ös típusú kollagén, valamint a proteoglikánok építik fel. Fő feladata a stróma védelme; regenerációra nem képes, így amennyiben a kornea sérülései ezt a réteget is érintik, az a szaruhártya átlátszóságának maradandó károsodásával jár (122). A Bowman-membrán alatt található a stróma; ez teszi ki a szaruhártya vastagságának közel 80-85%-át. Átlátszóságát a benne található rostok és egyéb extracelluláris mátrix elemek, valamint a keratociták precíz elrendeződésének köszönheti (123). Az alatta található réteg a Descemet-membrán, mely voltaképp az endotélsejtek bazális membránja. Ez a Bowman-membránnál vékonyabb hártya a strómához hasonlóan szabályszerűen elrendezett, főként az I-es típusú kollagénrostoknál kevésbé merev, IV-es típusú kollagénrost-rétegekből áll (124). A szaruhártya legbelső rétege az egyrétegű endotél, mely az elülső csarnokot határolja előlről (125). Az endotélsejtek képezik a csarnokvíz-kornea gátat, és nagyfokú Na^+/K^+ -pumpa aktivitásuk révén kivonják a fölösleges folyadékot a szaruhártyából, amivel elősegítik a kornea normál, dehidrált állapotának fenntartását (126).

3.3.2. A humán korneális epitélium (kór)élettanának a disszertáció szempontjából releváns vonatkozásai

A korneális epitélsejtek a szaruhártya legkülső rétegét alkotják, így ezen sejtek találkoznak először a külvilágból érkező ingerekkel, fizikokémiai hatásokkal, mikrobákkal. Ezek a sejtek a fizikai és immunológiai barrier létrehozásával nemcsak passzív elszenvedői ennek a találkozásnak, hanem ennek nyomán különféle válaszokat adnak, pl. citokineket és

kemokineket termelnek, amelyek befolyásolják a lokális gyulladási folyamatokat (127). A szaruhártya epitéliumának károsodása gyulladást válthat ki, ami a barrier károsodásához, vagy - ha a károsodás kiterjedtebb – akár a kornea beereződéséhez is vezethet, ami a látás elvesztését eredményezheti (127). Mindezek fényében nem meglepő, hogy a kornea gyulladási folyamatai, illetve a szaruhártya reepitelizációja egy intenzíven tanulmányozott, komoly kihívást jelentő területe a kísérletes szemészetnek (128–130).

A szaruhártya gyulladási válaszában fontos szerepet játszik a tranzien receptorpotenciálú (TRP) ioncsatornák vanilloid alcsaládjába tartozó (ionotróp kannabinoid receptorként is funkcionáló (8)) TRPV1, ami kifejeződik a kornea trigeminális idegvégződéseiben (131) és a korneális epitelsejteken is, ahol a csatorna aktivációja súlyosbíthatja a szaruhártya gyulladási folyamatait (132). A TRPV1 egy dominánsan Ca^{2+} -ra permeábilis, nem-szelektív kationcsatorna (133), amit fizikai és kémiai stimulusok széles spektruma képes aktiválni (134), és testszerte központi szerepet játszik a fájdalomérzet és a gyulladási folyamatok kialakításában (135). Ennek fényében nem meglepő, hogy a szaruhártyán betöltött szerepét vizsgálva a közelmúltban kimutatták, hogy a TRPV1 aktiválása fokozza egyes gyulladási citokinek és kemokinek kifejeződését a szaruhártya epitelsejtjein (132). Azt, hogy a TRPV1 milyen fontos szerepet játszik a szaruhártya gyulladási és a sebgyógyulási folyamataiban az is alátámasztja, hogy TRPV1-et nem expresszáló állatok esetében nem alakult ki kóros gyulladás és fibrózis lúg indukálta korneasérülés esetén (136). Ezen adatok alapján a TRPV1 ígéretes terápiás célpont lehet a szemet érintő gyulladási folyamatok kezelése során.

A gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító kezelések egy másik ígéretes, „nem konvencionális” módja lehet különböző kannabinoidok és kannabisz készítmények alkalmazása (8,137). Régóta ismert, hogy a különböző kannabisz készítmények a szaruhártyán fájdalomcsillapító hatásúak, olyannyira, hogy az ezt kihasználó Gayer-tesztet (138) évtizedekig

alkalmazták a marihuána kivonatokból származó hatóanyagok biológiai hatásereőségének tesztelésére (139,140).

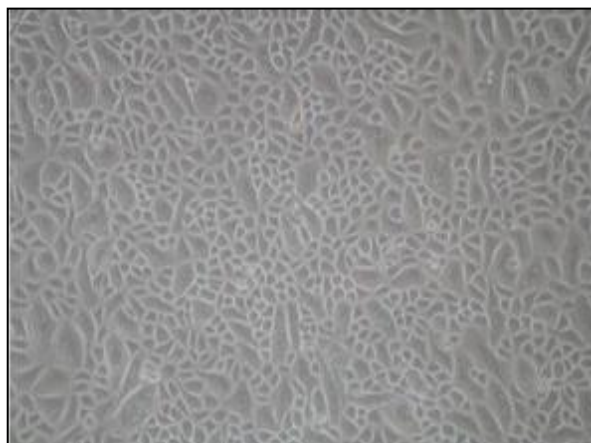
Természetesen a fenti, ma már inkább csak tudománytörténeti jelentőséggel bíró adatokon túl újabb eredmények is szólnak amellett, hogy a kannabinoid rendszer egyes tagjai jelen lehetnek a korneában. Valóban; irodalmi adatok alapján a CB₁ kifejeződik humán korneális epitélisejteken (141). A CB₁ aktiválása a WIN55,212-2 nevű szintetikus agonistával, illetve AEA-dal fokozta a sejtek intracelluláris kalciumkoncentrációját, a hatás pedig nagy valószínűséggel a TRPV1 közvetett aktiválása révén alakult ki, hiszen a TRPV1 antagonistá kapszazepin alkalmazásakor nem alakult ki (141). Bár ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy az epidermális keratinocitákhoz hasonlóan (142) a CB₁ és a TRPV1 biológiai aktivitása bizonyos esetekben együttesen, szekvenciálisan összekapcsolódva érvényesülhet, más adatok azt sugallják, hogy eltérő biológiai hatások kialakulásához is vezethet az aktivációjuk a szaruhártya epitélisejtjeiben. Ez utóbbi elképzeléssel összhangban Yang és munkatársai kimutatták, hogy a szelektív TRPV1 aktivátor kapszaicinnel történő kezelés elősegíti bizonyos gyulladásos citokinek felszabadulását ezekben a sejtekben. Ez a hatás CB₁-függő módon gátolható bizonyult, mivel a CB₁ antagonistá AM251 jelenlétében az AEA gyulladáscsökkentő hatása nem alakult ki (141). Tekintettel arra, hogy az AEA más eCB-okkal együtt jelen van a humán korneális epitélisejtekben (143), ezek az eredmények arra utalnak, hogy az AEA-függő CB₁ aktiváció egy folyamatos gyulladáscsökkentő tónust alakíthat ki ezeken a sejteken.

A fenti hipotézis továbbgondolása izgalmas kérdéseket vet fel a kornea ECS-ével kapcsolatban. Minthogy a szaruhártya élettani körülmények között egy avaszkuláris szövet, az itt kimutatott eCB-ok nem származhattak a keringésből, ami arra utal, hogy a kornea egyes sejtjei képesek lehetnek az eCB-ok *de novo* szintézisére, azonban az eCB-ok metabolizmusában részt vevő enzimrendszer tagjainak kifejeződéséről kísérleteink idején még nem állt

rendelkezésre irodalmi adat. Mindezek fényében a korneális epitéliumot érintő kísérleteink során a célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az eCB-metabolizmus legfőbb enzimeinek a kifejeződését a szaruhártyában, illetve, hogy klinikailag releváns gyulladáscsökkentő körülmények között tanulmányozzuk az AEA esetleges gyulladáscsökkentő hatását. Ez utóbbi cél eléréséhez UVB besugárzást (144,145), valamint (a virális keratitiszeket modellezendő) TLR3 aktivátor poliinozin-policitidilsav (p(I:C)) kezelést (146) alkalmaztunk.

3.3.3. A humán korneális epitélsejtek in vitro modellje: a humán, immortalizált korneális epitélsejtek (HCEC-ek)

A humán korneális epitélium vizsgálatát nehezíti, hogy a sejtek primer tenyésztéséhez lényegében lehetetlen hozzájutni, a különféle állatmodellek használata pedig nehézkes, ráadásul a „3R” elv értelmében az állatkísérleteket ideálisan meg kell előznie valamilyen egyszerűbb, sejttes modellben történő vizsgálatnak. Mindezen kihívásokat tekintetbe véve jelen kísérleteinket egy rekombináns SV40-adenovírus vektor segítségével immortalizált humán korneális epitélium eredetű sejtvonalon (HCEC) végeztük (147). A felhasznált HCEC-ek még hosszú tenyésztést követően is képesek voltak megőrizni a primer korneális epitélsejtekre jellemző morfológiai és funkcionális sajátosságait (pl. keratinexpressziós profil stb.) (147), így egy jól működő, elfogadott modellnek számítanak (**6. ábra**).



6. ábra A HCEC sejtvonalon fázis-kontraszt mikroszkópos képen
kép forrása: (148)

4. Célkitűzés

A fentiek fényében a jelen dolgozatban bemutatandó vizsgálatok keretein belül a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Milyen hatást gyakorol az OEA a humán szebociták biológiai folyamataira, és mi a hatás mechanizmusa?
2. Az ECS mely tagjai vannak jelen humán korneális epitélisejteken?
3. Milyen hatást gyakorol az AEA kezelés a HCEC-ek UVB irradiációra, illetve TLR3 aktivációra adott gyulladássos válaszaira?

5. Anyagok és módszerek

5.1. A kísérletek során felhasznált kémiai ágensek áttekintése

A kísérletek során alkalmazott OEA-ot, AEA-ot és a STAT5-inhibítort (2-[(4-oxo-4H-1-benzopiran-3-yl)metilén]hidrazid 3-piridinkarboxilsav; [STAT5_i]) a Cayman Chemical Company-tól (Ann Arbor, MI, USA) vásároltuk. Az *Escherichia coli* 026:B6-ból származó, γ -besugárzott lipopoliszacharidot (LPS), az arachidonsavat (AA), a linolsavat (LA) és a tesztoszteront (T) a Sigma-Aldrichtól (St. Louis, MO, USA) szereztük be. A PD 98059-et (ERK1/2 MAPK-inhibitor) (149) a Calbiochemtől (Darmstadt, Németország), míg a SU 3327-et (JNK-inhibitor) (150), a GSK 690693-at (Akt/PKB-inhibitor) (151), a 666-15 vegyületet (CREB-inhibitor) (152) és a GW 6471-et (PPAR α -antagonista) (153) a Tocristól (Bio-Techne R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) vásároltuk. Az OEA-ot, AEA-ot, LA-at és AA-at abszolút etanolban oldottuk (VWR International Kft, Radnor, Pennsylvania, USA), míg a dimetil-szulfoxid (DMSO; VWR International Kft.) volt a PD 98059, a SU 3327, a GSK 690693, a 666-15 vegyület, a STAT5_i és a T oldószere. Az LPS-t szűrt desztillált vízben oldottuk fel. A korneális epitelsejteken végzett kísérletekhez a p(I:C)-t az Invivogentől vásároltuk (San Diego, CA, USA), és nukleázmentes vízben oldottuk fel.

Annak érdekében, hogy kizárhassuk az esetleges nem-specifikus oldószerekhatásokat, minden anyagból ezerszeres töménységű törzsoldatot készítettünk, amiket a gyártó javaslata alapján -20°C-on vagy 4°C-on tároltunk. A törzsoldatokból közvetlenül a kezelés előtt készítettük el a szükséges munkaoldatokat a sejtek tápoldatában ezerszeres hígítást alkalmazva, és ügyelve arra, hogy az összehasonlítható kezelések mindig azonos „oldószerekhátteren” valósuljanak meg. Ezzel összhangban vizsgálataink során kontrollként minden esetben az anyagok oldószereivel megfelelő hígításban kezelt sejteket használtunk.

5.2. Sejttenyésztés

A SZ95 tenyésztő médiuma a Sebomed™ Basal Medium (Biochrom, Berlin, Németország) volt, melyet 10 (V/V)% hővel inaktivált magzati szarvasmarha szérummal (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 1 mM CaCl₂-dal (VWR International Kft.) és 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktorról (Sigma-Aldrich), valamint MycoZap™ Plus-CL-lel (1:500; Lonza, Bázél, Svájc) egészítettük ki. A tápoldatot minden második napon cseréltük, és a konfluencia indukálta differenciálódás elkerülésére 60-70%-os konfluencia szintnél passzáltuk a tenyészeteket.

A HCEC-ek (147) tenyésztő médiuma 1:1 arányú Ham's F12 és Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) keveréke volt, melyet 6 (V/V)% hővel inaktivált FBS-sel (Thermo Fisher Scientific), 1 mM CaCl₂ (VWR International Kft.), 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktorról (Sigma-Aldrich), valamint MycoZap™ Plus-CL-lel (1:500; Lonza) egészítettük ki.

Bár az alkalmazott antibiotikum hatékony védelmet jelent a *Mycoplasma* fertőzéssel szemben, a tenyészetek *Mycoplasma* státuszát rendszeresen ellenőriztük MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit segítségével (Lonza), és minden esetben negatív eredményt kaptunk. A tenyésztést mindkét sejttípus esetében 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú, párasított légtérben végeztük. A sejtek tenyésztését *Angyal Ágnes*, *Dr. Markovics Arnold*, *Pénzes Zsófia*, *Shahrazad Alimohammadi*, *Horváth Dorottya* és *Dr. Magi József* végezte.

5.3. A szebociták intracelluláris lipidtartalmának meghatározása

Az intracelluláris lipidtartalom szemikvantitatív meghatározására fluoreszcens Nile Red jelölést alkalmaztunk. A sejteket 20.000 sejt/lyuk denzitásban vittük fel speciális, fluoreszcens mérésekhez optimalizált („black well/clear bottom”) 96 lyukú lemezekre (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország), majd elvégeztük a megfelelő kezeléseket. A felülúszó eltávolítása után a sejteket kétszer mostuk foszfát-pufferelt sóoldattal (PBS; 115 mM NaCl, 20

mM Na₂HPO₄, pH 7,4; mindegyik a Sigma-Aldrich-tól) majd 100 µl PBS-ben oldott Nile Red oldatot (Sigma-Aldrich) mértünk a sejtekre (végkoncentráció: 1 µg/ml), és 30 percen keresztül 37°C-on inkubáltuk őket. Az egyes lyukak fluoreszcencia intenzitását „well scan” üzemmódban, kilenc elkülönülő mérési pont adatait átlagolva mértük le FlexStation 3 készülék (Molecular Devices, San Francisco, CA, USA) segítségével (excitáció: 485 nm; emisszió: 565 nm). Minden kezelést legalább négy ismétléssel végeztünk; a kapott eredményeket a kontroll százalékában, átlag±SEM formában adtuk meg. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold, Ádám Dorottya, Tóth Kinga Fanni és Dr. Magi József* végezte.

5.4. Az életképesség vizsgálata (MTT-assay)

A szebociták és a HCEC-ek életképességének vizsgálatára MTT-assay-t alkalmaztunk. A módszer lényege, hogy az élő sejtek mitokondriumaiban fellelhető mitokondriális dehidrogenázok hatására a sárga színű 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid (MTT; Sigma-Aldrich) lila színű formazán kristállyá alakul át, mert az enzimek hasítják a kiindulási vegyületben található tetrazólium gyűrűt. A sejteket 96 lyukú lemezekre szélesztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban a szebociták és 10.000 sejt/lyuk a korneális epitélisejtek esetében, majd az ábrákon jelzettek szerint kezeltük őket. Ezt követően a felülúszó eltávolítása után minden lyukba 100 µl PBS-ben oldott MTT oldatot (végkoncentráció: 0,5 mg/ml) pipettáztunk, és 37°C-on 3 órán át inkubáltuk a sejteket. Az MTT oldat eltávolítása után minden lyukhoz 100 µl „MTT szolubilizáló oldatot” (81 [V/V]% 2-propanol, 9 [V/V]% 1 M HCl, 10 [V/V]% Triton X-100; [mind Sigma-Aldrich]) adtunk. Ezután a sejteket 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk közepesen intenzív rázatás mellett, amivel feloldottuk a sejteket és bennük keletkezett kristályokat. Az így keletkezett homogén oldatok abszorbanciáját 565 nm-en mérve határoztuk meg (FlexStation 3 készülék; Molecular Devices), amely jól korrelál az élő sejtek számával. Minden kezelést legalább négy ismétléssel végeztünk, az

adatokat a kontroll százalékában, átlag \pm SEM formában adtuk meg. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold, Ádám Dorottya, Tóth Kinga Fanni és Dr. Magi József* végezte.

5.5. Az apoptózis és a nekrozis vizsgálata

A mitokondriális membránpotenciál csökkenése az apoptózis egyik legkorábbi markere (154). Az esetleges apoptotikus folyamatok azonosítására MitoProbe™ DilC₁(5) Assay Kit (Life Technologies) segítségével vizsgáltuk az SZ95 szebociták mitokondriális membránpotenciálját. A szebocitákat 20.000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük a már említett „black well/clear bottom” 96 lyukú lemezekre (Greiner Bio-One), majd a jelzett módokon kezeltük őket. A felülúszó eltávolítása után a sejteket 30 percig inkubáltuk 37°C-on a megfelelő festékkel (1,1',3,3,3',3'-hexametil-indodikarbocianin-jodid; a továbbiakban „DilC₁(5)”), ahol a festéket 1:200 arányban hígítottuk PBS-ben (50 μ l/lyuk). A DilC₁(5) a mitokondriális membránpotenciál függvényében halmozódik fel a sejtek mitokondriumaiban, ennek megfelelően a korai apoptotikus jeleket mutató sejtekben csökkent fluoreszcencia intenzitást mérhetünk. Az inkubációt követően 100 μ l/lyuk PBS-sel kétszer mostuk a sejteket, a fluoreszcencia intenzitást (excitáció: 630 nm; emisszió: 670 nm) FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével mértük le. Minden kezelést legalább négy ismétléssel végeztünk, a relatív fluoreszcenciát a kontroll százalékában, átlag \pm SEM formában adtuk meg. Az apoptózis pozitív kontrolljaként egy mitokondriális szétkapcsoló molekulát, a karbonil-cianid m-klorofenil-hidrazont (CCCP; Life Technologies) alkalmaztunk a DilC₁(5) munkaoldatban 1:200 arányban hígítva (30 perc, 37°C).

A nekrotikus folyamatok vizsgálatát SYTOX Green (Life Technologies) fluoreszcens festéssel végeztük. A módszer lényege, hogy a festék csak a nekrozist szenvedett sejtek sérült plazma, illetve magmembránján keresztül képes a sejtmagba jutni, és ott a duplaszálú DNS-hez kötődni, míg az ép felszíni membránnal rendelkező, egészséges sejtek elhanyagolható SYTOX Green festési intenzitást mutatnak. A sejteket 96 lyukú („black well/clear bottom”) lemezekre

(Greiner Bio-One) szélesztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban, majd az ábrákon jelzettek szerint kezeltük őket. Ezután a felülúszót eltávolítottuk, a sejteket pedig PBS-ben hígított SYTOX Green (Life Technologies) reagenssel (végkoncentráció: 1 μ M) inkubáltuk (30 perc; 37°C; 50 μ l/lyuk). Az inkubáció letelte után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével meghatároztuk az egyes wellék fluoreszcencia intenzitását (gerjesztés: 490 nm; detektálás: 520 nm). A nekrozis pozitív kontrolljaként lízispuffert (LB; 1:100 arányban oldva a SYTOX Green munkaoldatban 30 percig 37°C-on; Life Technologies Hungary Kft.) alkalmaztunk. A relatív fluoreszcencia értékeket a pozitív kontroll százalékában fejeztük ki.

Jelentősen eltérő spektrális tulajdonságaik miatt a DilC₁(5) és a SYTOX Green festékek egyidejű alkalmazásával lehetőségünk volt az apoptotikus és nekrotikus folyamatokat azonos mintákban megvizsgálni, hiszen, amint az korábbi kísérleteink során már bebizonyosodott, a festékek szimultán használata nem okoz különbséget a csak egyetlen festéket tartalmazó munkaoldattal elvégzett mérésekhez képest. A kombinált jelölés során a DilC₁(5) intenzitásának szelektív csökkenése jelzi a mitokondriális depolarizációt (vagyis a korai apoptotikus folyamatok kialakulását), míg a SYTOX Green festési intenzitásának növekedése nekrozis felléptére utal. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold, Ádám Dorottya, Tóth Kinga Fanni és Dr. Magi József* végezte.

5.6. A proliferáció vizsgálata (CyQUANT proliferációs assay)

A szebociták proliferációjának mértékét CyQUANT proliferációs assay segítségével határoztuk meg. Az assay közvetlen információt ad a sejtszámról az egyes wellékben található DNS mennyiségének mérésével. Ennek megfelelően a jelintenzitás csökkenése proliferációs blokk és/vagy élősejtszám-csökkenés felléptére utalhat, míg a kontrollhoz viszonyított emelkedése a sejtszám növekedését jelzi. Az SZ95 szebocitákat (kiindulási sejtszám: 2.000 sejt/lyuk) 96 lyukú „black well/clear bottom” lemezekben (Greiner Bio-One) tenyésztettük, és

az ábrán jelzett módon kezeltük őket. A felülúszók eltávolítása után a lemezeket -80°C -on fagyasztottuk, így permeabilizáltuk és tartósítottuk a sejteket. Ezután a lemezeket szobahőmérsékleten felolvasztottuk, és desztillált vízzel 20-szorosára hígított „20x lysis buffer stock solution”-ban „CyQUANT GR stock solution”-t hígítottunk (1:400), amelyből mindegyik wellbe $200\ \mu\text{l}$ -t mértünk be. 5 percig tartó inkubálás után a fluoreszcenciát $490\ \text{nm}$ gerjesztéssel és $520\ \text{nm}$ emissziós hullámhosszon mértük FlexStation 3 készülékkel (Molecular Devices). A fluoreszcenciát a 24 órás kontroll értékének százalékában, $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában adtuk meg. Minden kezelést legalább négy ismétléssel végeztünk. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold és Dr. Magi József* végezte.

5.7. Áramlási citometria

Az SZ95 szebocitákat 6 lyukú lemezekre szélesztettük ($200.000\ \text{sejt/lyuk}$) a saját oldatában, és 48 órán keresztül OEA-val vagy az oldószerével kezeltük. Ezután a sejteket PBS-ben felkapartuk, és a szuszpenziót intenzív triturálással homogenizáltuk, az áramlási citometriás mérést pedig BD FACS Calibur készülékkel (Franklin Lakes, New Jersey, USA) végeztük el. A sejtek differenciáltsági állapotát a granuláltság mértékét jól tükröző paraméter, az oldalra irányuló fényszórás („side scatter”) detektálásával vizsgáltuk, és az adatokat *FlowJo V10.4* (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA) szoftver segítségével elemeztük. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold és Péntes Zsófia* végezte.

5.8. UVB besugárzás

A HCEC-eket $500.000\ \text{sejt/Petri-csésze}$ ($d=35\ \text{mm}$) denzitásban szélesztettük. A sejtek letapadását követően a munkacsoportunk által eredetileg epidermális keratinociták vizsgálatára optimalizált protokollt (155) követve a tápoldatot $800\ \mu\text{l}$ szintelen Sebomed™ Basal Mediumra (Biochrom) cseréltük, és a sejteket UVB (hullámhossz: $312\ \text{nm}$) besugárzásnak tettük ki $40\ \text{mJ/cm}^2$ dózisban (Bio-Sun microprocessor-controlled UV irradiation system; Wilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Franciaország) alkalmazva. A besugárzást követően a médiumot azonnal

lecseréltük a megfelelő kezelőanyagokat vagy azok oldószerét tartalmazó tápoldatra. A méréseket *Angyal Ágnes* végezte.

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

A reverz transzkripciót követő Q-PCR-t 5' nukleáz assay-vel végeztük Roche LightCycler 480 System készülék (Roche, Bázél, Svájc) segítségével. A teljes RNS-t TRIzol (Life Technologies) felhasználásával izoláltuk, majd a gyártó protokolljának megfelelően DNáz kezelést végeztünk az esetleges genomi DNS szennyezés eliminálására. Ezután a teljes RNS 1 µg-jából kiindulva a High-Capacity cDNA Kit (Life Technologies) segítségével állítottunk elő cDNS-t. A Q-PCR amplifikációs reakciót TaqMan assay-kkel végeztük (Life Technologies); az assay ID-k a következők voltak: Hs00174092_m1 (*IL-1α*), Hs00174097_m1 (*IL-1β*), Hs00985639_m1 (*IL-6*), Hs00174103_m1 (*IL-8*), Hs02825719_s1 (*GPR119*). Belső kontrollként a 18S riboszomális RNS (*18S RNS*), a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*GAPDH*) vagy a peptidil-prolil izomeráz A (*PPIA*) expresszióját határoztuk meg (assay ID-k: Hs03928985_g1, Hs99999901_s1, illetve Hs99999905_m1). A reakciókat három technikai ismétléssel végeztük. A relatív expressziót a jelzett belső kontroll kifejeződésére vonatkoztatva a Δ CT módszert alkalmazva átlag \pm SD alakban adtuk meg. Azokban az esetekben, amikor a génexpresszió kezelés hatására történő esetleges változásait vizsgáltuk, a $\Delta\Delta$ CT módszert alkalmaztuk. Ennek során a megfelelő belső kontrollra történő normálást követően a relatív expressziót a kontroll esetében tapasztalható relatív expresszióra is normáltuk. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold, Dr. Lisztes Erika és Dr. Magi József* végezte.

5.10. Western blot

A sejteket 96 mm átmérőjű Petri-csészékbe szélesztettük, majd a megfelelő konfluencia szint elérésekor, illetve az ábrán jelzett kezeléseket követően begyűjtöttük a mintákat.

Mintagyűjtéskor proteáz inhibitor koktélt (1:100 hígításban) és PhosSTOP reagenst (1 tableta/10 ml) tartalmazó „detergens mix”-ben (20 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-[2-amino-etil]-benzénszulfonil-fluorid; pH 7,4; 60 µl/tenyészet) vettük fel a sejteket (mindegyik összetevőt a Sigma-Aldrich-tól szereztük be). Ezután jégen szonikátor segítségével ultrahangos feltárást végeztünk. A fehérjekoncentrációt BCA protein assay-vel (Pierce, Rockford, IL, Egyesült Államok) határoztuk meg, és desztillált víz, valamint nátrium-dodecil-szulfát (SDS) mintapuffer (10 [V/V]% glicerin, 2 [V/V]% SDS, 0,062 M Tris, 0,02 M ditiotreitól, 0,002 [V/V]% brómfenolkék és 5 [V/V]% β-merkaptóetanol; Sigma-Aldrich) hozzáadásával egységesen 1 mg/ml-re állítottuk be. Az így elkészített mintákból azonos mennyiségű (10 µg) fehérjét használva SDS poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk 10%-os Mini Protean TGX gélen (Bio-Rad, Hercules, CA, Egyesült Államok). Az elválasztott fehérjéket Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad) készülék segítségével nitrocellulóz membránra (Trans-Blot® Turbo™ Midi Nitrocellulose Transfer Packs, Bio-Rad) transzferáltuk. Ezt követően a szabad kötőhelyek blokkolására 50 mg/ml tejpórt tartalmazó TBST-ben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5; 0,1 [V/V]% Tween 20; Sigma-Aldrich) 1 óráig szobahőmérsékleten tartottuk a membránokat, majd egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk őket a blokkoló oldatban hígított elsődleges antitestekkel (**1. táblázat**). A másodlagos antitesteket (**1. táblázat**) szintén a blokkoló oldatban hígítottuk (inkubáció: 37°C, 1 óra). Az immunjeleket SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate kittel (Pierce) tettük láthatóvá, melyeket KODAK Gel Logic 1500 Imaging System (Eastman Kodak Company, Kodak, Tokió, Japán) készülékkel rögzítettük. Ahol ez releváns volt, az egyenlő mintafelvétel ellenőrzésére „stripping puffer”-ben (15 mg/ml glicin, 0,1 g/100 ml SDS, 1 [V/V]% TWEEN-20, pH 2,2; Sigma-Aldrich) történő intenzív mosást követően a membránokat nyúlban termelt anti-humán β-tubulin vagy nyúlban termelt anti-humán β-aktin antitestekkel (**1. táblázat**) inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át, melyeket szintén a blokkoló oldatban hígítottuk (1:1000).

1. táblázat A Western blot során alkalmazott antitestek áttekintése

Antitest	Hígítás	Gyártó és katalógusszám
nyúlban termelt anti-humán GPR119	1:500	Novus Biologicals, LLC; NBP1-00857
nyúlban termelt anti-humán ERK1/2 MAPK	1:20 000	Sigma-Aldrich; m3682
egérben termelt anti-humán P-ERK1/2 MAPK	1:10 000	Sigma-Aldrich; m8159
nyúlban termelt anti-humán β -tubulin	1:1000	Novus Biologicals, LLC; katalógusszám: NB600-936
nyúlban termelt anti-humán β -aktin	1:1000	Sigma-Aldrich; A5060
kecskében termelt nyúl IgG Fc-szegmens elleni másodlagos antitest	1:10 000	Bio-Rad; 170-6515
kecskében termelt egér IgG Fc-szegmens elleni másodlagos antitest	1:10 000	Bio-Rad; 172-1011

Másodlagos antitestként ez esetben is a már említett torna-peroxidázzal konjugált, kecskében termelt antitestet használtuk blokkoló oldatban hígítva (1:10.000; 37°C; 1 óra). A fentiekben leírtak szerint vizualizált kemilumineszcens jelek szemikvantitatív denzitometriás elemzését *Fiji* szoftver segítségével végeztük (NIH, Bethesda, MD, Egyesült Államok); a sávok optikai denzitását először az azonos minta „loading” kontrolljára normáltuk, majd relatív denzitás értéket a kontroll minta relatív denzitás értékére normalva adtuk meg. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold, Tóth Kinga Fanni és Dr. Magi József* végezte.

5.11. Foszfokináz-array

Az OEA kezelés hatására aktiválódó kináz kaszkádok szűrőjellegű vizsgálatára Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kitet (katalógusszám: ARY003B; Bio-Techne R&D Systems) alkalmaztunk a gyártó protokollja szerint. A szebocitákat Petri-csészékbe szélesztettük (d=200 mm; 10 millió sejt/15 ml tápoldat/Petri-csésze). Másnap a szebocitákat 20 percig kezeltük 50 μ M OEA-dal vagy az OEA oldószerével, majd a mintákat a Western blotnál leírtak szerint begyűjtöttük, és meghatároztuk a fehérjetartalmukat. A felvihető legnagyobb

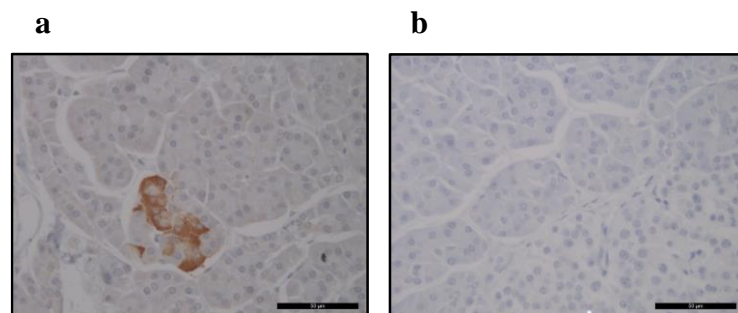
térfogatot és az elérhető legnagyobb töménységet választva egyenlő fehérjemennyiségeket (933 µg/334 µl) vittünk a membránokra, a kemilumineszcens jeleket pedig a gyártó protokollját minimálisan módosítva (az előhíváshoz SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate kitet [Pierce] használtunk) a már említett KODAK Gel Logic 1500 Imaging System (Eastman Kodak Company) készülékkel detektáltuk minden membrán esetében azonos beállításokat (expozíciós idő stb.) használva. A jelek szemikvantitatív denzitometriás elemzését *Fiji* szoftver segítségével végeztük (NIH, Bethesda, MD, Egyesült Államok). Az analízis során a membránok negatív kontroll pontjainak átlagolt intenzitását tekintettük a háttér értékének, így ezt kivontuk az adott membrán többi jelének értékekből. Az így kapott, háttérrel korrigált értékeket a kontrollra normalizáltuk, és táblázatos formában ábráztuk. Releváns változásnak a minimum 1,3-szeres növekedést tekintettük. A kísérleteket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold és Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.12. A GPR119 immunhisztokémia kimutatása

A donorok a megfelelő tájékoztatást követően írásban járultak hozzá a minták kutatási célú felhasználásához; a kísérletek a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal jóváhagyásával történtek (azonosítók: IX-R-052/01396-2/2012, IF-12817/2015, IF-1647/2016, IF-778-5/2017, DE RKEB/IKEB 4988-2018) a Helsinki Deklaráció irányelveinek betartásával.

A GPR119 *in situ* immunhisztokémiai kimutatását 3 a Kenézy Gyula Egyetemi Kórházban (Debreceni Egyetem) trichilemmális cisztával diagnosztizált donor formalinnal fixált, paraffinba ágyazott bőrmintáinak diagnosztikus célra fel nem használt, faggyúmirigyekben gazdag területeit vizsgálva végeztük. A paraffinba ágyazott blokkokból 4 µm vastagságú metszeteket készítettünk, és a metszeteken hőindukált antigénfeltárást végeztünk 11 mM-os citrát pufferben (pH 6) 2 percig kuktafazékban maximális nyomás mellett. Az endogén peroxidázok gátlására 3% H₂O₂ oldatot használtunk 10 percig. Ezután a

metszeteket szobahőmérsékleten inkubáltuk humán GPR119-et felismerő nyúlban termeltetett primer antitesttel (Novus Biologicals; katalógusszám: NBP1-00857), melyet 1% szarvasmarha szérumalbumint (BSA) tartalmazó TBS-ben hígítottunk (1:500; 60 perc szobahőmérsékleten; Sigma-Aldrich). A másodlagos immunjelölés és az előhívás „EnVision FLEX Labeled polymer-HRP anti rabbit and anti-mouse System” (30 perc szobahőmérsékleten, sötétben; DAKO, Glostrup, Dánia), valamint 3,3'-diaminobenzidin (DAB) segítségével történt. A sejtmagokat hematoxilinnel jelöltük, a metszeteket pedig megfelelő fedőmediummal fedtük (Histolab, Göteborg, Svédország). A festési eljárás optimalizálásához pozitív kontrollként a humán hasnyálmirigy szövetet vizsgáltunk (29) (**7. ábra**). Negatív kontrollként az elsődleges antitest elhagyásával készített metszeteinket használtuk. A kísérleteket *Dr. Pór Ágnes* és *Dr. Kovács Ilona* végezte.



7. ábra A GPR119 immunhisztokémiai jelölés pozitív kontrollja

A GPR119 immunjelölés optimalizálásakor humán hasnyálmirigy szövetet használtunk. (a) A GPR119 immunpozitivitást 3,3'-diaminobenzidin (DAB; barna szín) segítségével tettük láthatóvá, míg a sejtmagokat hematoxilinnel (kék) jelöltük. Negatív kontrollként (b) az elsődleges antitest elhagyásával készült jelölést használtunk. Eredeti nagyítás: 400×. Méretvonalak: 50 µm.

5.13. A GPR119 expresszióváltozásának szemikvantitatív vizsgálata aknéban

A GPR119 expressziós mintázatát 6 aknéban szenvedő és 6 nem aknés donor bőrmintáin vizsgáltuk. A paraffinba ágyazott blokkokból 4 µm vastag metszeteket készítettünk és a metszeteken hőindukált antigénfeltárást végeztünk 11 mM-os citrát pufferben (pH 6) 15 percig mikrohullámú sütőben (700 W). Az endogén peroxidázok gátlására 3% H₂O₂ oldatot használtunk 10 percig. Ezután a metszeteket szobahőmérsékleten inkubáltuk a humán GPR119-

et felismerő nyúlban termeltetett primer antitesttel (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság; katalógusszám: ab75312),^{††} melyet 1% szarvasmarha szérum albumint tartalmazó PBS-ben hígítottunk (1:500; 60 perc szobahőmérsékleten; Sigma-Aldrich). A másodlagos immunjelölés, valamint a metszetek előhívása és fedése mindenben megegyezik az előző fejezetben ismertetett protokollal. Fontos hangsúlyozni, hogy a szemikvantitatív összevetésben résztvevő metszetek feldolgozása és festése szigorúan sztenderdizált módon, szimultán történt, és a minták fotózását is azonos beállítások (fényerősség, fehéregyensúly stb.) mellett végeztük (Olympus fluoreszcens mikroszkóp; UNICAM Magyarország Kft., Budapest, Magyarország). Az eredeti nagyítás minden esetben 200×-os volt. A szemikvantitatív képanalízist *ImageJ 1.49v* szoftver (NIH) alkalmazásával végeztük úgy, hogy lemértük átlagos festődési intenzitást minden látótérben a faggyúmirigyekben, majd az egyes donorokhoz tartozó látóterek értékeit átlagoltuk, és az így nyert adatokat az átlag és a szórás egyidejű feltüntetésével „dot plot” formátumban ábráztuk, ahol minden pont egy adott donor faggyúmirigyének átlagos festődési intenzitását jelzi. A donorok releváns anamnesztikus adatait a **2. táblázat** foglalja össze. A mintákat *Dr. Töröcsik Dániel* biztosította, a kísérleteket *Dr. Pór Ágnes* és *Dr. Kovács Ilona*, a képanalízist pedig *Dr. Oláh Attila* végezte.

2. táblázat *Az aknéban nem szenvedő donorok és az aknés betegek releváns anamnesztikus adatait összefoglaló táblázat*

Aknéban nem szenvedő donorok			Aknés betegek		
Kor	Nem	Régió	Kor	Nem	Régió
25	férfi	hát	22	férfi	hát
20	férfi	hát	37	férfi	hát
19	férfi	hát	17	férfi	hát
22	férfi	hát	nincs adat	férfi	hát
17	férfi	hát	nincs adat	férfi	hát
28	férfi	hát	nincs adat	férfi	hát

^{††} Sajnálatos módon a gyártó a projekt befejezése előtt megszüntette az előző alfejezetben említett primer antitest gyártását, így amikor a kézirat első változatának beküldését követően az egyik bíráló felvetette, hogy meg kellene vizsgálnunk a GPR119 esetleges expresszióváltozásait aknéban, kénytelenek voltunk egy új elsődleges antitestet használni. Amint az Eredmények fejezetben, a **13.** (eredeti antitest) és **20. ábra** (új antitest) összehasonlításakor látható, az új antitest alkalmazásakor is ugyanolyan festődési mintázatot tapasztaltunk, mint a korábbi esetén.

5.14. Az ECS tagjainak kimutatása HCEC-eken (immunfluoreszcens jelölés)

A HCEC-eket fedőlemezeken 60-70%-os konfluenciáig növesztettük, majd -20°C-os acetoneban 10 percig fixáltuk. A sejteket 0,6% Triton X-100-at (Sigma-Aldrich) és 10 mg/ml BSA-t tartalmazó PBS-ben (mindkettő Sigma-Aldrich) blokkoltuk és permeabilizáltuk (5 perc, szobahőmérséklet). A sejteket FAAH (egér monoklonális; 1:200; katalógus szám: ab54615; Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság), CB₁ (nyúl monoklonális; 1:50; katalógus szám: ab172970; Abcam), NAPE-PLD (nyúl poliklonális; 1:200; katalógus szám: NB110-80070; Novus Biologicals), MAGL (egér monoklonális; 1:100; katalógus szám: NBP2-00735; Novus Biologicals), CB₂ (egér monoklonális; 1:50; katalógus szám: sc-293188; Santa Cruz, Heidelberg, Németország), DAGL α (egér monoklonális; 1:50; katalógus szám: sc-390409; Santa Cruz), illetve DAGL β (egér monoklonális; 1:50; katalógus szám: sc-514738; Santa Cruz) ellen termeltetett elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. A megfelelő PBS-ben történő mosást követően a fedőlemezeket Alexa-488[®]-konjugált, kecskében termelt egér IgG Fc-szegmens elleni vagy kecskében termelt, nyúl IgG Fc-szegmens elleni másodlagos antitestekkel (1:1000; katalógus számok rendre A-11001 és A-11008; Thermo Fisher Scientific) inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A sejtmagokat 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) festettük. Negatív kontrollként az elsődleges antitestek elhagyásával készült jelölést használtuk. A képeket Olympus Xcellence RT fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus, Tokió, Japán) készítettük. A kísérleteket *Angyal Ágnes* végezte.

5.15. Az ECS tagjainak kimutatása humán szaruhártyán (immunfluoreszcens jelölés)

Az elhunytakból származó szaruhártyaminták felhasználása a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal

jóváhagyásával történtek (azonosítók: IX-R-052/00016-28/2012; DE OEC RKEB/IKEB 3580-2012) a Helsink Deklaráció irányelveinek betartásával.

A metszeteket acetonban fixáltuk, 0,1%-os Triton X-100-at (Sigma-Aldrich) és 10 mg/ml BSA-t tartalmazó PBS-ben (mindkettő Sigma-Aldrich) blokkoltuk és permeabilizáltuk (5 perc, szobahőmérséklet), majd az előző alfejezetben bemutatott, blokkoló oldatban hígított antitestekkel (CB₁: 1:250; CB₂: 1:250; NAPE-PLD: 1:1000; DAGL α : 1:250; DAGL β : 1:250; FAAH: 1:200; MAGL: 1:150) inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. A tárgylemezeket ezután PBS-sel mostuk, majd Alexa-568[®]-konjugált kecskében termelt egér IgG Fc-szegmens elleni, illetve szintén kecskében termelt nyúl IgG Fc-szegmens elleni másodlagos antitestekkel (A-11004, A-11011; 1:1000, Thermo Fisher Scientific) inkubáltuk. A magfestést DAPI-val (Sigma-Aldrich) végeztük, végül a metszeteket Fluoromount-G fedőmédiummal (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) fedtük. A képeket Zeiss LSM 880 fluoreszcens mikroszkóppal készítettük. A negatív kontrollokat minden esetben az elsődleges antitest elhagyásával nyertük. A humán korneamintákat *Dr. Takács Lili* biztosította, a kísérleteket *Angyal Ágnes*, *Dr. Zsebik Barbara* és *Prof. Dr. Vereb György* végezte.

5.16. Az intracelluláris 3'5'-ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) koncentráció meghatározása (cAMP ELISA)

Az SZ95 sebecitákat 1 órán át kezeltük OEA-val (50 μ M) vagy azonos térfogatú oldószerrel (abszolút etanol), majd a sejteket a gyártó által javasolt protokollt követve 10⁷ sejt/ml-es denzitásban lizáltuk, és az intracelluláris cAMP szintet Parameter Cyclic AMP Assay (R&D Systems Inc., Minneapolis, Kanada) kit segítségével vizsgáltuk a gyártó protokollját követve. A kísérleteket *Angyal Ágnes* végezte.

5.17. A citokin felszabadulás vizsgálata (IL-6 és IL-8 ELISA)

A citokin felszabadulás vizsgálata során a standardizált módon (500.000 sejt 1,5 ml tápoldatban, 35 mm átmérőjű Petri-csészékben) szélesztett sejteket az ábrákon jelzett módokon kezeltük. A kezelések után a felülúszókat begyűjtöttük, lecentrifugáltuk (500 g; 10 perc), és a sejttörmeléktől mentes felülúszót a további felhasználásig -80°C-on tároltuk. A felszabadult IL-6 és IL-8 mennyiségét OptEIA kitek segítségével, a gyártó protokollját követve határoztuk meg (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA). Az abszorbanciát (450 nm) kolorimetriás úton határoztuk meg FlexStation 3 készülék (Molecular Devices), illetve a HCEC-ek esetében EnVision® 2105 Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) segítségével. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold, Tóth Kinga Fanni, Péntes Zsófia, Dr. Shahrzad Alimohammadi és Horváth Dorottya* végezte.

5.18. Fluoreszcens Ca^{2+} mérés

Az OEA Ca^{2+} -homeosztázisra gyakorolt hatásainak vizsgálatához fluoreszcens Fluo-4 AM jelölést használtunk. A Fluo-4 AM egy nem raciométrikus Ca^{2+} -érzékeny fluoreszcens festék, aminek szabad Ca^{2+} jelenlétében jelentősen megnő a fluoreszcencia intenzitása. A festék a hozzákapcsolt acetoxi-metilészter (AM) csoportnak köszönhetően nagy hatékonysággal képes bejutni a sejtekbe, ahol az AM csoport lehasítását követően csapdába esik, így kiválóan alkalmas a szebociták Ca^{2+} -homeosztázisában beálló változások valós idejű nyomon követésére.

A sejteket 20.000 sejt/lyuk denzitásban tenyésztettük speciális, fluoreszcens mérésekhez optimalizált („black well/clear bottom”) 96 lyukú lemezre (Greiner Bio-One). A sejteket egyszer mostuk 100 μl /lyuk Hank-oldattal (136,8 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,34 mM Na_2HPO_4 , 0,44 mM KH_2PO_4 , 0,81 mM MgSO_4 , 1,26 mM CaCl_2 , 5,56 mM glükóz, 4,17 mM NaHCO_3 pH 7,2; mindegyik a Sigma-Aldrich-tól), melyet probeneciddel és BSA-val egészítettünk ki (végkoncentrációk: 2,5 mM, illetve 10 mg/ml; mindkettő a Sigma-Aldrich-tól), majd 1 μM

Fluo-4 AM (Life Technologies Hungary Kft.) festéket tartalmazó Hank-oldattal (100 µl/lyuk) 30 percig inkubáltuk a sejteket 37°C-on. A sejteket ezután háromszor mostuk Hank-oldattal (100 µl/lyuk), majd FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével „Flex” módban meghatároztuk az egyes wellék fluoreszcencia intenzitását (gerjesztés: 490 nm; detektálás: 520 nm). A sejtek válaszadási képességének ellenőrzésére minden mérés végén pozitív kontrollként ATP-t mértünk a sejtekre (végkoncentráció: 0,2 mg/ml). Az adatokat F/F_0 formában adtuk meg, ahol F_0 a kezelést megelőzően lemerített alapvonal átlagos fluoreszcencia intenzitása, míg F az aktuális fluoreszcencia. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold és Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.19. Szelektív géncsendesítés (siRNS transzfekció)

Az SZ95 szebocitákat Petri-csészékbe (d=35 mm) vagy 96 lyukú („black well/clear bottom”) lemezekre (Greiner Bio-One) szélesztettük, majd másnap, 50-70%-os konfluenciaszinten a tápoldatot szérumentes OptiMem médiumra (Life Technologies) cseréltük, és a sejteket GPR119-re specifikus (Stealth RNA_i, ID-k: HSS134803, HSS134804, és HSS134805; Life Technologies) duplaszálú, kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal transzfektáltuk Lipofectamine[®] RNA_i MAX transzfekciós reagens (Life Technologies) segítségével a gyártó protokollját követve. Kontrollként a sejteket Stealth RNA_i Negative Control „medium” (Life Technologies) duplaszálú siRNS-sel transzfektáltuk, ami egyetlen ismert mRNS szekvenciájával sem mutat homológiát („scrambled” RNS, „SCR”). A csendesítés hatékonyságát a transzfekciót követő 2. és a 3. napon ellenőriztük mRNS (Q-PCR) és fehérje (Western blot) szinten. Előzetes kísérleteink során azt találtuk, hogy a fenti három siRNS konstrukt közül csak egy (HSS134805) volt képes hatékonyan csendesíteni a GPR119 expresszióját. Kísérleteink során a HSS134803 nem volt hatékony, míg a HSS134804 hatása csak a transzfekció utáni 2. napon volt kimutatható, a 3. napon azonban nem (nem publikált

megfigyelés). Ezért későbbi kísérleteinkben csak a HSS134805-es jelű konstruktot használtuk. A kísérleteket *Angyal Ágnes* és *Dr. Markovics Arnold* végezte.

5.20. Statisztikai analízis

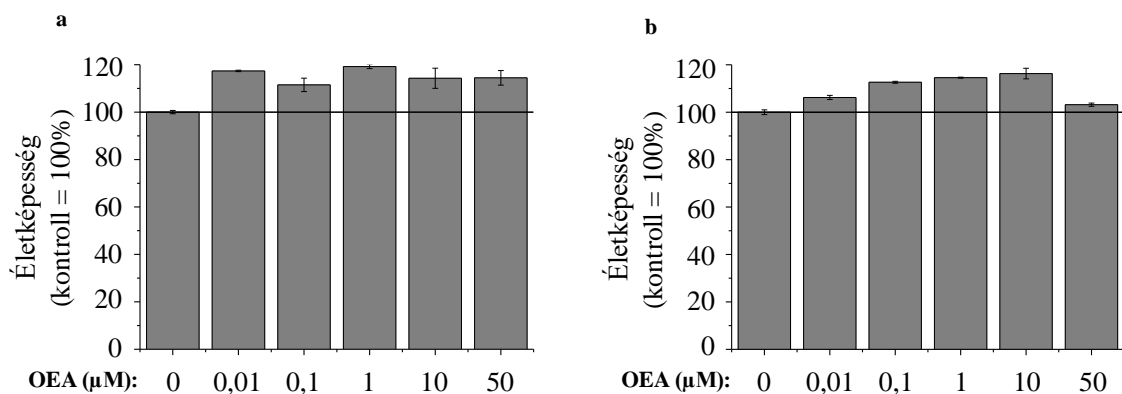
Az adatokat az *IBM SPSS Statistics software version 20* (SPSS Inc., Armonk, NY, USA), illetve *GraphPad Prism 8.3.1 (549)* (GraphPad Software, LLC, San Diego, CA, USA) segítségével, Student-féle kétoldalú, kétmintás t-próbával (páros összehasonlítások) vagy egyutas ANOVA-t követő Bonferroni *post hoc* tesztekkel (többszörös összehasonlítás) vizsgáltuk, és a $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikáns különbségnek. A grafikonokat *Origin Pro Plus 6.0 szoftver* (Microcal, Northampton, MA, Egyesült Államok) vagy *GraphPad Prism 8.3.1 (549)* (GraphPad Software, LLC) segítségével ábrázoltuk. A statisztikai analízist és az ábrák elkészítését *Angyal Ágnes*, *Dr. Markovics Arnold*, *Dr. Szöllősi Attila Gábor* és *Dr. Oláh Attila* végezte.

6. Eredmények

6.1. Az endokannabinoid jelátvitel vizsgálata humán faggyúmirigyekben

6.1.1. Az OEA elősegíti a szebociták differenciálódását

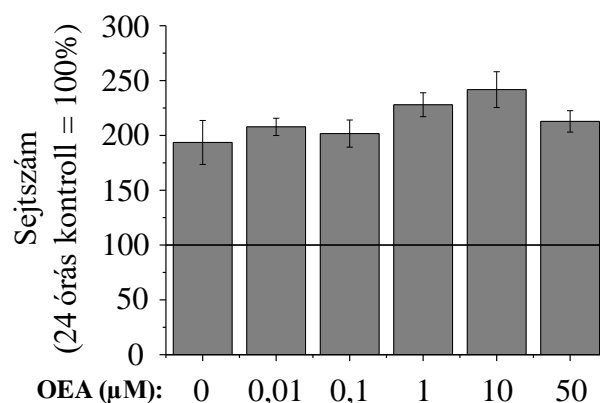
A „klasszikus” eCB-ok (azaz az AEA és 2-AG), valamint az AA is jellemzően a 30-50 μM -os koncentrációban alkalmazva fokozzák a szebociták faggyúlipid-termelését 24-48 órás kezelések során (39,111–116,156). Ebből kiindulva az OEA hatásait is elsőként a 10 nM és 50 μM közötti koncentrációtartományban vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy 50 μM -ig az OEA nem befolyásolta az életképességet (MTT-assay; 24-48 órás kezelések; **8. ábra**), valamint nem volt hatással az SZ95 szebociták proliferációjára sem (CyQUANT-assay; 48 órás kezelések; **9. ábra**).



8. ábra 50 μM -os koncentrációig az OEA a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható

MTT-assay. Tenyészeteket 24 (a), illetve 48 (b) órán keresztül kezeltük az ábrán látható módon, majd MTT-assay-t végeztünk. A kapott értékeket $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ alakban ($N=4$), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Ezzel szemben az OEA koncentrációfüggő módon és szignifikánsan fokozta a faggyúlipid-termelést az 1-50 μM -os koncentrációtartományban (**10/a-b ábra**), és fokozta a szebociták granuláltságát is (48 órás kezelés), amit az ábrán a görbe jobbra tolódása jelez (**10/c ábra**).

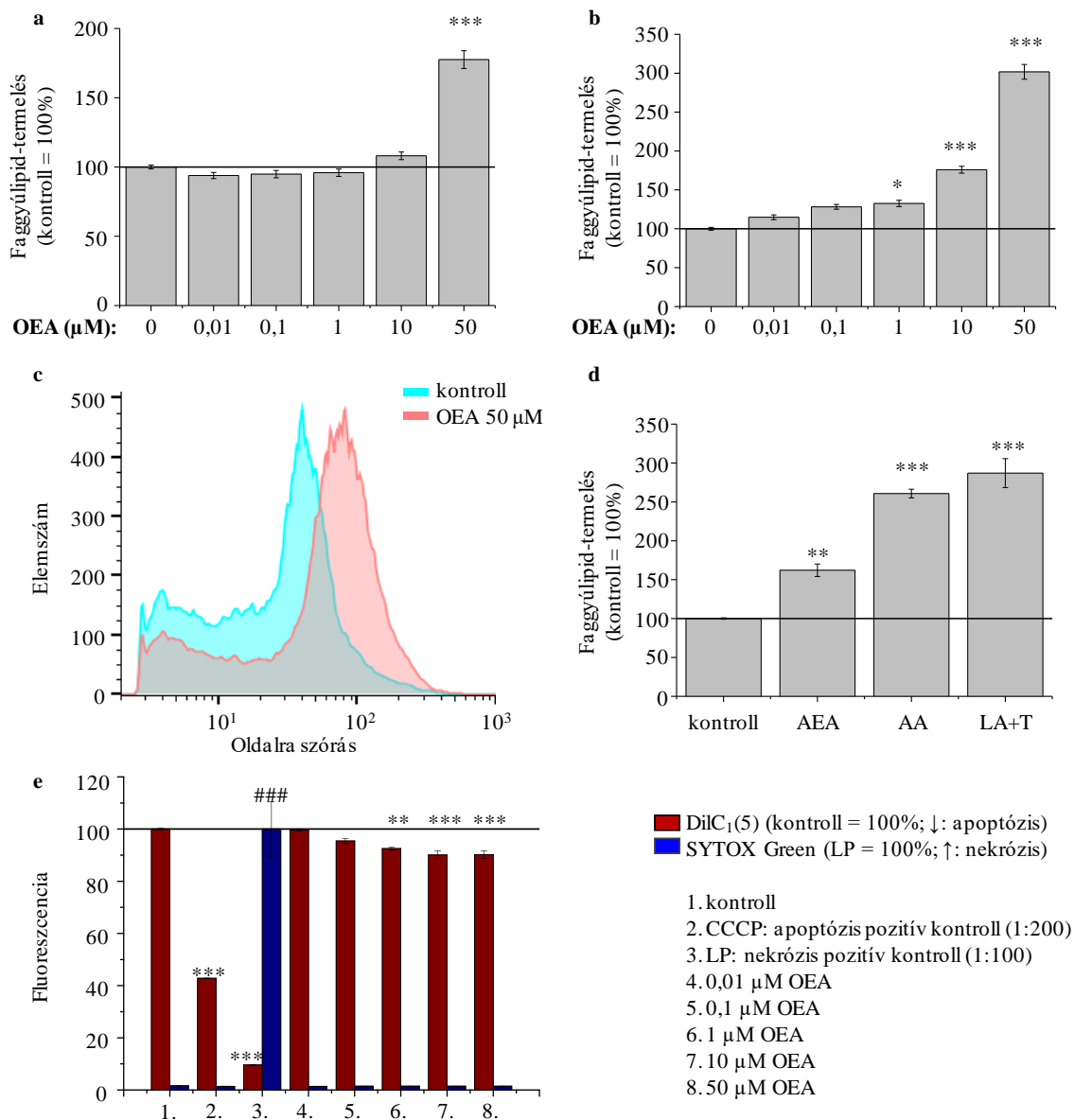


9. ábra 50 µM-os koncentrációig az OEA nem befolyásolja az SZ95 szebociták proliferációját

Tenyészeteinket 48 órán keresztül kezeltük, majd CyQUANT proliferációs assay-t végeztünk. Az eredményeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt 24 órás kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Ezen eredmények azt sugallták, hogy a „klasszikus” eCB-okhoz hasonlóan (156) (39) az OEA is képes elősegíteni a szebociták differenciálódását, lipogén hatása pedig összemérhető a „klasszikus” eCB-ok (pl. AEA), az AA (50 µM), valamint a linolsav és a tesztoszteron kombinációja (LA: 100 µM; T: 1 µM) által kiváltott hatásokkal (39,111–116,156,157) (**10/d ábra**).

Tekintettel arra, hogy a szebociták differenciációját a faggyúlipid-termelés és a granuláció fokozódása mellett (a holokrin szekréció sajátosságaként) sejthalál-folyamatok is kísérik, kíváncsiak voltunk, hogy az OEA kezelés befolyásolja-e az apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát. A kérdés eldöntésére kombinált DilC₁(5)-SYTOX Green jelölést végeztünk. Megállapítottuk, hogy a 48 órás OEA kezelés kismértékben, de szignifikánsan csökkentette a mitokondriális membránpotenciált (DilC₁(5) jelölés), jelezve a korai apoptotikus folyamatok elindulását, miközben a nekrotikus sejtek aránya változatlan maradt (SYTOX Green jelölés) (**10/e ábra**). Ez az eredmény ismét azt erősíti meg, hogy az OEA-kezelés valóban elindítja a humán szebociták differenciálódását.

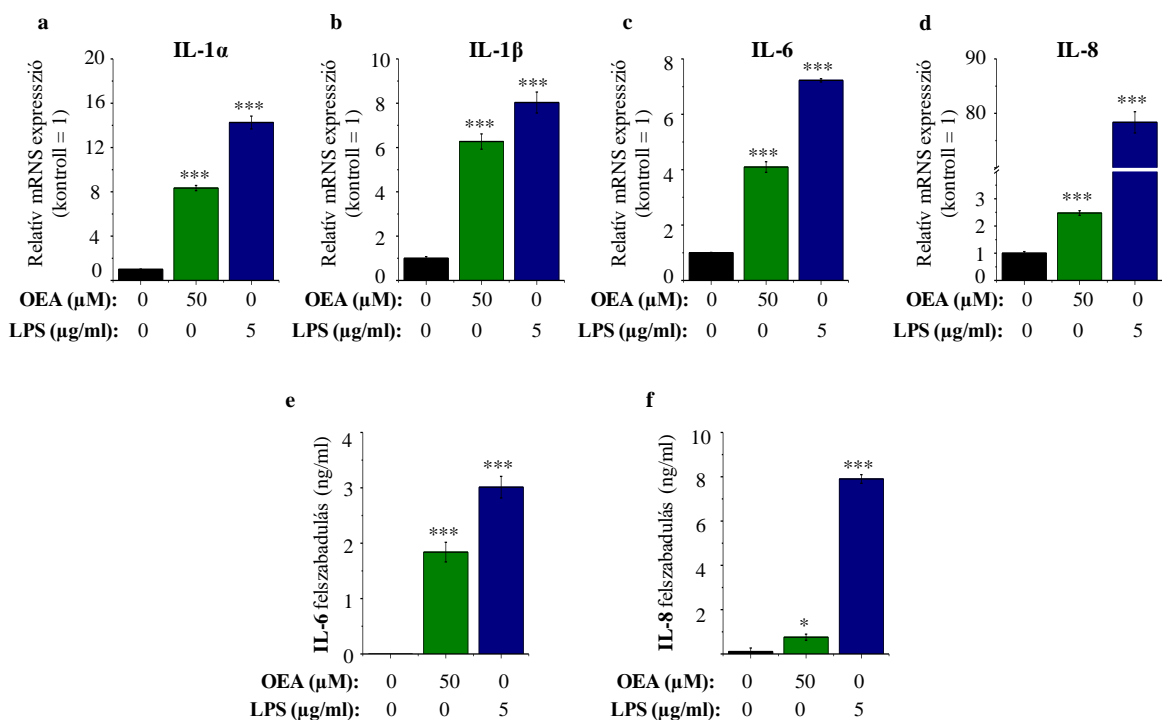


10. ábra Az OEA fokozza a faggyúlipid-termelést és a szebociták differenciálódását

(a-b) Tenyészteteinket 24 (a) és 48 (b) órán keresztül kezeltük, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. *, ***p<0,05, illetve 0,001 a kontroll csoporthoz képest. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. (c) Az áramlási citometriás mérést megelőzően a szebocitákat a jelzett módon kezeltük 48 órán át, majd a differenciáltsági állapottal jól korreláló granulációt az oldalra szórás mérésével követtük nyomon. A görbe jobbra tolódása az OEA kezelés hatására megnövekedett granulációt jelzi. (d) Tenyészteteinket 48 órán keresztül kezeltük az ábrán látható módokon (AEA: 30 μM; AA: 50 μM; LA: 100 μM; T: 1 μM), majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. **, ***p<0,01, illetve 0,001 a kontroll csoporthoz képest. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. (e) Tenyészteteinket 48 órán keresztül kezeltük az ábrán látható módon, majd kombinált fluoreszcens DilC₁(5)-SYTOX Green jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt oldószer kontroll (DilC₁(5)), illetve a nekrozis pozitív kontrollként alkalmazott lizis pufferral kezelt sejtek átlagának százalékában (SYTOX Green) ábrázoltuk. **, ***, illetve ### p<0,01, illetve 0,001 a megfelelő kontroll csoporthoz képest.

6.1.2. Az OEA gyulladásoos választ vált ki humán szebocitákon

Annak érdekében, hogy tovább vizsgáljuk az OEA hatását a humán szebocitákra, megvizsgáltuk a sejtek immunfenotípusára gyakorolt hatásait. Megállapítottuk, hogy OEA-kezelés (50 μM ; 3 óra) szignifikáns mértékben fokozta számos kulcsfontosságú gyulladásoos citokin (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 és IL-8) mRNS szintű kifejeződését (Q-PCR), és megnövelte az IL-6 és IL-8 felszabadulását (ELISA), bár a hatása rendre elmaradt a pozitív kontrollként alkalmazott Toll-like receptor 4 aktivátor LPS esetében tapasztaltaktól (**11. ábra**). Adataink tehát arra engednek következtetni, hogy a differenciálódás elősegítése mellett az OEA számottevő gyulladásoos választ is kiválthat humán szebocitákon.

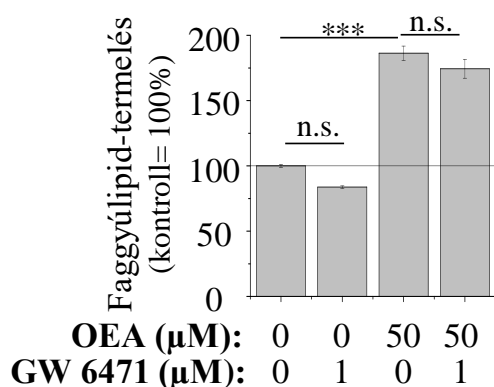


11. ábra Az OEA növeli számos gyulladásoos citokin kifejeződését és felszabadulását

(a-d) Q-PCR. A jelzett 3 óras kezeléseket követően a Q-PCR vizsgálat során belső kontrollként a 18S RNS-t alkalmaztuk. A relatív génextpressziók megállapításához az eredményeket a $\Delta\Delta\text{CT}$ módszert alkalmazva előbb a 18S RNS expressziós szintjére, majd a kontroll esetében tapasztalt relatív expresszióra normalizáltuk, és átlag \pm SD alakban ábrázoltuk (N=3). *** p <0,001 a kontroll csoporthoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. (e-f) ELISA. A fenti kezeléseket során keletkezett szebocita felülűszök IL-6 és IL-8 tartalmát ELISA technikával határoztuk meg. Az eredményeket átlag \pm SEM alakban fejeztük ki (N=2-3). Egy további kísérlet hasonló eredményre vezetett. *, *** p <0,05, illetve 0,001 a kontroll csoporthoz képest.

6.1.3. Az OEA lipogén hatása nem a PPAR α útvonalon keresztül valósul meg

Ezután megvizsgáltuk, hogy mi állhat a fent leírt differenciálódást elősegítő hatások hátterében. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a PPAR-ok fontos szereplői a lipidszintézis szabályozásának, és a humán szebocitákon is kifejeződnek (158). Mivel az OEA képes aktiválni a PPAR α -t (47), megvizsgáltuk, hogy ez a nukleáris receptor részt vesz-e az OEA lipogén hatásának közvetítésében humán szebocitákon. Megállapítottuk, hogy a szelektív PPAR α antagonistá GW 6471 (1 μ M) nem befolyásolta szignifikánsan az OEA által kiváltott faggyúlipid-termelést (48 órás kezelések; **12. ábra**), így elmondható, hogy az OEA differenciációt és faggyúlipid-termelést fokozó hatása minden valószínűség szerint a PPAR α -tól független útvonalon keresztül alakul ki humán szebocitákon.

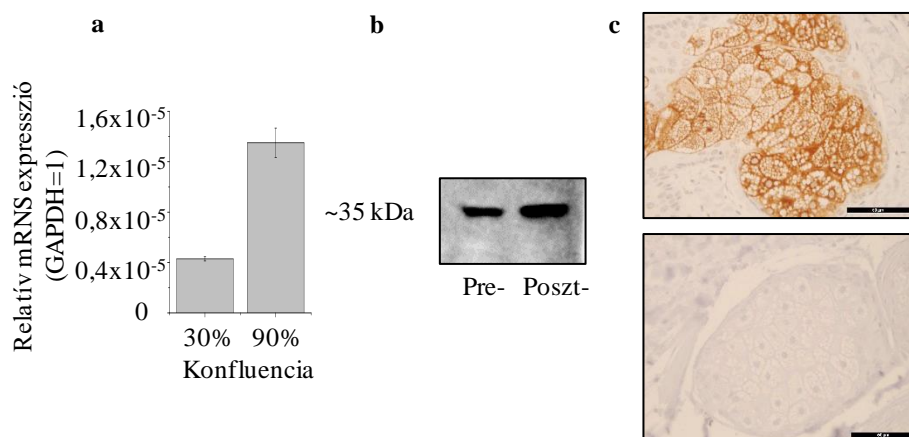


12. ábra Az OEA lipogén hatását nem a PPAR α mediálja

Nile Red jelölés. Tenyészteinket 48 órán keresztül kezeltük az ábrán látható kombinációkban, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. *** p < 0,001 a jelzett csoportok között. n.s.: nem szignifikáns különbség. Két további kísérlet hasonló eredményre vezetett.

6.1.4. A GPR119 kifejeződik humán szebocitákon *in vitro* és *in situ* is

Tekintettel arra, hogy irodalmi adatok alapján nemcsak a PPAR α , hanem a korábban „árvareceptor”-ként számon tartott GPR119 is közvetítheti az OEA biológiai hatásait (159), megvizsgáltuk, hogy ez a receptor expresszálódik-e humán szebocitákon. Kimutattuk, hogy a GPR119 mind mRNS (Q-PCR), mind fehérje szinten (Western blot) jelen van tenyésztett humán szebocitákon (**13. ábra**), és kifejeződik *in situ* humán faggyúmirigyekben is (immunhisztokémia; **13. ábra**).

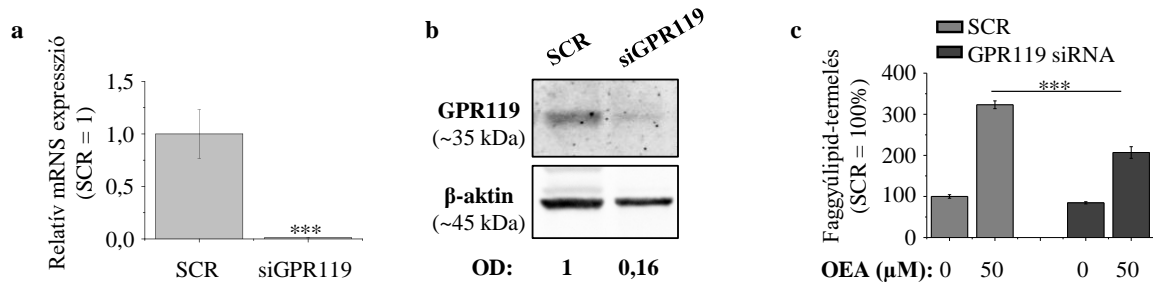


13. ábra A *GPR119* kifejeződik humán sebocitákon

(a) A Q-PCR vizsgálatot különböző konfluenciájú kultúrákból kiindulva végeztük. Belső kontrollként a GAPDH expresszióját határoztuk meg, majd a relatív génexpressziók megállapításához az eredményeket a Δ CT módszert alkalmazva a GAPDH expressziós szintjére normalizáltuk, és átlag \pm SD alakban (N=3) ábrázoltuk. (b) A Western blot vizsgálatot pre-, valamint posztkonfluens kultúrákból kiindulva végeztük. (c) Immunhisztokémia. A specifikus GPR119 immunpozitivitást 3,3'-diaminobenzidin (DAB; barna szín) segítségével tettük láthatóvá, míg a magokat hematoxilinnel (kék) jelöltük. Negatív kontrollként (alsó ábra) az elsődleges antitest elhagyásával készült jelölést használtunk. Eredeti nagyítás: 400 \times . Méretvonalak: 50 μ m.

6.1.5. A *GPR119* szelektív géncsendesítése csökkenti az OEA lipogén hatását

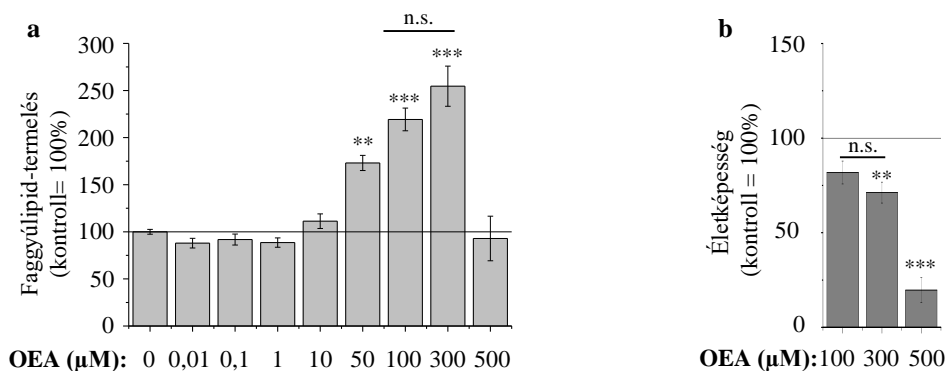
Miután többféle módszerrel is sikerült bizonyítanunk, hogy az OEA lehetséges receptora, a GPR119 kifejeződik humán sebocitákon, megvizsgáltuk, hogy szerepet játszik-e az OEA biológiai hatásainak közvetítésében. Ezt (ismert szelektív antagonisták hiányában) (160) siRNS-mediált szelektív géncsendesítés segítségével vizsgáltuk meg. Megállapítottuk, hogy a GPR119 expressziójának csökkentése (melyet mRNS szinten Q-PCR, fehérje szinten pedig Western blot segítségével követtünk nyomon; **14. ábra**), bár teljesen nem védte ki, de szignifikánsan csökkentette az OEA lipogén hatását a non-sense RNS-sel transzfektált SCR kontroll sejtek esetében tapasztalhatóhoz képest (**14. ábra**). Mindez azt jelzi, hogy az OEA faggyúlipid-szintézist fokozó hatásának kialakításában nagy valószínűséggel szerepet játszik a GPR119 aktiválódása, azonban nem zárható ki, hogy GPR119-független lipogén útvonalak is hozzájárulhatnak a folyamathoz.



14. ábra A GPR119 szelektív géncsendesítése jelentősen csökkenti az OEA lipogén hatását

(a) A szebocitákat a transzfekeiót követő 2. napon arattuk, majd Q-PCR vizsgálatot végeztünk. Belső kontrollként a 18S RNS expresszióját határoztuk meg, majd a relatív géncxpressziók megállapításához az eredményeket a $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmazva a 18S RNS expressziós szintjére, majd a non-sense RNS-sel transzfekeiótált „scrambled” (SCR) kontroll esetén mért értékre normalizáltuk, és átlag \pm SD alakban (N=3) ábrázoltuk. ***p<0,001. (b) A non-sense RNS-sel transzfekeiótált „scrambled” (SCR) kontroll és a GPR119-csendesített SZ95 szebociták Western blot vizsgálata a transzfekeiót követő 2. napon aratott mintákból. (c) A GPR119-géncsendesített, illetve SCR-transzfekeiótált szebociták faggyúlipid-termelését Nile Red jelöléssel követtük nyomon. Tenyészeteinket 48 órán keresztül kezeltük az ábrán látható kombinációkban. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt SCR kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. ***p<0,001. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

A receptorok által közvetített hatások általában telítési kinetikát mutatnak, ezért az eredmények indirekt megerősítésére megvizsgáltuk azt is, hogy az OEA magasabb koncentrációi (100, 300 és 500 μ M) milyen hatással vannak a lipidszintézisre.



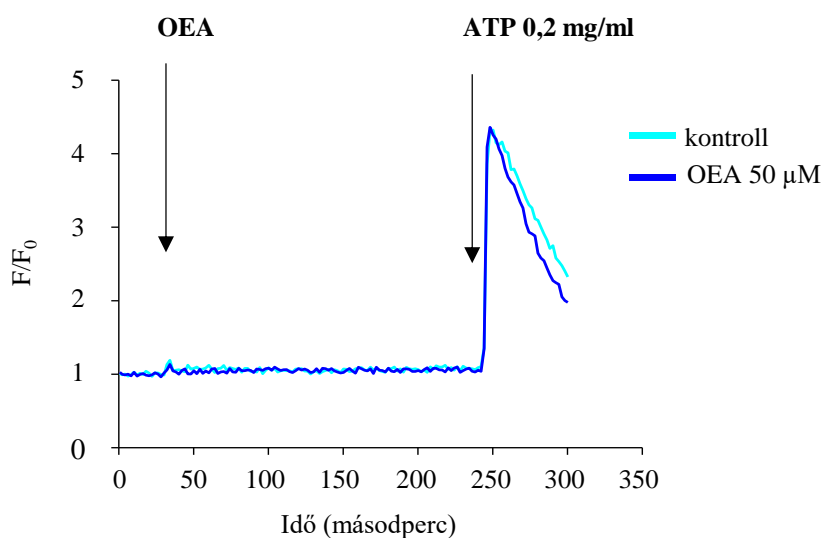
15. ábra Az OEA koncentráció függően növeli a faggyúlipid-szintézist, 500 μ M-ban alkalmazva pedig csökkenti a szebociták életképességét

(a) Nile Red jelölés. Tenyészeteinket 24 órán keresztül kezeltük az ábrán látható módon, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=12), az ábrán folytonos vonallal jelölt (100%) kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. ** és *** p<0,01, illetve 0,001 a kontroll csoporthoz képest. n.s.: nem szignifikáns különbség. (b) MTT-assay. Tenyészeteinket 24 órán keresztül kezeltük az ábrán látható módokon, majd MTT-assay-t végeztünk. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=12), az ábrán folytonos vonallal jelölt (100%) kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. ** és *** p<0,01, illetve 0,001 a kontroll csoporthoz képest. n.s.: nem szignifikáns különbség.

Megállapítottuk, hogy a faggyúlipid-szintézis tovább fokozódott 100 és 300 μM -os OEA koncentrációk hatására, ahol a hatás szaturálódott, hiszen a 100 és 300 μM -os kezelést követően létrejött lipidtermelés nem különbözött szignifikánsan, míg az egyértelműen citotoxikus 500 μM -os OEA koncentráció alkalmazása már értelemszerűen alacsonyabb lipidszintet eredményezett (**15. ábra**).

6.1.6. Az OEA lipogén hatásának kialakításában több kináz kaszkád is részt vesz

Ezután megvizsgáltuk az OEA egyes, a faggyúlipid-termelés szempontjából fontos szabályozókra, így a Ca^{2+} homeosztázisra és az ERK1/2 MAPK kaszkádra gyakorolt hatásait (114,156).

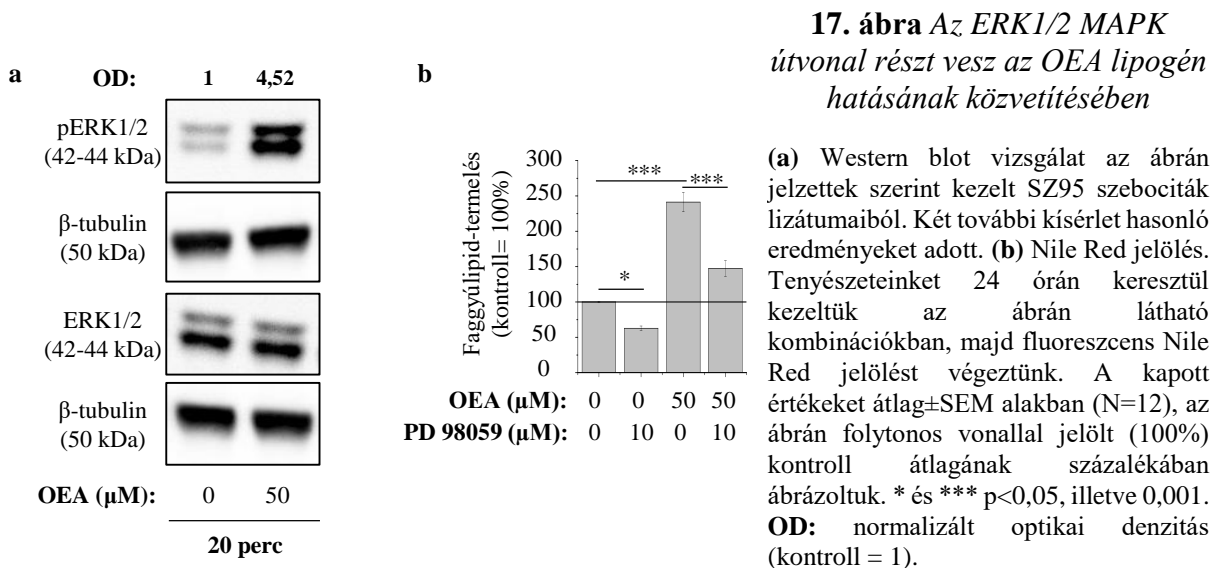


16. ábra Az OEA nincs hatással az SZ95 szebociták kalcium homeosztázisára

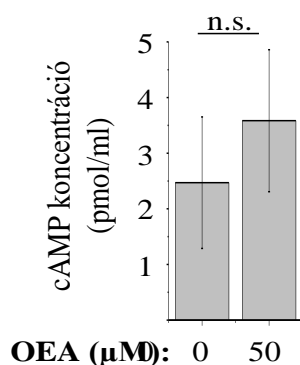
Fluo-4 AM-alapú fluoreszcens Ca^{2+} -mérések (N=8) reprezentatív analóg görbéi. Pozitív kontrollként ATP-t alkalmaztunk. A kezelőanyagok bemérésére a kísérlet a nyílal megjelölt időpontjaiban került sor; a görbéket a kezelést megelőző alapjellel korrigáltan, F/F_0 formában ábrázoltuk.

Megállapítottuk, hogy az akut OEA-kezelés (50 μM) nem befolyásolta az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC-t}}$ (Fluo-4 AM fluoreszcens Ca^{2+} -jelölés; **16. ábra**), azonban jelentősen fokozta az ERK1/2 MAPK foszforilációját (Western blot), azaz a „klasszikus” eCB-okhoz hasonlóan (114,156) aktiválta a kaszkádot (50 μM , 20 perces kezelés; **17. ábra**).

Tekintettel arra, hogy a „klasszikus” eCB-ok esetén az ERK1/2 MAPK gátlása szignifikánsan csökkentette a faggyúlipid-termelést (156), következő lépésként megvizsgáltuk, hogy a PD 98059 nevű ERK1/2 MAPK inhibitor (149) miként befolyásolja az OEA lipogén hatását. Megállapítottuk, hogy a PD 98059 egyidejű alkalmazása jelentősen csökkentette az OEA lipogén hatását (24 órás kezelések; **17. ábra**), megerősítve, hogy ezen útvonal aktiválása valóban részt vesz az OEA hatásainak közvetítésében. Azt is meg kell ugyanakkor jegyezni, hogy a PD 98059 önmagában alkalmazva csökkentette a bazális faggyúlipid-termelést (**17. ábra**), jelezve, hogy az útvonal „alap” aktivitása valószínűleg hozzájárul a szebociták homeosztatis faggyúlipid-termelésének fenntartásához is.



Mivel a GPR119 általában (bár nem kizárólag) G_s-proteinhez kapcsolt receptorként fejt ki biológiai hatásait (19), megvizsgáltuk azt is, hogy az OEA befolyásolja-e az intracelluláris cAMP szintet humán szebocitákban. Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy az OEA-kezelés (50 μM; 60 perc) csak kis, nem szignifikáns mértékben fokozta a humán szebociták cAMP-szintjét (**18. ábra**).



18. ábra Az OEA csak kis, nem szignifikáns mértékben fokozza a humán szebociták cAMP szintjét

cAMP ELISA SZ95 szebociták lizátumából az ábrán jelölt 60 perces kezelést követően. A kapott értékeket átlag±SD alakban (N=3) ábrázoltuk. n.s.: nem szignifikáns különbség.

Annak érdekében, hogy további információt nyerjünk az OEA sejtelettani hatásainak pontos mechanizmusáról, „Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit” segítségével megvizsgáltuk, hogy milyen kináz kaszkádok aktiválódnak humán szebocitákon OEA-kezelés hatására (3. táblázat).

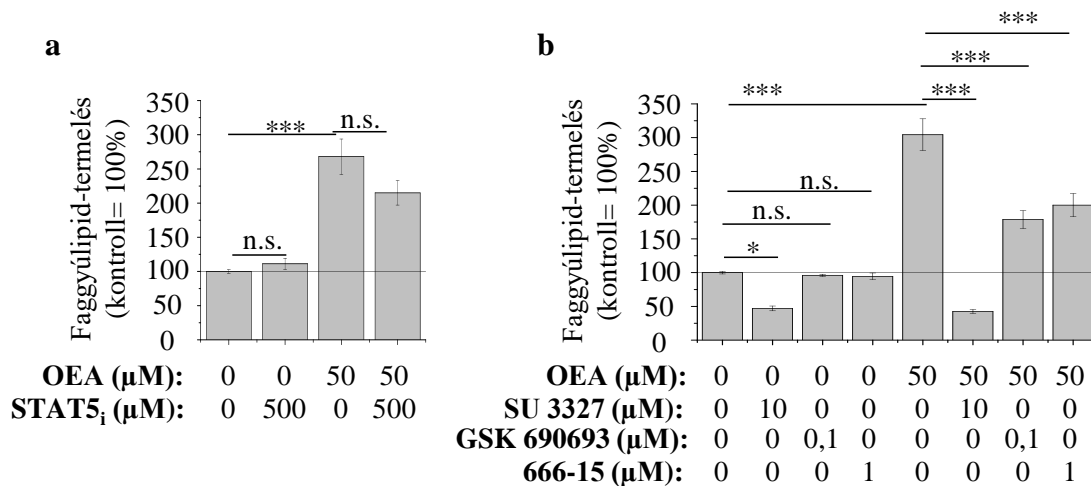
3. táblázat Az OEA-kezelés (20 perc; 50 μM) hatására a foszfokináz array-n releváns (≥1,3-szoros) jelintenzitás-növekedést mutató jelmolekulák listája

Szignálmolekula		Foszforilációs hely	Relatív jelintenzitás (kontroll = 1)
Rövidítés	Teljes név		
JNK 1/2/3	„c-Jun N-terminal kinase” 1/2/3	T183/Y185 (aktiváló foszforiláció: JNK1 és 2), T221/Y223 (aktiváló foszforiláció: JNK3)	1,31
AMPKα1	AMP-aktivált protein kináz α1	T183 (aktiváló foszforiláció)	1,36
CREB	„cAMP responsive element binding protein” 1	S133 (aktiváló foszforiláció)	1,37
STAT5b	„Signal transducer and activator of transcription” 5b	Y699 (aktiváló foszforiláció)	1,39
STAT5a	„Signal transducer and activator of transcription” 5a	Y694 (aktiváló foszforiláció)	1,40
GSK-3α/β	Glikogén szintáz kináz-3α/β	S21/S9 (gátló foszforiláció)	1,41
STAT5a/b	„Signal transducer and activator of transcription” 5a/b	Y694/Y699 (aktiváló foszforiláció)	1,42
Akt 1/2/3	Protein kináz B	S473 (aktiváló foszforiláció)	1,46
-	β-katenin	-	1,57

Megállapítottuk, hogy az OEA-kezelés (20 perc; 50 μM) hatására több jelátviteli út is aktiválódott (pl. CREB [„cAMP-responsive element binding factor”], STAT5a/b [„signal

transducer and activator of transcription 5a/b”]), melyek között ismert lipogén útvonalakat (pl. c-Jun N-terminális kináz-1, -2, -3 [JNK 1/2/3], Akt/protein kináz B [PKB]) (161–163) is sikerült azonosítanunk (**3. táblázat**).

Ezt követően a leginkább relevánsnak tűnő útvonalak (JNK, Akt/PKB, CREB, illetve STAT5) részvételét az OEA hatásainak közvetítésében specifikus inhibitorok alkalmazásával is megvizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a STAT5 farmakológiai gátlása nem változtatta meg szignifikánsan az OEA-indukált lipogenezist, míg a JNK, a CREB és az Akt/PKB szelektív gátlása jelentősen csökkentette az OEA lipogén hatását (48 órás kezelések; **19. ábra**)^{††}.



19. ábra Az OEA lipogén hatása a JNK, az Akt/PKB és a CREB útvonal közvetítésével, de STAT5-független módon alakul ki

(a-b) Nile Red jelölés. Tenyészetünket 48 órán keresztül kezeltük az ábrán látható kombinációkban, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (a: N=8; b: N=12), az ábrán folytonos vonallal jelölt (100%) kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. *, *** p<0,05, illetve 0,001. n.s.: nem szignifikáns különbség. **666-15**: CREB-inhibitor; **GSK 690693**: Akt/PKB-inhibitor; **STAT5_i**: STAT5-inhibitor; **SU 3327**: JNK-inhibitor.

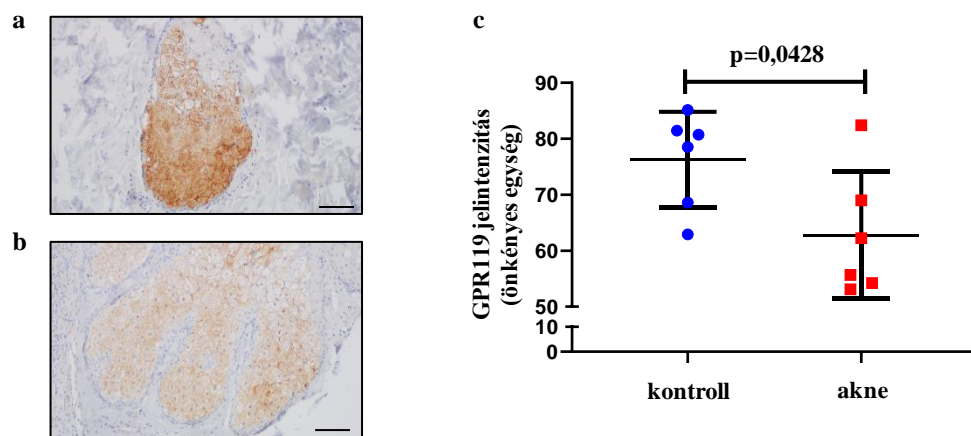
6.1.7. A GPR119 down-regulálódik aknéban

A fenti adatok alapján feltételezhető, hogy ha a homeosztatis OEA→GPR119 jelátvitel szabályozásában zavar keletkezik, az hozzájárulhat olyan, rendellenes faggyúmirigy-

^{††} Megjegyzendő, hogy (az ERK1/2 MAPK gátlásakor tapasztaltakhoz hasonlóan; **17. ábra**) a JNK inhibitor önmagában való alkalmazása is csökkentette a bazális faggyúlipid-termelést, ami arra utal, hogy az útvonal kezeletlen sejteken is aktív lehet, és hozzájárulhat a homeosztatis lipidszintézis fenntartásához.

működéssel jellemezhető kórképek kialakulásához, mint pl. a szeporrea vagy az akne. Ezért kísérleteink transzlációs relevanciáját növelendő úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk a GPR119 expressziójának esetleges változásait aknés, valamint aknéban nem szenvedő donorok faggyúmirigyeiben. A donorok releváns anamnesztikus adatait az *Anyagok és módszerek* fejezetben foglaltuk össze (**2. táblázat**).

A szigorúan sztenderdizált módon elvégzett immunhisztokémiai vizsgálat és a szemikvantitatív képanalízis elvégzését követően azt tapasztaltuk, hogy a viszonylag alacsony donorszám és a donorok közötti nagy variabilitás ellenére is a GPR119 expressziója szignifikánsan csökkent az aknés donorok faggyúmirigyeiben (**20. ábra**). Mindez azt jelenti, hogy a homeosztatis GPR119 jelátvitel zavara legalább az aknés betegek egy részében előfordulhat.



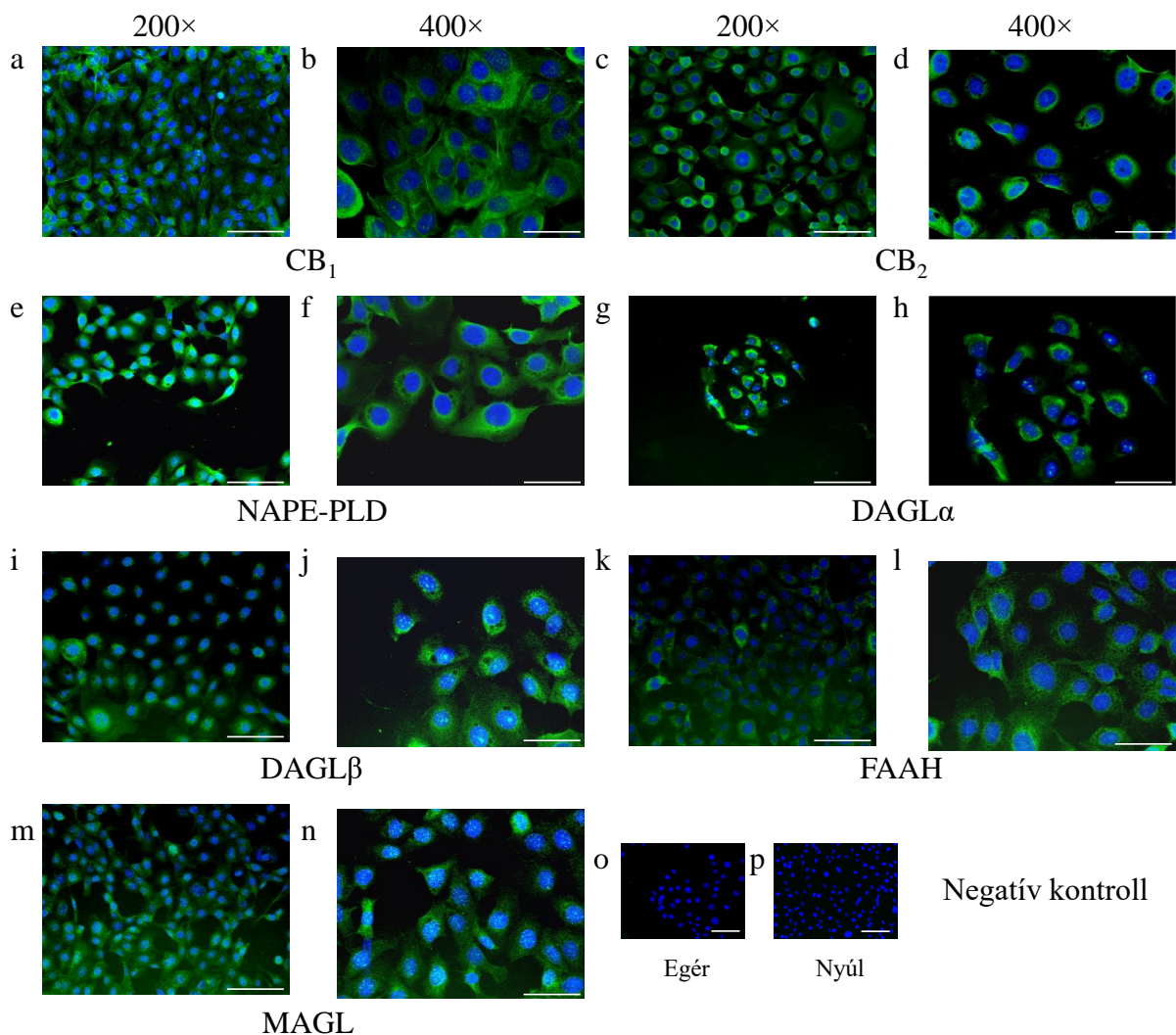
20. ábra A GPR119 down-regulálódik az aknéban szenvedő betegek faggyúmirigyeiben

(a-b) Reprezentatív immunhisztokémiai képek (a: egészséges donor; b: aknéban szenvedő donor). A specifikus GPR119 immunpozitivitást DAB (barna szín) segítségével vizualizáltuk, míg a magokat hematoxilin (kék) festékekkel jelöltük. Eredeti nagyítás: 200×. Méretvonalak: 100 µm. (c) A GPR119 jelintenzitás szemikvantitatív képanalízist követő statisztikai elemzése (szórásdiagram; átlag±SD). Mindegyik pont egy kontroll személy (kék) vagy egy aknéban szenvedő beteg (piros) faggyúmirigyében mért átlagos jelintenzitást jelzi.

6.2. Az eCB jelátvitel vizsgálata humán korneális epitélsejteken

6.2.1. A humán korneális epitélsejtek kifejezik az ECS legfontosabb tagjait

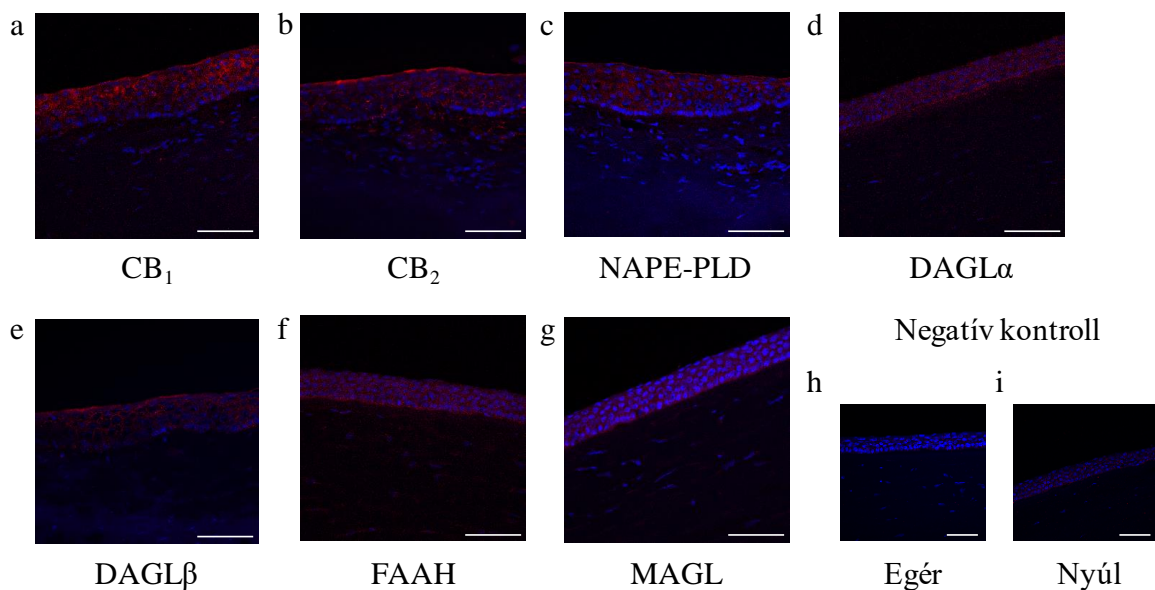
Kísérleteink első lépéseként az ECS legfontosabb tagjai, azaz a „klasszikus” kannabinoid receptorok (CB₁ és CB₂), valamint az eCB-okat felépítő (NAPE-PLD, DAGL α és β) és lebontó (FAAH és MAGL) enzimek jelenlétét vizsgáltuk meg humán korneális epitélsejteken *in vitro* és *in situ*. Megerősítettük, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően (141,164) a HCEC-ek kifejezik a CB₁-et és a CB₂-t (immunfluoreszcens jelölés; **21. ábra**).



21. ábra A tenyésztett HCEC-ek kifejezik az ECS legfontosabb tagjait

Immunfluoreszcens jelölés. (a-n) A jelölések szerinti specifikus immunreaktivitást zöld fluoreszcencia mutatja a HCEC tenyészeteken. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük (kék fluoreszcencia). (o) A c, d, illetve g-n paneleken bemutatott festések negatív kontrollja. (p) Az a, b, e és f paneleken bemutatott festések negatív kontrollja. A méretvonal az eredeti nagyítástól (200 \times , illetve 400 \times) függően 100 vagy 50 μ m.

Kimutattuk azt is, hogy ezen a túlmenően a HCEC-ek kifejezik az eCB-okat szintetizáló (NAPE-PLD, DAGL α és - β) és lebontó (FAAH és MAGL) legfontosabb enzimeket is (immunfluoreszcens jelölés; **21. ábra**). Fontos megjegyezni, hogy ugyanezen fehérjék megtalálhatók a humán korneális epitéliumban *in situ* is (immunfluoreszcens jelölés; **22. ábra**). Mindez tehát azt jelenti, hogy a humán korneális epitélium valóban képes lehet eCB termelésre és lebontásra. A két folyamat által szabályozott eCB tónus pedig szerepet játszhat egyebek mellett a lokális gyulladásos folyamatok finomhangolásában (141).



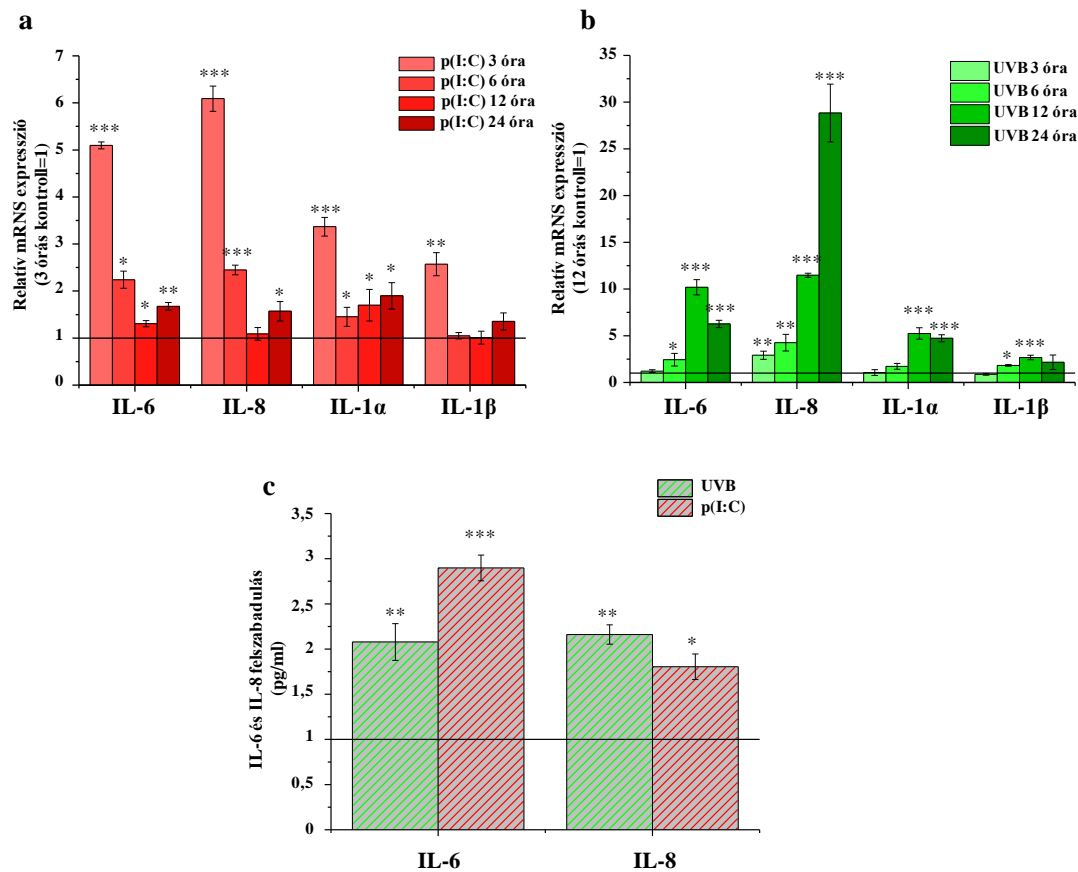
22. ábra Az ECS legfontosabb tagjai kifejeződnek a humán korneális epitéliumban *in situ*

(a) CB₁ specifikus, (b) CB₂ specifikus, (c) NAPE-PLD specifikus, (d) DAGL α specifikus, (e) DAGL β specifikus, (f) FAAH specifikus és (g) MAGL specifikus immunreaktivitás, amit a vörös fluoreszcencia mutat a humán kornea metszeteken. A sejtmagokat DAPI-val (kék) jelöltük. (h) A b, d–g paneleken szereplő festések negatív kontrollja. (i) Az a és c paneleken szereplő festések negatív kontrollja. Méretvonal: 50 μ m.

6.2.2. A TLR3 aktivációval és UVB besugárzással kiváltott gyulladásos válasz jellegzetes időfüggést mutat HCEC-eken

Ezt követően célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon az AEA CB₁-függő gyulladáscsökkentő hatása (141) kizárólag a TRPV1 aktiváció esetén alakul-e ki, vagy esetleg egy univerzális hatásról van szó, ami a TRPV1-től független gyulladásos szignálok esetén is

hatékony marad. Ennek érdekében először két klinikailag releváns, a TRPV1-től és egymástól is független mechanizmus révén ható gyulladás-induktort alkalmaztunk: a TLR3 aktiváció révén virális keratitist utánozó p(I:C)-t (20 µg/ml), valamint a fénykárosodás által kiváltott keratitisz modelljeként UVB besugárzást (40 mJ/cm²).



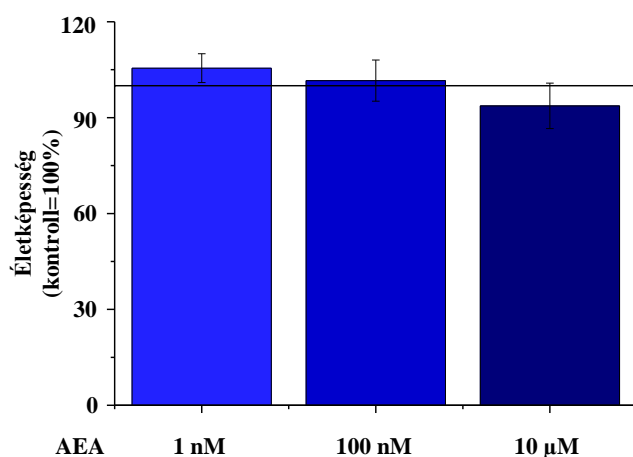
23. ábra A TLR3 aktivációval és UVB besugárzással kiváltott gyulladós válasz jellegzetes időfüggést mutat HCEC-eken

(a-b) Q-PCR vizsgálat HCEC-eken. A relatív génexpressziót 3, 6, 12, illetve 24 órás p(I:C) kezelést követően (a), illetve 3, 6, 12, 24 és 48 órával az UVB besugárzás (40 mJ/cm²) után (b) vizsgáltuk meg. Belső kontrollként a *18S RNS* (a), illetve a *PPIA* (b) expresszióját határoztuk meg. A relatív génexpressziók megállapításához az eredményeket a $\Delta\Delta CT$ módszer alkalmazva a belső kontrollok expressziós szintjére, majd az adott időponthoz tartozó kontroll tenyészetek esetén mért értékre (az ábrákon folytonos vonallal jelölve) normalizáltuk, és átlag±SD alakban (N=3) ábrázoltuk. Egy további kísérlet hasonló eredményeket hozott. *, **, *** rendre p<0,05, 0,01, illetve 0,001 az adott időponthoz tartozó kontroll csoporthoz képest. (c) Az IL-6 és az IL-8 meghatározása ELISA technikával a HCEC-ek felülszójából 3 órás p(I:C) kezelést követően, illetve 12 órával az UVB besugárzás után. Az eredményeket átlag±SD alakban fejeztük ki (N=3), és az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll tenyészetek esetén mért értékre normalizáltuk. Egy további kísérlet hasonló eredményre vezetett. *, **, illetve *** rendre p<0,05, 0,01, illetve 0,001 a kontroll csoporthoz képest.

Első lépésként megvizsgáltuk a két kezelés által kiváltott gyulladási válasz dinamikáját. Megállapítottuk, hogy mindkét inger fokozta több gyulladási citokin (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 és IL-8) mRNS szintű kifejeződését (**23/a-b ábra**). A növekedés a vizsgált időpontok (p(I:C): 3, 6, 12 és 24 óra; UVB 3, 6, 12, 24 és 48 óra) közül 3 óránál (p(I:C) kezelés), illetve 12 óránál (UVB besugárzás) bizonyult a legmarkánsabbnak (**23/a-b ábra**), ezért ezekben az időpontokban a gyulladási citokinek felülúszóba történő felszabadulását is megvizsgáltuk ELISA technikával. Azt tapasztaltuk, hogy az IL-6 és az IL-8 szintje mindkét esetben megnövekedett (**23/c ábra**), míg az IL-1 α és IL-1 β koncentrációja a detekciós küszöb alattinak bizonyult (nem publikált megfigyelés). A fenti eredmények fényében további kísérleteink során 3 (TLR3 aktiváció), illetve 12 órás kezeléseket (UVB modell) alkalmaztunk.

6.2.3. Az AEA hatásai a gyulladási citokinek expressziójára és felszabadulására jelentős koncentráció- és modellfüggést mutat HCEC-eken

Az AEA humán korneális epitelsejtekre gyakorolt lehetséges gyulladáscsökkentő hatásainak (141) vizsgálata érdekében az AEA-t alacsony (100 nM) és magas (10 μ M) koncentrációban alkalmaztuk a fent említett modellekben. Kísérleteink „nulladik” lépéseként megállapítottuk, hogy az AEA a jelzett koncentrációkban nem befolyásolta szignifikánsan a HCEC-ek életképességét (MTT-assay; 24 órás kezelése; **24. ábra**), így a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható.



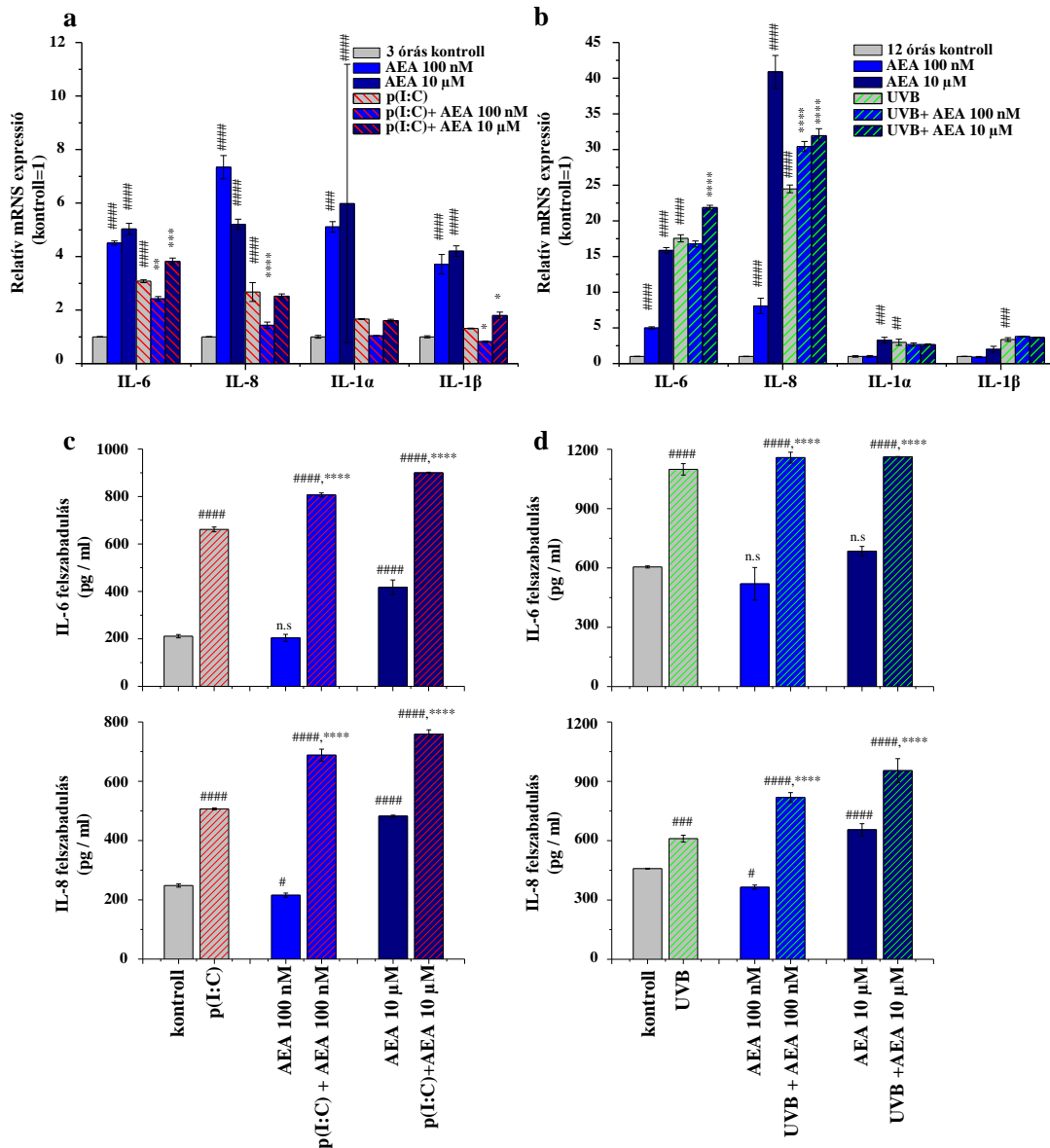
24. ábra Az AEA vizsgált koncentrációi nem befolyásolják a HCEC-ek életképességét

MTT-assay. Tenyészeteket 24 órán keresztül kezeltük az ábrán látható módon, majd MTT-assay-t végeztünk. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. Három további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Meglepő módon az AEA mindkét koncentrációban jelentős növekedést okozott a vizsgált gyulladásos citokinek mRNS szintű kifejeződésében 3 órával a kezelés után (**25/a ábra**), és ez a növekedés 12 óra elteltével is megfigyelhető maradt az IL-6 és IL-8 esetén (mindkét koncentráció), illetve az IL-1 α esetén (10 μ M) (**25/b ábra**). Érdekes módon, bár az adott időpontban (3h) önmagában gyulladásos választ indukált, a 100 nM-os AEA-kezelés mégis szignifikánsan csökkentette a p(I:C) hatását az IL-6, az IL-8 és az IL-1 β kifejeződésére (**25/a ábra**). 10 μ M-os koncentrációban viszont ellenkező hatást figyeltünk meg, ugyanis az AEA az IL-6 és az IL-1 β szintjének további növekedését okozta, miközben nem volt hatással az IL-8 és az IL-1 α expresszióra (**25/a ábra**).

A TLR3 aktivációs modell esetén tapasztaltakkal szemben UVB besugárzást (40 mJ/cm²) követően (12 órás kezelés) egyáltalán nem figyeltünk meg gyulladásgátló hatást. Sőt, az AEA 10 μ M-os koncentrációja tovább növelte az IL-6 és az IL-8 expressziót, de nem befolyásolta az IL-1 α és β kifejeződését, és még az alacsonyabb, 100 nM-os koncentrációban alkalmazott AEA is fokozta az IL-8 szintjét (**25/b ábra**).

A legszembetűnőbb változásokat szeretnénk volna fehérje szinten is megvizsgálni, így a tényezetek felülúszójából ELISA technika segítségével mutattuk ki az IL-6-ot és az IL-8-at. Amint az várható volt, mind a p(I:C) (3h), mind az UVB besugárzás (40 mJ/cm²; 12h) jelentősen fokozta az IL-6 és az IL-8 koncentrációját a felülúszóban, amit érdekes módon az AEA mindkét koncentrációja tovább fokozott (**25/c-d ábra**). Ezzel szemben az önmagában alkalmazott AEA hatásait vizsgálva azt tapasztaltuk, 100 nM-os koncentrációban mind 3, mind 12 órás kezelést követően szignifikánsan csökkentette a spontán IL-8 felszabadulást, de nem volt hatással az IL-6 koncentrációjára (**25/c-d ábra**). 10 μ M-os koncentrációban ezzel szemben mindkét időpontban fokozta az IL-8 és 3 órás kezelése során szignifikánsan növelte az IL-6 felszabadulását (**25/c-d ábra**).



25. ábra Az AEA koncentráció- és modellfüggő módon befolyásolja a gyulladásos citokinek kifejeződését és felszabadulását HCEC-eken

(a-b) Q-PCR vizsgálat HCEC-eken. A relatív géneexpressziót 3 órák p(I:C) (±AEA) kezelést követően (a), illetve 12 órával az UVB besugárzás (40 mJ/cm²) után (±AEA) (b) vizsgáltuk meg. Belső kontrollként a *18S RNS* (a), illetve a *PPIA* (b) expresszióját határoztuk meg. A relatív géneexpressziók megállapításához az eredményeket a $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmazva a belső kontrollok expressziós szintjére, majd az adott időponthoz tartozó kontroll tenyészetek esetén mért értékre normalizáltuk, és átlag±SD alakban (N=3) ábráztuk. Egy további kísérlet hasonló eredményre vezetett. (c-d) Az IL-6 és az IL-8 meghatározása ELISA technikával a HCEC-ek felülszójából 3 órák p(I:C) (±AEA) kezelést követően (c), illetve 12 órával az UVB besugárzás (±AEA) után (d). Az eredményeket átlag±SD alakban fejeztük ki (N=3). Egy további kísérlet hasonló eredményre vezetett. (a-d) */#, **/###, ***/####, ****/##### rendre p<0,05, 0,01, 0,001, illetve 0,0001 az adott időponthoz tartozó kontroll csoporthoz (#), illetve a kizárólag p(I:C)-vel vagy UVB-vel kezelt csoporthoz (*) képest.

7. Diszkusszió

7.1. A „nem-klasszikus” eCB jelátvitel vizsgálata humán faggyúmirigyekben

Kísérleteink első felében a humán faggyúmirigyek ECS-ének eddig nem vizsgált aspektusaival foglalkoztunk. Munkacsoportunk a korábbiakban kimutatta, hogy a humán faggyúmirigyek kifejezik a CB₂ kannabinoid receptort (156), amely fontos szerepet játszik a homeosztatisz faggyúlipid-termelés fenntartásában (156). Megállapítottuk, hogy a szebocitákban megtalálhatóak a legfontosabb eCB-ok (AEA és 2-AG), és a szebociták eCB-kezelése a CB₂ → ERK1/2 MAPK → PPAR útvonal aktiválásával drámaian fokozza a lipogenezist (156). Kimutattuk azt is, hogy a faggyúmirigyek sejtjei kifejezik az eCB-ok lebontásáért (MAGL és FAAH) és szintéziséért (NAPE-PLD, DAGL α és β) felelős legfontosabb enzimeket, és bizonyosodott, hogy az eCB-tónus egyes EMT-inhibitorok (VDM11 és AM404) alkalmazásával történő mérsékelt fokozása megnöveli a faggyúlipid-termelést, és gyulladásgátló hatást vált ki (39). Fenti kísérleteink nemvárt eredményeként azt is megállapítottuk, hogy a szebociták képesek az OEA metabolizmusára (39), így felmerült, hogy a korábban leírt „klasszikus” eCB-ok (azaz az AEA és a 2-AG) mellett ez az „eCB-szerű” molekula is befolyásolhatja a faggyúmirigyek biológiai folyamatait.

Az OEA lehetséges szerepének tisztázására elsőként egymást kiegészítő sejtélettani vizsgálmódszereket alkalmazva megállapítottuk, hogy ez a molekula elősegíti a humán szebociták differenciálódását, hiszen a sejtek OEA-kezelése szignifikánsan fokozta faggyúlipid-termelést (Nile Red), megnövelte szebociták granuláltságát (áramlási citometria), és korai apoptotikus folyamatokat indukált (DiI_{C1}(5)-SYTOX Green jelölés) (24-48 órás kezelések; **10. ábra**). Az OEA biológiai hatásait tovább vizsgálva kimutattuk azt is, hogy potens lipogén koncentrációja (50 μ M) gyulladást vált ki szebocitákon (3 órás kezelések; Q-PCR és ELISA) (**11. ábra**), de nem befolyásolja az életképességet (24-48 órás kezelések; MTT-assay; **8. ábra**), illetve a sejtszámot (48 órás kezelés; CyQUANT proliferációs assay; **9. ábra**).

Fontos megjegyezni, hogy bár (mint az fentebb már említésre került) az EMT gátlása esetén azt tapasztaltuk, hogy a faggyúlipid-szintézis mérsékelt fokozódását gyulladásgátló hatások kísérték (39), nem példanélküli a szebociták esetén, hogy a lipogén hatások gyulladásozó folyamatokkal járnak együtt. Kollaborációs partnereink a közelmúltban derítették fényt rá, hogy a leptin nemcsak fokozza a faggyúlipidek termelését, de egyszersmind (a STAT3, valamint a p65 NF- κ B útvonal aktiválásával) gyulladásozó választ is kivált humán szebocitákon (165).

Az alapjelenség leírását követően hatásmechanizmus tanulmányozásával folytattuk kísérleteinket. Kimutattuk, hogy az OEA lipogén hatása független a PPAR α -tól (**12. ábra**), ezért megvizsgáltuk, hogy az OEA egy másik lehetséges receptora, a GPR119 kifejeződik-e a szebocitákon. Megállapítottuk, hogy a GPR119 mind mRNS, mind fehérje szinten megtalálható a sejteken, és kifejeződik intakt faggyúmirigyekben is (**13. ábra**). Szelektív antagonisták hiányában a következőkben siRNS transzfekció segítségével sikeresen csökkentettük a GPR119 kifejeződését humán szebocitákon, és megállapítottuk, hogy a beavatkozás jelentősen mérsékelte az OEA lipogén hatását (**14. ábra**), így az nagy valószínűséggel (legalább részben) a GPR119 aktivációja révén alakult ki.

Az OEA lipogén hatásának mechanizmusát „szűrőjelleű” (foszfokináz array; **3. táblázat**), illetve célzott (cAMP ELISA, fluoreszcens Ca²⁺-mérés, szelektív farmakológiai inhibitorok; **16. 18. és 19. ábra**) tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy nemcsak a „klasszikus” eCB-ok esetén leírt (156) ERK1/2 MAPK kaszkád (**17. ábra**), hanem más jelátviteli útvonalak (a JNK, az Akt/PKB és CREB) aktiválása is szerepet játszik a kialakulásában (**3. táblázat; 19. ábra**), míg a piloszebáceus egység immunfolyamatainak befolyásolásában részt vevő STAT5 (166) farmakológiai gátlásának nem volt rá szignifikáns hatása (**19. ábra**).

Fontos megemlíteni, hogy - habár a GPR119 aktiválódása jellemzően G_s -fehérjéhez kapcsolt útvonalon keresztül emeli az intracelluláris cAMP szintet - irodalmi adatok alapján a receptorra jellemző az „elfogult agonizmus” jelensége, azaz ligandumtól függően különböző hatékonysággal több alternatív jelátviteli útvonalat is aktiválhat (19). Ezek között kiemelkedő jelentőséggel bír a β -arresztin útvonal, amely nemcsak a G-fehérje-kapcsolt receptorok deszenzitizálásáért felelős, hanem az ERK1/2 MAPK kaszkád aktiválására is képes (20). Ezzel összhangban, egy nemrégiben megjelent tanulmányban kimutatták, hogy az oleoil-lizofoszfátidil-inozitolnak a glükagonszerű peptid-1 szekrécióra gyakorolt hatásait L-sejteken a GPR119 közvetítette, mégpedig az ERK1/2 MAPK és a cAMP/PKA/CREB útvonalak aktiválása révén (21), míg egy másik tanulmány tanúsága szerint a GPR119 aktiválását a cAMP-szint emelkedése mellett Ca^{2+} -szint emelkedés, valamint az ERK1/2 MAPK kaszkád aktiválódása is követheti (22). Ennek ellenére érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy az OEA 50 μ M-os koncentrációban alkalmazva nem volt hatással a szebociták Ca^{2+} homeosztázisára (**16. ábra**, akut kezelés)^{§§}, és a szebociták cAMP szintjét is csak kis, nem szignifikáns mértékben emelte meg (**18. ábra**).

Ez utóbbi eredmény egyrészt magyarázható lehet alternatív másodlagos jelátviteli útvonalak aktiválásával („elfogult agonizmus”); másfelől azonban, ha figyelembe vesszük a cAMP szignaling jólismert kompartmentalizációját (167), nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy a cAMP hozzájárulhat az OEA bizonyos hatásaihoz, hiszen kísérleteinkben a cAMP szintet teljessejt-lizátumból (és csak egyetlen időpontban) határoztuk meg, de nem vizsgáltuk meg, hogy statisztikailag szignifikánsan emelkedik-e a cAMP szintje a különböző sejten belüli mikrokompartimentekben (és/vagy más időpontokban) az OEA kezelés hatására.

^{§§} Ez már csak azért is meglepőnek tűnhet, mert (amint arról a *Bevezetés* fejezetben már szó esett) az OEA elméletileg képes aktiválni (45) a szebocitákon funkcionálisan aktív formában kifejeződő (113), dominánsan Ca^{2+} -ra permeábilis TRPV1-et. Bár a jelenség hátterét jelen projekt során nem vizsgáltuk, a legvalószínűbb magyarázatnak az tűnik, hogy irodalmi adatok alapján az OEA csak bizonyos (esetünkben hiányzó) egyéb körülmények (pl. előzetes PKC aktiváció) együttes fennállása esetén képes fokozni a TRPV1 aktivitását (45).

Ezzel az elképzeléssel egybecsengenek a foszfokináz array során nyert eredményeink, melyek szerint a CREB foszforilálódik (aktiválódik) OEA kezelés hatására (**3. táblázat**), farmakológiai gátlása pedig számottevően csökkenti az OEA lipogén hatását (**19. ábra**). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a cAMP (is) szerepet játszhat az OEA bizonyos hatásainak közvetítésében humán szebocitákon. Fontos ugyanakkor hangsúlyozni, hogy a CREB aktiválása nemcsak a cAMP szint emelkedésén keresztül érhető el, hanem alternatív másodlagos jelpályákon keresztül is, ideértve egyebek mellett az Akt/PKB útvonalat is (168). Ismert, hogy az Akt/PKB (162,163), valamint a JNK MAPK (161,162) útvonalak közvetíthetik különféle mediátorok lipogén hatásait humán szebocitákon. Ezzel összhangban eredményeink azt mutatták, hogy az OEA kezelés aktiválta ezeket az útvonalakat (**3. táblázat**), farmakológiai gátlásuk pedig csökkentette az OEA által kiváltott faggyúlipid-termelést (**19. ábra**).

A fentiekén túl figyelemreméltó momentum, hogy az Akt/PKB képes foszforilálni és ezáltal inaktiválni az egyebek mellett a β -katenin ubikvitinálódását és degradációját is elősegítő GSK-3 α/β enzimet (169–171). Ezzel összhangban a foszfokináz array során azt találtuk, hogy az OEA-kezelés a GSK-3 α/β működését gátló (S21/S9) foszforilációhoz, valamint a β -katenin szint emelkedéséhez vezetett (**3. táblázat**). Ezek az adatok közvetetten azt erősítik meg, hogy az Akt/PKB útvonal valóban aktiválódik az OEA-kezelés során humán szebocitákban.

Bár a fentiek alapján az OEA-GPR119 tengely és a kapcsolódó másodlagos jelpályák a faggyúlipid-termelés fokozódásához vezetnek, érdekes módon az aknés és aknéban nem szenvedő donorok bőrmintáit összehasonlítva arra az eredményre jutottunk, hogy az aknés betegek faggyúmirigyeiben a GPR119 fehérje szintű expressziója szignifikánsan csökkent (**20. ábra**). Bár a kísérletbe bevont donorok viszonylag alacsony a száma, valamint az egyes donorok közötti relatíve nagy variabilitás miatt korai lenne merész következtetéseket levonni, adataink alapján mégis úgy tűnik, hogy a homosztatikus GPR119 jelátvitel az aknés betegek egy részénél valóban zavart szenvedhet.

Bár jelen kísérleteink nem adnak választ arra a kérdésre, hogy az egyébként eredményeink alapján lipogén hatásokat közvetítő GPR119 kifejeződése miért csökken aknéban szenvedő betegek faggyúmirigyekben, elméleti megfontolások alapján több lehetséges magyarázat is kínálkozik. Az aktivációt követő down-reguláció/deszzenzitizálódás jólismert jelenség több G-fehérjéhez kapcsolt receptor (172–175), így a GPR119 esetében is (19,22). Ennek fényében eredményeink egyik lehetséges magyarázata, hogy a GPR119 (túl) aktiválódása inkább az akne patogenezisének kezdeti szakaszában és nem a későbbi progresszióban játszik szerepet. Alternatív hipotézisként természetesen az is lehetséges, hogy a lipogén GPR119 receptor down-regulációja egy a már eleve kórosan magas szintet elérő faggyútermelésre adott másodlagos, kompenzációs mechanizmusként alakul ki.

Az eredmények értelmezésekor fontos kitérni arra is, hogy a munkánk során alkalmazott OEA-koncentráció magasnak tűnhet a vegyület irodalmi adatok alapján ismert átlagos plazmakoncentrációjának (~4 nM) fényében (176). Számos érv szól ugyanakkor amellett, hogy az általunk alkalmazott koncentráció relevánsak mondható. Először is, a sebociták expresszálják a NAPE-PLD-t (amely az OEA szintézisében is részt vevő kulcsfontosságú enzim) (177), ezért az OEA lokális koncentrációja magasabb lehet, mint a szérumban mért érték (39). Másodsor, az IUPHAR adatbázis szerint az OEA pEC₅₀ értéke GPR119 esetén 5,4-6,3 (azaz ~ 500 nM-4 μM) (160), ami azt jelenti, hogy a GPR119 teljes aktiválásához az OEA-t az alacsony mikromoláris tartományban kell alkalmazni.^{***} Hasonlóképpen, egy másik nemrégiben megjelent tanulmányban a szerzők 5 mM 2-oleoil-glicerint (2-OG) alkalmaztak a GPR119 aktiválására és az intraokuláris nyomás csökkentésére. GPR119^{-/-} egereken végzett kísérleteik tanúsága szerint ennek a látszólag rendkívül magas 2-OG koncentrációnak a hatását továbbra is a GPR119 közvetítette (178). Ez, kiegészítve azzal a ténnyel, hogy az IUPHAR adatbázis szerint a 2-OG pEC₅₀ értéke 5,6, vagyis szinte azonos az OEA-éval, arra enged

^{***} Megjegyzendő, hogy egy másik munkacsoport is a fentiekhez hasonló EC₅₀-adatokat (a vizsgált másodlagos jelpályától függően 85 nM - 15 μM) publikált a közelmúltban (19).

következtetni, hogy az 50 μM OEA alkalmazása a mi kísérletes rendszerünkben is releváns lehet. A fentiekén túl persze azt is figyelembe kell vennünk, hogy a szebocitákat szérumot tartalmazó tápoldatban tenyésztettük, és így a tápoldat plazmafehérjei megköthették az erősen lipofil OEA egy részét, így nagyon valószínű, hogy az OEA aktív, szabad frakciójának koncentrációja alacsonyabb volt, mint az alkalmazott koncentráció. Végezetül azt is érdemes megjegyezni, hogy a „klasszikus” eCB-ok (azaz az AEA és a 2-AG) szintén az alacsony mikromoláris tartományban (30 μM) fejtik ki a faggyúlipid-szintézist és differenciálódást fokozó hatásaikat egy másik G-protein-kapcsolt receptor, a CB_2 aktiválásával (156).

Végezetül érdemes szót ejteni arról is, hogy eredményeinknek különös transzlációs relevanciát adnak azon állatkísérletes adatok, melyek alapján a GPR119 a jövőben terápiás célpont lehet a 2-es típusú cukorbetegség kiegészítő kezelésében. Bár az eddig vizsgált szintetikus agonisták nem jutottak túl a II. fázisú klinikai vizsgálatokon (36), az ígéretes állatkísérletes adatok ösztönzőleg hatnak új, nagyobb *in vivo* hatékonysággal bíró GPR119-aktivátorok fejlesztésére, tesztelésére (35). Tekintve, hogy a GPR119 különböző agonistái eltérő másodlagos jelpályákat aktiválhatnak (19), eredményeink nem feltétlenül jelentik azt, hogy minden GPR119 agonista esetében számítani kell majd bőrgyógyászati, a faggyúmirigyek működését érintő mellékhatások kialakulására. Azonban azon agonisták esetében, amelyek az OEA-val nagymértékben átfedő másodlagos jelpályákat aktiválnak, az ilyen mellékhatások kialakulása nem zárható ki, feltéve, hogy kellően magas koncentrációt érnek el a faggyúmirigyekben. Eredményeink fényében ezért a jövőbeli klinikai vizsgálatok során a lehetséges bőrgyógyászati komplikációk kialakulására is érdemes lesz figyelmet fordítani.

Eredményeink összességében az OEA-GPR119 jelátviteli útvonalat a humán faggyúlipid-termelés és a szebociták differenciálódásának egy korábban ismeretlen, pozitív regulátoraként azonosítják. A sejtek OEA kezelése proinflammatorikus fenotípus kialakulásához vezetett, ami felveti annak lehetőségét, hogy ennek a jelátviteli rendszernek a

diszregulációja hozzájárulhat a fokozott faggyúlipid-termeléssel és gyulladással jellemezhető akne kialakulásához.

7.2. Az ECS vizsgálata HCEC-eken

A szaruhártyát felépítő epitélisejtek a szemfelszín első védelmi vonalaként működnek, és ennek során fizikai és immunológiai jellegű kihívásoknak is meg kell felelniük (127). Ez utóbbi kihívások jelentősége igen nagy, hiszen a kornea kóros gyulladással járó folyamatai a szaruhártya átlátszóságának elvesztéséhez és ezzel vaksághoz vezethetnek (179). Újabb eredmények alapján a HCEC-ek nem kizárólag „passzív elszennvedői”, hanem (pl. MHC-II molekulák kifejezése vagy éppen különféle citokinek/kemokinek termelése révén) aktív alakítói is a lokális gyulladással járó folyamatoknak (180,181).

A HCEC-ek gyulladással járó válaszainak egyik szabályozója a TRPV1, hiszen a receptor aktiválása gyulladással járó mediátorok felszabadulásához vezet (132,141), míg a CB₁ receptor AEA-dal történő aktivációja kivédte a TRPV1 hatásait, azaz (legalábbis ebben a modellben) gyulladásgátló hatásának bizonyult (141). Tekintve, hogy a legfőbb „klasszikus” eCB-ok (AEA és 2-AG) jelen vannak a humán korneális epitéliumban (182), jelen kísérleteink során azt a célt tűztük ki magunk elé, hogy feltérképezzük az ECS eddig nem azonosított tagjainak kifejeződését a humán korneális epitéliumban, illetve megvizsgáljuk, hogy az AEA más (a TRPV1 aktivációjától függetlenül kialakuló) gyulladással járó folyamatok esetén is gyulladásgátló hatást mutat-e.

Kísérleteink során elsőként megerősítettük (CB₁ és CB₂), illetve kimutattuk (NAPE-PLD, DAGL α és $-\beta$, MAGL, FAAH), hogy az ECS legfontosabb tagjai kifejeződnek tenyésztett HCEC-eken és intakt humán korneális epitéliumban is (**21.** és **22. ábra**). Ezt követően az AEA lehetséges gyulladásgátló szerepét vizsgáltuk meg részletesebben.

Ehhez két olyan, klinikailag releváns stresszort (a vírusfertőzéseket modellező TLR3 aktivációt, valamint UVB-besugárzást) választottunk, melyek gyulladást kiváltó hatása nagy valószínűséggel független a TRPV1 aktivitásától. Kimutattuk, hogy mind a p(I:C)-kezelés, mind az UVB besugárzás jellegzetes időbeli lefutással fokozza különböző gyulladásoos citokinek (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8) mRNS-szintű kifejeződését HCEC-ekben (**23. ábra**). Mindezek alapján további kísérleteink során a legmarkánsabb választ mutató időpontokra (p(I:C): 3 óra; UVB: 12 óra) fókuszáltunk. Miután kimutattuk, hogy az AEA vizsgálni tervezett koncentrációi (100 nM és 10 μ M) nem befolyásolják a HCEC-ek életképességét (MTT-assay; **24. ábra**), először az önmagában adagolt AEA hatásait figyeltük meg. Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy az AEA mindkét koncentrációban (100 nM és 10 μ M) és mindkét időpontban (3 és 12 óra) fokozta több gyulladásoos citokin mRNS-szintű expresszióját (Q-PCR; **25. ábra**). Emellett – bár 100 nM-ban alkalmazva 3 és 12 órás kezeléseik során is csökkentette a spontán IL-8 felszabadulást - 10 μ M-os koncentrációban alkalmazva már mindkét időpontban fokozta azt, sőt, 3 órás kezeléseik során az IL-6 szintjét is szignifikánsan növelte (ELISA; **25. ábra**), azaz várakozásainkkal szemben döntően proinflammatorikusnak bizonyult. Adataink emellett arra is rávilágítottak, hogy az AEA differenciáltan modulálhatja a már meglévő, előre szintetizált citokinek felszabadulását és *de novo* termelését.

Kimutattuk azt is, hogy – bár az AEA 100 nM-os koncentrációban csökkentette több gyulladásoos citokin p(I:C) által indukált mRNS-szintű kifejeződését (Q-PCR; **25. ábra**), az IL-6 és IL-8 felszabadulást már tovább fokozta (ELISA; **25. ábra**), 10 μ M-os koncentrációban pedig szintén egyértelműen proinflammatorikusnak bizonyult (Q-PCR és ELISA; **25. ábra**). Az UVB modell vizsgálatakor még egységesebb biológiai viselkedéssel szembesültünk: azon esetekben, amikor az AEA bármelyik koncentrációjának volt statisztikailag szignifikáns hatása, az minden esetben a gyulladásoos válasz további fokozása volt (Q-PCR és ELISA; **25. ábra**).

Ezek az eredmények első ránézésre ellentmondanak azon irodalmi adatoknak, amelyek szerint a CB₁ aktiválása egy szintetikus agonistával vagy AEA-dal gátolta a TRPV1 aktiválást (141,183). Bár a jelenség háttérében álló mechanizmust nem vizsgáltuk részletesebben, az ellentmondás feloldására több feltételezéssel is élhetünk. Elsőként fontos megjegyezni, hogy az AEA maga is képes aktiválni a TRPV1-et (184), így lehetséges, hogy csak akkor gyulladásgátló hatású, ha a TRPV1-et egy erősebb hatást kiváltó (magasabb „efficacy”-val jellemezhető) ligandum aktiválja a szaruhártya epitelsejtjein, aminek a hatásával az AEA „gyengébb”, parciális agonistaként interferálhat. Ilyen ligand hiányában azonban a mi kísérleteinkben maga is TRPV1-mediált mechanizmussal válhatott gyulladáskeltővé, és ez a gyulladáshoz vezető válasz a független mechanizmussal kiváltott gyulladáshoz vezető folyamatokkal additív módon bizonyult.

A jelenség háttérét kutatva természetesen azt is érdemes tekintetbe venni, hogy az AEA számos más molekuláris célpontra is hathat. A teljesség igénye nélkül ilyenek a GPR55 (185), a GPR18 (186), a Cav3.1, a Cav3.2, a Cav3.3 (187), a K_{2P}3.1 (188), a TRPM8 (189) és a Kv1.2 (190). Ezek közül a GPR18-ról már leírták, hogy szabályozza az intraokuláris nyomást és a korneális sebgyógyulást (191,192), de annak eldöntése, hogy bármelyik már ismert vagy még azonosításra váró alternatív célpont kifejeződik-e a korneális epitelsejteken, és befolyásolhatja-e azok gyulladáshoz vezető folyamatait, jövőbeli, célzott kísérletek feladata lesz.

Végezetül azt is meg kell jegyezni, hogy eredményeink alapján az AEA lebontásáért felelős fő katabolikus enzim, a FAAH, kifejeződik a humán szaruhártya epitelsejtjein *in vitro* és *in situ* is (21. és 22. ábra), az AEA FAAH általi lebontása pedig egy gyulladáshoz vezető lipidmediátor, az arachidonsav termelését eredményezi. Az arachidonsav és származékai (pl. a leukotrién B₄) fontos szereplők a szemészeti betegségek széles skálájának patogenezisében, ideértve számos szaruhártyával kapcsolatos kórképet is olyannyira, hogy gátlásuk a közelmúltban ígéretes, új terápiás eszközként jelent meg egyes szemészeti gyulladáshoz vezető

folyamatok mérséklésében (193–195). Mindezek fényében lehetséges, hogy bizonyos körülmények között az AEA gyorsan arachidonsavvá, majd más proinflammatorikus mediátorokká metabolizálódva váltja ki a kísérleteink során tapasztalt gyulladási választ, ami valamiért nem következik be TRPV1-aktivátorok jelenlétében (141,183). Természetesen jelenlegi ismereteink nem elégségesek annak eldöntésére, hogy a fenti mechanizmusok közül melyik milyen mértékben járulhat hozzá az AEA most leírt gyulladási hatásához, így a folyamat jobb megértéséhez további vizsgálatokra van szükség.

Akárhogy is, az ECS szerepének pontosabb megértése a különféle keratitiszek és egyéb gyulladási szembetegségek patomechanizmusában közelebb vihet a jelzett betegségekben hatékony, új terápiás eszközök kifejlesztéséhez. Jelen tanulmányunk eredményei azonban arra is ráirányítják a figyelmet, hogy egy ilyen összetett rendszerbe való beavatkozáskor fokozott óvatosságra van szükség, hiszen akár az általánosságban gyulladásgátlóként ismert eCB-ok is fejthetnek ki gyulladási folyamatokat fokozó hatást.

8. Összegzés

Kísérleteink első felében a célunk az volt, hogy megvizsgáljuk milyen hatást gyakorol az OEA a humán szebociták biológiai folyamataira. Megállapítottuk, hogy 50 μM -os koncentrációig a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható, és nem befolyásolja az SZ95 szebociták proliferációját. Többféle vizsgálómódszert alkalmazva kimutattuk azt is, hogy az OEA-kezelés fokozta a faggyúlipid-termelést és a szebociták differenciálódását, valamint megnövelte több gyulladáscitokin kifejeződését és felszabadulását. A jelenség mechanizmusát kutatva megállapítottuk, hogy az OEA nem a PPAR α aktiválása révén fejti ki a lipogén hatását, hiszen a szelektív PPAR α antagonistá GW 6471 nem befolyásolta azt. A következőkben kimutattuk, hogy a humán szebociták kifejezik az OEA egy másik lehetséges receptorát, a GPR119-et is, amelynek a szelektív géncsendesítése jelentősen csökkentette az OEA faggyúlipid-termelést fokozó hatását. Megállapítottuk, hogy a lipogén hatás kialakításában több kináz kaszkád (ERK1/2, JNK, CREB, Akt/PKB) aktiválódása is szerepet játszik. Végezetül a GPR119 expresszióját aknés, valamint aknéban nem szenvedő donorok faggyúmirigyeiben vizsgálva azt találtuk, hogy GPR119 kifejeződése aknéban csökken, ami arra utal, hogy az OEA-GPR119 jelátviteli tengely valóban zavart szenvedhet a betegség patogenezise során.

Kísérleteink második felében HCEC-eket és humán szaruhártyamintákat vizsgálva megállapítottuk, hogy a humán korneális epitélsejtek kifejezik az ECS legfőbb tagjait *in vitro* és *in situ*. Kimutattuk azt is, hogy a várttal ellentétben HCEC-ek AEA kezelése már önmagában is proinflammatorikus hatást váltott ki, és megállapítottuk, hogy az AEA (bár a hatásai koncentrációfüggőnek bizonyultak) többnyire tovább fokozta a TLR3 aktivációt, illetve UVB- besugárzás által kiváltott virális keratitiszt, illetve fénykárosodást modellező gyulladáscitokin választ. Eredményeink szerint tehát az egyébként általában gyulladásgátló hatásúnak ismert eCB jelátvitel bizonyos körülmények között proinflammatorikus hatásokat is közvetíthet a humán korneális epitéliumban.

9. Summary

In the first part of our experiments, our aim was to investigate the effect of OEA on the biological processes of human sebocytes. We found that, up to 50 μ M, OEA could be used without the risk of cytotoxicity, and did not affect the proliferation of SZ95 sebocytes. Using a variety of assays, we also showed that OEA could increase sebaceous lipogenesis as well as differentiation of sebocytes, and it increased the expression and release of several pro-inflammatory cytokines, too. While exploring the mechanism of these phenomena, we found that OEA did not exert its lipogenic effect by activating PPAR α , as it was not affected by the selective PPAR α antagonist GW 6471. Next, we demonstrated that human sebocytes expressed GPR119, another potential receptor for OEA. Importantly, selective gene silencing of the said receptor significantly suppressed the lipogenic effect of OEA. Moreover, we could also show that the development of the lipogenic effect depended on the activation of several kinase cascades (ERK1/2, JNK, CREB, Akt/PKB). Finally, assessment of the expression of GPR119 in the sebaceous glands of acne patients as well as of acne-free individuals demonstrated that GPR119 was down-regulated in acne, suggesting that the OEA-GPR119 signaling axis may indeed be disrupted during the pathogenesis of the disease.

In the second part of our experiments, we investigated HCECs as well as human corneal samples, and found that human corneal epithelial cells expressed major members of ECS *in vitro* and *in situ*. We also showed that, contrary to expectations, AEA treatment of HCECs led to a proinflammatory effect. Moreover, albeit its effects were concentration-dependent, in most of the cases AEA further enhanced the inflammatory response evoked by TLR3 activation (mimicking viral keratitis) or by UVB irradiation (mimicking photodamage). Thus, our results suggest that eCB signaling, albeit generally considered to exert anti-inflammatory effects, may mediate proinflammatory actions in the human corneal epithelium under certain conditions.

10. Irodalomjegyzék

1. Russo EB. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem Biodivers*. 2007. augusztus;4(8):1614–48.
2. Walsh KB, McKinney AE, Holmes AE. Minor Cannabinoids: Biosynthesis, Molecular Pharmacology and Potential Therapeutic Uses. *Front Pharmacol*. 2021;12:777804.
3. Mechoulam R, Gaoni Y. A Total Synthesis of dl- Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish1 [Internet]. ACS Publications. American Chemical Society; 2002 [idézi 2021. július 29.]. Elérhető: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja01092a065>
4. Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988. november;34(5):605–13.
5. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993. szeptember 2.;365(6441):61–5.
6. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, és mtsai. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992. december 18.;258(5090):1946–9.
7. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, és mtsai. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995. június 29.;50(1):83–90.
8. Tóth KF, Ádám D, Bíró T, Oláh A. Cannabinoid Signaling in the Skin: Therapeutic Potential of the „C(ut)annabinoid” System. *Molecules*. 2019. március 6.;24(5):E918.
9. Maccarrone M, Bab I, Bíró T, Cabral GA, Dey SK, Di Marzo V, és mtsai. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci*. 2015. május;36(5):277–96.
10. Solymosi K, Köfalvi A. Cannabis: A Treasure Trove or Pandora’s Box? *Mini Rev Med Chem*. 2017;17(13):1223–91.
11. Russo EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol*. 2011. augusztus;163(7):1344–64.
12. Iannotti FA, Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Prog Lipid Res*. 2016. április;62:107–28.
13. Rivera-Olmos VM, Parra-Bernal MC. [Cannabis: Effects in the Central Nervous System. Therapeutic, societal and legal consequences]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2016. október;54(5):626–34.
14. Moreno E, Chiarlone A, Medrano M, Puigdemívol M, Bibic L, Howell LA, és mtsai. Singular Location and Signaling Profile of Adenosine A2A-Cannabinoid CB1 Receptor

- Heteromers in the Dorsal Striatum. *Neuropsychopharmacology*. 2018. április;43(5):964–77.
15. McLaughlin RJ, Hill MN, Gorzalka BB. A critical role for prefrontocortical endocannabinoid signaling in the regulation of stress and emotional behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014. május;42:116–31.
 16. Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, és mtsai. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*. 1995. augusztus 15.;232(1):54–61.
 17. Godlewski G, Offertáler L, Wagner JA, Kunos G. Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2009. szeptember;89(3–4):105–11.
 18. Moran BM, Flatt PR, McKillop AM. G protein-coupled receptors: signalling and regulation by lipid agonists for improved glucose homeostasis. *Acta Diabetol*. 2016. április;53(2):177–88.
 19. Hassing HA, Fares S, Larsen O, Pad H, Hauge M, Jones RM, és mtsai. Biased signaling of lipids and allosteric actions of synthetic molecules for GPR119. *Biochem Pharmacol*. 2016. 0;119:66–75.
 20. Pouyssegur J. Signal transduction. An arresting start for MAPK. *Science*. 2000. 0;290(5496):1515–8.
 21. Arifin SA, Paternoster S, Carlessi R, Casari I, Ekberg JH, Maffucci T, és mtsai. Oleoyl-lysophosphatidylinositol enhances glucagon-like peptide-1 secretion from enteroendocrine L-cells through GPR119. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018;1863(9):1132–41.
 22. Zhang S, Li J, Xie X. Discovery and characterization of novel small molecule agonists of G protein-coupled receptor 119. *Acta Pharmacol Sin*. 2014. április;35(4):540–8.
 23. Fredriksson R, Höglund PJ, Gloriam DEI, Lagerström MC, Schiöth HB. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett*. 2003. november 20.;554(3):381–8.
 24. Chu Z-L, Jones RM, He H, Carroll C, Gutierrez V, Lucman A, és mtsai. A role for beta-cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucose-dependent insulin release. *Endocrinology*. 2007. június;148(6):2601–9.
 25. Soga T, Ohishi T, Matsui T, Saito T, Matsumoto M, Takasaki J, és mtsai. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005. január 28.;326(4):744–51.
 26. Chu Z-L, Carroll C, Alfonso J, Gutierrez V, He H, Lucman A, és mtsai. A role for intestinal endocrine cell-expressed g protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like Peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic Peptide release. *Endocrinology*. 2008. május;149(5):2038–47.

27. Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes*. 2009. május;58(5):1058–66.
28. Odori S, Hosoda K, Tomita T, Fujikura J, Kusakabe T, Kawaguchi Y, és mtsai. GPR119 expression in normal human tissues and islet cell tumors: evidence for its islet-gastrointestinal distribution, expression in pancreatic beta and alpha cells, and involvement in islet function. *Metabolism*. 2013. január;62(1):70–8.
29. Sakamoto Y, Inoue H, Kawakami S, Miyawaki K, Miyamoto T, Mizuta K, és mtsai. Expression and distribution of Gpr119 in the pancreatic islets of mice and rats: predominant localization in pancreatic polypeptide-secreting PP-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006. december 15.;351(2):474–80.
30. Li NX, Brown S, Kowalski T, Wu M, Yang L, Dai G, és mtsai. GPR119 Agonism Increases Glucagon Secretion During Insulin-Induced Hypoglycemia. *Diabetes*. 2018. július;67(7):1401–13.
31. Kato T, Harada N, Ikeguchi-Ogura E, Sankoda A, Hatoko T, Lu X, és mtsai. Gene expression of nutrient-sensing molecules in I cells of CCK reporter male mice. *J Mol Endocrinol*. 2021. január;66(1):11–22.
32. Parker HE, Habib AM, Rogers GJ, Gribble FM, Reimann F. Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from primary murine K cells. *Diabetologia*. 2009. február;52(2):289–98.
33. Sykaras AG, Demenis C, Case RM, McLaughlin JT, Smith CP. Duodenal enteroendocrine I-cells contain mRNA transcripts encoding key endocannabinoid and fatty acid receptors. *PLoS One*. 2012;7(8):e42373.
34. Bonini JA, Borowsky BE, Adham N, Boyle N, Thompson TO. Methods of identifying compounds that bind to SNORF25 receptors [Internet]. US6468756B1, 2002 [idézi 2021. november 14.]. Elérhető: <https://patents.google.com/patent/US6468756B1/en>
35. Tyurenkov IN, Kurkin DV, Bakulin DA, Volotova EV, Chafeev MA, Smirnov AV, és mtsai. ZB-16, a Novel GPR119 Agonist, Relieves the Severity of Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Diabetes in Rats. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:152.
36. Yang JW, Kim HS, Choi Y-W, Kim Y-M, Kang KW. Therapeutic application of GPR119 ligands in metabolic disorders. *Diabetes Obes Metab*. 2018. február;20(2):257–69.
37. Matias I, Di Marzo V. Endocannabinoid synthesis and degradation, and their regulation in the framework of energy balance. *J Endocrinol Invest*. 2006;29(3 Suppl):15–26.
38. Di Marzo V, Piscitelli F. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*. 2015. október;12(4):692–8.
39. Zákány N, Oláh A, Markovics A, Takács E, Aranyász A, Nicolussi S, és mtsai. Endocannabinoid Tone Regulates Human Sebocyte Biology. *J Invest Dermatol*. 2018;138(8):1699–706.

40. Nicolussi S, Gertsch J. Endocannabinoid transport revisited. *Vitam Horm.* 2015;98:441–85.
41. Mechoulam R, Hanuš LO, Pertwee R, Howlett AC. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci.* 2014. november;15(11):757–64.
42. Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, és mtsai. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature.* 2001. november 8.;414(6860):209–12.
43. Gaetani S, Oveisi F, Piomelli D. Modulation of meal pattern in the rat by the anorexic lipid mediator oleoylethanolamide. *Neuropsychopharmacology.* 2003. július;28(7):1311–6.
44. Proulx K, Cota D, Castañeda TR, Tschöp MH, D'Alessio DA, Tso P, és mtsai. Mechanisms of oleoylethanolamide-induced changes in feeding behavior and motor activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005. szeptember;289(3):R729-737.
45. Ahern GP. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem.* 2003. augusztus 15.;278(33):30429–34.
46. Wang X, Miyares RL, Ahern GP. Oleoylethanolamide excites vagal sensory neurones, induces visceral pain and reduces short-term food intake in mice via capsaicin receptor TRPV1. *J Physiol.* 2005. április 15.;564(Pt 2):541–7.
47. Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodríguez De Fonseca F, és mtsai. Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature.* 2003. szeptember 4.;425(6953):90–3.
48. Lo Verme J, Gaetani S, Fu J, Oveisi F, Burton K, Piomelli D. Regulation of food intake by oleoylethanolamide. *Cell Mol Life Sci.* 2005. március;62(6):708–16.
49. Suardíaz M, Estivill-Torrús G, Goicoechea C, Bilbao A, Rodríguez de Fonseca F. Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain.* 2007. december 15.;133(1–3):99–110.
50. Tough IR, Forbes S, Herzog H, Jones RM, Schwartz TW, Cox HM. Bidirectional GPR119 Agonism Requires Peptide YY and Glucose for Activity in Mouse and Human Colon Mucosa. *Endocrinology.* 2018. április 1.;159(4):1704–17.
51. Kárpáti S. *Bőrgyógyászat és venerológia.* 2013. kiad.
52. A szervezet és a környezet határán - ppt letölteni [Internet]. [idézi 2022. január 13.]. Elérhető: <https://slideplayer.hu/slide/2070093/>
53. Csaba Zs, Nemeskéri Á. *Bőr és bőrfüggelékek.* In: Rölich P. (szerk.) *Szövettan.* Budapest: Semmelweis Egyetem Képzéskutató, Oktatástechnológiai és Dokumentációs Központ.
54. Tóth BI, Oláh A, Szölloosi AG, Czifra G, Bíró T. „Sebocytes’ makeup”: novel mechanisms and concepts in the physiology of the human sebaceous glands. *Pflugers Arch.* 2011. június;461(6):593–606.

55. Zouboulis CC, Dessinioti C. A New Concept of Acne Pathogenesis. In: Zouboulis CC, Katsambas AD, Kligman AM, szerkesztő. Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014 [idézi 2022. január 13.]. o. 105–7. Elérhető: https://doi.org/10.1007/978-3-540-69375-8_13
56. Zouboulis CC, Baron JM, Böhm M, Kippenberger S, Kurzen H, Reichrath J, és mtsai. Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Exp Dermatol.* 2008. június;17(6):542–51.
57. Clayton RW, Langan EA, Ansell DM, de Vos IJHM, Göbel K, Schneider MR, és mtsai. Neuroendocrinology and neurobiology of sebaceous glands. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2020. június;95(3):592–624.
58. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci.* 2019. április 12.;20(8):1811.
59. Sanford JA, Gallo RL. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Seminars in immunology.* 2013. 0 30.;25(5):370.
60. T Y, H Y, Y A, A K, Y S, S I. Activation of TLR2 enhances tight junction barrier in epidermal keratinocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* [Internet]. 2011. szeptember 15. [idézi 2022. január 13.];187(6). Elérhető: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21841130/>
61. Kuo I-H, Carpenter-Mendini A, Yoshida T, McGirt LY, Ivanov AI, Barnes KC, és mtsai. Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function – Implications for atopic dermatitis and skin barrier repair. *J Invest Dermatol.* 2013. április;133(4):988–98.
62. Gallo RL, Huttner KM. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J Invest Dermatol.* 1998. november;111(5):739–43.
63. Bardan A, Nizet V, Gallo RL. Antimicrobial peptides and the skin. *Expert Opin Biol Ther.* 2004. április;4(4):543–9.
64. Braff MH, Gallo RL. Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;306:91–110.
65. Niyonsaba F, Nagaoka I, Ogawa H, Okumura K. Multifunctional antimicrobial proteins and peptides: natural activators of immune systems. *Curr Pharm Des.* 2009;15(21):2393–413.
66. Thody AJ, Shuster S. Control and function of sebaceous glands. *Physiol Rev.* 1989. április;69(2):383–416.
67. Schneider MR, Paus R. Sebocytes, multifaceted epithelial cells: lipid production and holocrine secretion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010. február;42(2):181–5.
68. Bíró T, Oláh A, Tóth BI, Szöllősi AG. Endogenous Factors That Can Influence Skin pH. *Curr Probl Dermatol.* 2018;54:54–63.
69. Smith KR, Thiboutot DM. Thematic review series: skin lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe? *J Lipid Res.* 2008. február;49(2):271–81.

70. Kurokawa I, Danby FW, Ju Q, Wang X, Xiang LF, Xia L, és mtsai. New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. *Exp Dermatol.* 2009. október;18(10):821–32.
71. Zouboulis CC, Picardo M, Ju Q, Kurokawa I, Törőcsik D, Bíró T, és mtsai. Beyond acne: Current aspects of sebaceous gland biology and function. *Rev Endocr Metab Disord.* 2016. szeptember;17(3):319–34.
72. Mattii M, Lovászi M, Garzorz N, Atenhan A, Quaranta M, Lauffer F, és mtsai. Sebocytes contribute to skin inflammation by promoting the differentiation of T helper 17 cells. *Br J Dermatol.* 2018. március;178(3):722–30.
73. Lovászi M, Szegedi A, Zouboulis CC, Törőcsik D. Sebaceous-immunobiology is orchestrated by sebum lipids. *Dermatoendocrinol.* 2017;9(1):e1375636.
74. Lovászi M, Mattii M, Eyerich K, Gácsi A, Csányi E, Kovács D, és mtsai. Sebum lipids influence macrophage polarization and activation. *Br J Dermatol.* 2017. december;177(6):1671–82.
75. Sun L, Liu W, Zhang L-J. The Role of Toll-Like Receptors in Skin Host Defense, Psoriasis, and Atopic Dermatitis. *J Immunol Res.* 2019;2019:1824624.
76. Blume U, Verschoore M, Poncet M, Czernielewski J, Orfanos CE, Schaefer H. The vellus hair follicle in acne: hair growth and sebum excretion. *Br J Dermatol.* 1993. július;129(1):23–7.
77. Zouboulis CC. Acne and sebaceous gland function. *Clin Dermatol.* 2004. október;22(5):360–6.
78. Pappas A. Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol.* 2009. március;1(2):72–6.
79. Shi VY, Leo M, Hassoun L, Chahal DS, Maibach HI, Sivamani RK. Role of sebaceous glands in inflammatory dermatoses. *J Am Acad Dermatol.* 2015. november;73(5):856–63.
80. Williams HC, Dellavalle RP, Garner S. Acne vulgaris. *Lancet.* 2012. január 28.;379(9813):361–72.
81. Rittié L, Tejasvi T, Harms PW, Xing X, Nair RP, Gudjonsson JE, és mtsai. Sebaceous Gland Atrophy in Psoriasis: An Explanation for Psoriatic Alopecia? *J Invest Dermatol.* 2016. szeptember;136(9):1792–800.
82. Picardo M, Ottaviani M, Camera E, Mastrofrancesco A. Sebaceous gland lipids. *Dermatoendocrinol.* 2009. március;1(2):68–71.
83. Hinde E, Haslam IS, Schneider MR, Langan EA, Kloepper JE, Schramm C, és mtsai. A practical guide for the study of human and murine sebaceous glands in situ. *Exp Dermatol.* 2013. október;22(10):631–7.
84. Plewig: Acne and rosacea - Google Scholar [Internet]. [idézi 2021. november 21.]. Elérhető: https://scholar.google.com/scholar_lookup?hl=en&publication_year=2000&author=G.+Plewig&author=A.+M.+Kligman&title=Acne+and+Rosacea

85. Bedord CJ, Young JM. A comparison of comedonal and skin surface lipids from hairless dogs showing clinical signs of acne. *J Invest Dermatol.* 1981. október;77(4):341–4.
86. Werner AH, Power HT. Retinoids in veterinary dermatology. *Clin Dermatol.* 1994. december;12(4):579–86.
87. Tan JKL, Bhate K. A global perspective on the epidemiology of acne. *Br J Dermatol.* 2015. július;172 Suppl 1:3–12.
88. Oge' LK, Broussard A, Marshall MD. Acne Vulgaris: Diagnosis and Treatment. *AFP.* 2019. október 15.;100(8):475–84.
89. Saitta P, Keehan P, Yousif J, Way BV, Grekin S, Brancaccio R. An update on the presence of psychiatric comorbidities in acne patients, part 1: overview of prevalence. *Cutis.* 2011. július;88(1):33–40.
90. Dréno B. Assessing quality of life in patients with acne vulgaris: implications for treatment. *Am J Clin Dermatol.* 2006;7(2):99–106.
91. Fried RG, Wechsler A. Psychological problems in the acne patient. *Dermatol Ther.* 2006. augusztus;19(4):237–40.
92. Dalgard F, Gieler U, Holm JØ, Bjertness E, Hauser S. Self-esteem and body satisfaction among late adolescents with acne: results from a population survey. *J Am Acad Dermatol.* 2008. november;59(5):746–51.
93. Niemeier V, Kupfer J, Gieler U. Acne vulgaris--psychosomatic aspects. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2006. december;4(12):1027–36.
94. Insights FB. Acne Treatment Market to Reach USD 7.19 billion by 2027; Increasing Dermatologist Consultations to Bode Well for Growth, says Fortune Business Insights™ [Internet]. GlobeNewswire News Room. 2020 [idézi 2021. november 24.]. Elérhető: <https://www.globenewswire.com/news-release/2020/08/04/2072657/0/en/Acne-Treatment-Market-to-Reach-USD-7-19-billion-by-2027-Increasing-Dermatologist-Consultations-to-Bode-Well-for-Growth-says-Fortune-Business-Insights.html>
95. Sutaria AH, Masood S, Schlessinger J. Acne Vulgaris. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [idézi 2022. január 13.]. Elérhető: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459173/>
96. Bocquet-Trémoureaux S, Corvec S, Khammari A, Dagnelie M-A, Boisrobert A, Dréno B. Acne fulminans and Cutibacterium acnes phylotypes. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020. április;34(4):827–33.
97. Dagnelie M-A, Corvec S, Saint-Jean M, Nguyen J-M, Khammari A, Dréno B. Cutibacterium acnes phylotypes diversity loss: a trigger for skin inflammatory process. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019. december;33(12):2340–8.
98. Schuetz AN. The Nesting Doll of Cutibacterium acnes Clonality. *J Clin Microbiol.* 2020. január 28.;58(2).

99. Yang J, Tsukimi T, Yoshikawa M, Suzuki K, Takeda T, Tomita M, és mtsai. Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) 16S rRNA Genotyping of Microbial Samples from Possessions Contributes to Owner Identification. *mSystems*. 2019. november 26.;4(6).
100. Ellis CN, Krach KJ. Uses and complications of isotretinoin therapy. *J Am Acad Dermatol*. 2001. november;45(5):S150-157.
101. Kutlu Ö. Effect of isotretinoin treatment on the inflammatory markers in patients with acne vulgaris: can monocyte/HDL be a new indicator for inflammatory activity of isotretinoin treatment? *Cutan Ocul Toxicol*. 2020. március;39(1):67–70.
102. Wang C, Li H, Ma P, Sun J, Li L, Wei J, és mtsai. The third-generation retinoid adapalene triggered DNA damage to induce S-phase arrest in HaCat cells. *Fundam Clin Pharmacol*. 2020. június;34(3):380–8.
103. Acne - Search results. Page 1 of about 8782 results [Internet]. *Drugs.com*. [idézi 2021. november 29.]. Elérhető: <https://www.drugs.com/search.php?searchterm=acne>
104. Mirshahpanah P, Maibach HI. Models in acnegenesis. *Cutan Ocul Toxicol*. 2007;26(3):195–202.
105. Zouboulis CC. Sebaceous cells in monolayer culture. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1992. december;28A(11–12):699.
106. Zouboulis CC, Seltmann H, Neitzel H, Orfanos CE. Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol*. 1999. december;113(6):1011–20.
107. Zouboulis CC, Schagen S, Alestas T. The sebocyte culture: a model to study the pathophysiology of the sebaceous gland in seborrhoea and acne. *Arch Dermatol Res*. 2008. szeptember;300(8):397–413.
108. Wróbel A, Seltmann H, Fimmel S, Müller-Decker K, Tsukada M, Bogdanoff B, és mtsai. Differentiation and apoptosis in human immortalized sebocytes. *J Invest Dermatol*. 2003. február;120(2):175–81.
109. Zouboulis CC, Eady A, Philpott M, Goldsmith LA, Orfanos C, Cunliffe WC, és mtsai. What is the pathogenesis of acne? *Exp Dermatol*. 2005. február;14(2):143–52.
110. Lo Celso C, Berta MA, Braun KM, Frye M, Lyle S, Zouboulis CC, és mtsai. Characterization of bipotential epidermal progenitors derived from human sebaceous gland: contrasting roles of c-Myc and beta-catenin. *Stem Cells*. 2008. május;26(5):1241–52.
111. Géczy T, Oláh A, Tóth BI, Czifra G, Szöllösi AG, Szabó T, és mtsai. Protein kinase C isoforms have differential roles in the regulation of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol*. 2012. 0;132(8):1988–97.
112. Szántó M, Oláh A, Szöllösi AG, Tóth KF, Páyer E, Czakó N, és mtsai. Activation of TRPV3 Inhibits Lipogenesis and Stimulates Production of Inflammatory Mediators in Human Sebocytes-A Putative Contributor to Dry Skin Dermatoses. *J Invest Dermatol*. 2019;139(1):250–3.

113. Tóth BI, Géczy T, Griger Z, Dózsa A, Seltsmann H, Kovács L, és mtsai. Transient receptor potential vanilloid-1 signaling as a regulator of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol.* 2009. február;129(2):329–39.
114. Oláh A, Tóth BI, Borbíró I, Sugawara K, Szöllösi AG, Czifra G, és mtsai. Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. *J Clin Invest.* 2014. szeptember;124(9):3713–24.
115. Oláh A, Markovics A, Szabó-Papp J, Szabó PT, Stott C, Zouboulis CC, és mtsai. Differential effectiveness of selected non-psychotropic phytocannabinoids on human sebocyte functions implicates their introduction in dry/seborrheic skin and acne treatment. *Exp Dermatol.* 2016;25(9):701–7.
116. Markovics A, Tóth KF, Sós KE, Magi J, Gyöngyösi A, Benyó Z, és mtsai. Nicotinic acid suppresses sebaceous lipogenesis of human sebocytes via activating hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCA2). *J Cell Mol Med.* 2019;23(9):6203–14.
117. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol.* 2018. február;66(2):190–4.
118. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg.* 2011. március;37(3):588–98.
119. Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;134:7–23.
120. Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. *Exp Eye Res.* 2020. augusztus;197:108115.
121. Fares U, Otri AM, Al-Aqaba MA, Dua HS. Correlation of central and peripheral corneal thickness in healthy corneas. *Cont Lens Anterior Eye.* 2012. február;35(1):39–45.
122. Wilson SE. Bowman's layer in the cornea- structure and function and regeneration. *Exp Eye Res.* 2020. június;195:108033.
123. Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res.* 2004. március;78(3):503–12.
124. Medeiros CS, Marino GK, Santhiago MR, Wilson SE. The Corneal Basement Membranes and Stromal Fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018. augusztus 1.;59(10):4044–53.
125. Beebe DC, Coats JM. The lens organizes the anterior segment: specification of neural crest cell differentiation in the avian eye. *Dev Biol.* 2000. április 15.;220(2):424–31.
126. Stiemke MM, Edelhauser HF, Geroski DH. The developing corneal endothelium: correlation of morphology, hydration and Na/K ATPase pump site density. *Curr Eye Res.* 1991. február;10(2):145–56.
127. Bashir H, Seykora JT, Lee V. Invisible Shield: Review of the Corneal Epithelium as a Barrier to UV Radiation, Pathogens, and Other Environmental Stimuli. *J Ophthalmic Vis Res.* 2017. szeptember;12(3):305–11.

128. Meduri A, Grenga PL, Scorolli L, Ceruti P, Ferreri G. Role of cysteine in corneal wound healing after photorefractive keratectomy. *Ophthalmic Res.* 2009;41(2):76–82.
129. Scalinci SZ, Scorolli L, Meduri A, Grenga PL, Corradetti G, Metrangolo C. Effect of basic fibroblast growth factor and cytochrome c peroxidase combination in transgenic mice corneal epithelial healing process after excimer laser photoablation. *Clin Ophthalmol.* 2011;5:215–21.
130. Meduri A, Scorolli L, Scalinci SZ, Grenga PL, Lupo S, Rechichi M, és mtsai. Effect of the combination of basic fibroblast growth factor and cysteine on corneal epithelial healing after photorefractive keratectomy in patients affected by myopia. *Indian J Ophthalmol.* 2014. április;62(4):424–8.
131. Murata Y, Masuko S. Peripheral and central distribution of TRPV1, substance P and CGRP of rat corneal neurons. *Brain Res.* 2006. április 26.;1085(1):87–94.
132. Zhang F, Yang H, Wang Z, Mergler S, Liu H, Kawakita T, és mtsai. Transient receptor potential vanilloid 1 activation induces inflammatory cytokine release in corneal epithelium through MAPK signaling. *J Cell Physiol.* 2007. december;213(3):730–9.
133. Jiao H, Ivanusic JJ, McMenamin PG, Chinnery HR. Distribution of Corneal TRPV1 and Its Association With Immune Cells During Homeostasis and Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2021. július 1.;62(9):6.
134. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, és mtsai. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron.* 1998. szeptember;21(3):531–43.
135. Sakaguchi R, Mori Y. Transient receptor potential (TRP) channels: Biosensors for redox environmental stimuli and cellular status. *Free Radic Biol Med.* 2020. január;146:36–44.
136. Okada Y, Reinach PS, Shirai K, Kitano A, Kao WW-Y, Flanders KC, és mtsai. TRPV1 involvement in inflammatory tissue fibrosis in mice. *Am J Pathol.* 2011. június;178(6):2654–64.
137. Amin MR, Ali DW. Pharmacology of Medical Cannabis. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1162:151–65.
138. Gayer H. Pharmakologische Wertbestimmung von orientalischem Haschisch und Herba cannabis indicae. *Archiv f experiment Pathol u Pharmakol.* 1928. szeptember 1.;129(5):312–8.
139. Carlini EA, Santos M, Claussen U, Bieniek D, Korte F. Structure activity relationship of four tetrahydrocannabinols and the pharmacological activity of five semi-purified extracts of Cannabis sativa. *Psychopharmacologia.* 1970. augusztus 19.;18(1):82–93.
140. Carlini EA, Karniol IG, Renault PF, Schuster CR. Effects of marihuana in laboratory animals and in man. *Br J Pharmacol.* 1974. február;50(2):299–309.
141. Yang H, Wang Z, Capó-Aponte JE, Zhang F, Pan Z, Reinach PS. Epidermal growth factor receptor transactivation by the cannabinoid receptor (CB1) and transient receptor

- potential vanilloid 1 (TRPV1) induces differential responses in corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2010. szeptember;91(3):462–71.
142. Tóth BI, Dobrosi N, Dajnoki A, Czifra G, Oláh A, Szöllosi AG, és mtsai. 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.* 2011. május;131(5):1095–104.
 143. Chen J, Matias I, Dinh T, Lu T, Venezia S, Nieves A, és mtsai. Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005. május 20.;330(4):1062–7.
 144. Kennedy M, Kim KH, Harten B, Brown J, Planck S, Meshul C, és mtsai. Ultraviolet irradiation induces the production of multiple cytokines by human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997. november;38(12):2483–91.
 145. Delic NC, Lyons JG, Di Girolamo N, Halliday GM. Damaging Effects of Ultraviolet Radiation on the Cornea. *Photochem Photobiol.* 2017. július;93(4):920–9.
 146. Kumar A, Zhang J, Yu F-SX. Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C)-induced antiviral response in human corneal epithelial cells. *Immunology.* 2006. január;117(1):11–21.
 147. Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, és mtsai. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995. március;36(3):614–21.
 148. Normal Human Corneal Epithelial Cells [Internet]. MatTek Life Sciences. 2016 [idézi 2022. január 14.]. Elérhető: <https://www.mattek.com/products/human-corneal-epithelial-cells/>
 149. Qi X, Li T-G, Hao J, Hu J, Wang J, Simmons H, és mtsai. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004. április 20.;101(16):6027–32.
 150. De SK, Stebbins JL, Chen L-H, Riel-Mehan M, Machleidt T, Dahl R, és mtsai. Design, synthesis, and structure-activity relationship of substrate competitive, selective, and in vivo active triazole and thiadiazole inhibitors of the c-Jun N-terminal kinase. *J Med Chem.* 2009. április 9.;52(7):1943–52.
 151. Heerding DA, Rhodes N, Leber JD, Clark TJ, Keenan RM, Lafrance LV, és mtsai. Identification of 4-(2-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-ethyl-7-((3S)-3-piperidinylmethyl)oxy)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-4-yl)-2-methyl-3-butyn-2-ol (GSK690693), a novel inhibitor of AKT kinase. *J Med Chem.* 2008. szeptember 25.;51(18):5663–79.
 152. Xie F, Li BX, Kassenbrock A, Xue C, Wang X, Qian DZ, és mtsai. Identification of a Potent Inhibitor of CREB-Mediated Gene Transcription with Efficacious in Vivo Anticancer Activity. *J Med Chem.* 2015. június 25.;58(12):5075–87.
 153. Müller MQ, de Koning LJ, Schmidt A, Ihling C, Syha Y, Rau O, és mtsai. An innovative method to study target protein-drug interactions by mass spectrometry. *J Med Chem.* 2009. május 14.;52(9):2875–9.

154. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998. augusztus 28.;281(5381):1309–12.
155. Mihály J, Angyal Á, Bánhalminé Szilágyi S, Tubak V, Soeberdt M, Abels C, és mtsai. 303 Establishment and optimization of pro-inflammatory model systems in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2016. szeptember 1.;136(9, Supplement 2):S212.
156. Dobrosi N, Tóth BI, Nagy G, Dózsa A, Géczy T, Nagy L, és mtsai. Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J*. 2008. október;22(10):3685–95.
157. Makrantonaki E, Zouboulis CC. Testosterone metabolism to 5 α -dihydrotestosterone and synthesis of sebaceous lipids is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor ligand linoleic acid in human sebocytes. *Br J Dermatol*. 2007. március;156(3):428–32.
158. Zouboulis CC, Katsambas AD, Kligman AM. *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Springer; 2014. 729 o.
159. Alexander SPH, Battey J, Benson HE, Benya RV, Bonner TI, Davenport AP, és mtsai. Class A Orphans (version 2020.5) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. GtoPdb CITE [Internet]. 2020. november 12. [idézi 2022. január 13.];2020(5). Elérhető: <http://journals.ed.ac.uk/gtopdb-cite/article/view/5179>
160. Alexander SP, Christopoulos A, Davenport AP, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, és mtsai. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol*. 2017. december;174(Suppl Suppl 1):S17–129.
161. Kwon HC, Kim TY, Lee CM, Lee KS, Lee KK. Active compound chrysophanol of *Cassia tora* seeds suppresses heat-induced lipogenesis via inactivation of JNK/p38 MAPK signaling in human sebocytes. *Lipids Health Dis*. 2019. június 7.;18(1):135.
162. Choi JJ, Park MY, Lee HJ, Yoon D-Y, Lim Y, Hyun JW, és mtsai. TNF- α increases lipogenesis via JNK and PI3K/Akt pathways in SZ95 human sebocytes. *J Dermatol Sci*. 2012. március;65(3):179–88.
163. Smith TM, Gilliland K, Clawson GA, Thiboutot D. IGF-1 induces SREBP-1 expression and lipogenesis in SEB-1 sebocytes via activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Invest Dermatol*. 2008. május;128(5):1286–93.
164. Murataeva N, Miller S, Dhopeswarkar A, Leishman E, Daily L, Taylor X, és mtsai. Cannabinoid CB2R receptors are upregulated with corneal injury and regulate the course of corneal wound healing. *Exp Eye Res*. 2019. május;182:74–84.
165. Töröcsik D, Kovács D, Camera E, Lovászi M, Cseri K, Nagy GG, és mtsai. Leptin promotes a proinflammatory lipid profile and induces inflammatory pathways in human SZ95 sebocytes. *Br J Dermatol*. 2014. 0;171(6):1326–35.
166. Legrand JMD, Roy E, Ellis JJ, Francois M, Brooks AJ, Khosrotehrani K. STAT5 Activation in the Dermal Papilla Is Important for Hair Follicle Growth Phase Induction. *J Invest Dermatol*. 2016;136(9):1781–91.

167. Calebiro D, Maiellaro I. cAMP signaling microdomains and their observation by optical methods. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:350.
168. Du K, Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem.* 1998. 0;273(49):32377–9.
169. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther.* 2015. április;148:114–31.
170. Patel P, Woodgett JR. Glycogen Synthase Kinase 3: A Kinase for All Pathways? *Curr Top Dev Biol.* 2017;123:277–302.
171. Souder DC, Anderson RM. An expanding GSK3 network: implications for aging research. *Geroscience.* 2019;41(4):369–82.
172. Abdullah N, Beg M, Soares D, Dittman JS, McGraw TE. Downregulation of a GPCR by β -Arrestin2-Mediated Switch from an Endosomal to a TGN Recycling Pathway. *Cell Rep.* 2016. 13;17(11):2966–78.
173. Billington CK, Penn RB. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res.* 2003;4:2.
174. Geppetti P, Veldhuis NA, Lieu T, Bunnett NW. G Protein-Coupled Receptors: Dynamic Machines for Signaling Pain and Itch. *Neuron.* 2015. 0;88(4):635–49.
175. Skieterska K, Rondou P, Van Craenenbroeck K. Regulation of G Protein-Coupled Receptors by Ubiquitination. *Int J Mol Sci.* 2017. április 27.;18(5).
176. Bachkangi P, Taylor AH, Bari M, Maccarrone M, Konje JC. Prediction of preterm labour from a single blood test: The role of the endocannabinoid system in predicting preterm birth in high-risk women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2019. 0;243:1–6.
177. Igarashi M, Watanabe K, Tsuduki T, Kimura I, Kubota N. NAPE-PLD controls OEA synthesis and fat absorption by regulating lipoprotein synthesis in an in vitro model of intestinal epithelial cells. *FASEB J.* 2019;33(3):3167–79.
178. Miller S, Hu SS-J, Leishman E, Morgan D, Wager-Miller J, Mackie K, és mtsai. A GPR119 Signaling System in the Murine Eye Regulates Intraocular Pressure in a Sex-Dependent Manner. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017. 01;58(7):2930–8.
179. Qazi Y, Wong G, Monson B, Stringham J, Ambati BK. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. *Brain Res Bull.* 2010. február 15.;81(2–3):198–210.
180. Pearlman E, Sun Y, Roy S, Karmakar M, Hise AG, Szcotka-Flynn L, és mtsai. Host Defense at the Ocular Surface. *Int Rev Immunol.* 2013. február;32(1):4–18.
181. Royer DJ, Elliott MH, Le YZ, Carr DJJ. Corneal Epithelial Cells Exhibit Myeloid Characteristics and Present Antigen via MHC Class II. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018. március;59(3):1512–22.
182. Matias I, Wang JW, Moriello AS, Nieves A, Woodward DF, Di Marzo V. Changes in endocannabinoid and palmitoylethanolamide levels in eye tissues of patients with diabetic

- retinopathy and age-related macular degeneration. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006. december;75(6):413–8.
183. Thapa D, Cairns EA, Szczesniak A-M, Kulkarni PM, Straiker AJ, Thakur GA, és mtsai. Allosteric Cannabinoid Receptor 1 (CB1) Ligands Reduce Ocular Pain and Inflammation. *Molecules*. 2020. január 20.;25(2):E417.
184. Blair NT, Carvacho I, Chaudhuri D, Clapham DE, DeCaen P, Delling M, és mtsai. Transient Receptor Potential channels (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *GtoPdb CITE* [Internet]. 2019. szeptember 16. [idézi 2022. január 14.];2019(4). Elérhető: <http://journals.ed.ac.uk/gtopdb-cite/article/view/3230>
185. Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson N-O, Leonova J, és mtsai. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 2007. december;152(7):1092–101.
186. McHugh D, Page J, Dunn E, Bradshaw HB. $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol and N-arachidonyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells. *Br J Pharmacol*. 2012. április;165(8):2414–24.
187. Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P. Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J*. 2001. december 17.;20(24):7033–40.
188. Maingret F, Patel AJ, Lazdunski M, Honoré E. The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1. *EMBO J*. 2001. január 15.;20(1–2):47–54.
189. De Petrocellis L, Starowicz K, Moriello AS, Vivese M, Orlando P, Di Marzo V. Regulation of transient receptor potential channels of melastatin type 8 (TRPM8): effect of cAMP, cannabinoid CB(1) receptors and endovanilloids. *Exp Cell Res*. 2007. május 15.;313(9):1911–20.
190. Poling JS, Rogawski MA, Salem N, Vicini S. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits Shaker-related voltage-gated K⁺ channels. *Neuropharmacology*. 1996;35(7):983–91.
191. Caldwell MD, Hu SS-J, Viswanathan S, Bradshaw H, Kelly MEM, Straiker A. A GPR18-based signalling system regulates IOP in murine eye. *Br J Pharmacol*. 2013. június;169(4):834–43.
192. Murataeva N, Daily L, Taylor X, Dhopeswarkar A, Hu SS-J, Miller S, és mtsai. Evidence for a GPR18 Role in Chemotaxis, Proliferation, and the Course of Wound Closure in the Cornea. *Cornea*. 2019. július;38(7):905–13.
193. Sánchez-Taberner S, Fajardo-Sanchez J, Weston-Davies W, Parekh M, Kríman J, Kaye S, és mtsai. Dual inhibition of complement component 5 and leukotriene B4 by topical rVA576 in atopic keratoconjunctivitis: TRACKER phase 1 clinical trial results. *Orphanet J Rare Dis*. 2021. június 11.;16(1):270.
194. Eskandarpour M, Chen Y-H, Nunn MA, Coupland SE, Weston-Davies W, Calder VL. Leukotriene B4 and Its Receptor in Experimental Autoimmune Uveitis and in Human

Retinal Tissues: Clinical Severity and LTB₄ Dependence of Retinal Th17 Cells. *Am J Pathol.* 2021. február;191(2):320–34.

195. Thakur A, Willcox MD. Cytokine and lipid inflammatory mediator profile of human tears during contact lens associated inflammatory diseases. *Exp Eye Res.* 1998. július;67(1):9–19.

10. Kulcsszavak

Akne, bőr, OEA, endokannabinoid rendszer, faggyúmirigy, faggyútermelés, GPR119, STAT, PPAR α , sebocita, gyulladás, anandamid, TLR3, kornea.

11. Key words

Acne, skin, OEA, endocannabinoid system, sebaceous gland, sebum production, GPR119, STAT, PPAR α , sebocyte, inflammation, anandamide, TLR3, cornea.

11. Köszönetnyilvánítás

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

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

Köszönet illeti a labor és az intézet korábbi és jelenlegi dolgozóit, PhD és TDK hallgatóit, akik ha szükséges volt, mindig önzetlenül siettek a segítségemre. Közöttük is különösen közvetlen munkatársaim, Dr. Mihály Johanna, Dr. Tóth István Balázs, Dr. Szöllősi Attila Gábor, Dr. Czifra Gabriella, Ádám Dorottya, Dr. Shahrzad Alimohammadi, Dr. Ambrus Lídia, Balogh Norbert, Dr. Kelemen Balázs, Dr. Lisztes Erika, Dr. Markovics Arnold, Tóth Kinga Fanni, Dr. Szabó Imre Lőrinc, Dr. Vasas Nikolett, Vladár Anita, Dr. Zákány Nóra, Bánhalminé Szilágyi Szilvia, Fricz Nikolett, Furin Lilla, Galicz Anita, Hollósi Erika, Szabó-Papp Judit, Uzonyi Renáta, Kovács Gergő, Dr. Budai Marietta Margit, Dr. Takács Erika és Péntes Zsófia segítségéért vagyok rendkívül hálás.

Köszönöm kollaborációs partnereink (Prof. Dr. Christos C. Zouboulis, Dr. Pór Ágnes, Dr. Vereb György, Dr. Zsebik Barbara és még sokan mások) felbecsülhetetlen értékű segítségét.

Végezetül ebben a pár sorban szeretnék mindent megköszönni családomnak, hiszen nélkülük nem jutottam volna el eddig, nagyon hálás vagyok nekik. Külön szeretném megköszönni Balogh Norbertnek a PhD évek alatt született barátságot és a „ha már ennyi évet belefecöltél, csináld végig” támogatását.

A kutatás az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, az NKFIH 120552, 121360, 125055, 125053, 128034, 135938, 134235, 134993, 134725, 134791, valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 és a GINOP-2.3.3-15-2016-00020 jelű projektek támogatásával valósult meg.

12. Függelék – Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/49/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Angyal Ágnes
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Angyal, Á.**, Péntes, Z., Alimohammadi, S., Horváth, D., Takács, L., Vereb, G., Zsebik, B., Bíró, T., Tóth, K. F., Lisztes, E., Tóth, I. B., Oláh, A., Szöllősi, A. G.: Anandamide Concentration-Dependently Modulates Toll-Like Receptor 3 Agonism or UVB-Induced Inflammatory Response of Human Corneal Epithelial Cells.
Int. J. Mol. Sci. 22 (15), 7776, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22157776>
IF: 5.923 (2020)
2. Markovics, A.*, **Angyal, Á.***, Tóth, K. F., Ádám, D., Péntes, Z., Magi, J., Pór, Á., Kovács, I., Töröcsik, D., Zouboulis, C. C., Bíró, T., Oláh, A.: GPR119 is a potent regulator of human sebocyte biology.
J. Invest. Dermatol. 140 (10), 1909-1918, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.02.011>
* These authors contributed equally this work.
IF: 8.551

További közlemények

3. Singlár, Z., Szentesi, P., Fodor, J., **Angyal, Á.**, Csernoch, L., Sztretye, M.: Assessing the Potential of Nutraceuticals as Geroprotectors on Muscle Performance and Cognition in Aging Mice.
Antioxidants. 10 (9), 1415, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox10091415>
IF: 6.312 (2020)
4. Sztretye, M., Singlár, Z., Szabó, L., **Angyal, Á.**, Balogh, N., Vakilzadeh, F., Szentesi, P., Dienes, B., Csernoch, L.: Improved Tetanic Force and Mitochondrial Calcium Homeostasis by Astaxanthin Treatment in Mouse Skeletal Muscle.
Antioxidants. 9 (2), 98, 2020.
IF: 6.312





5. Sztretye, M., Singlár, Z., Balogh, N., Kis, G., Szentesi, P., **Angyal, Á.**, Balatoni, I., Csernoch, L., Dienes, B.: The Role of Orai1 in Regulating Sarcoplasmic Calcium Release, Mitochondrial Morphology and Function in Myostatin Deficient Skeletal Muscle.
Front. Physiol. 11, 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.601090>
IF: 4.566
6. Szöllösi, A. G., Molnárné Vasas, N., **Angyal, Á.**, Kistamás, K., Nánási, P. P., Mihály, J., Béke, G., Lisztes, E., Szegedi, A., Kawada, N., Yanagida, T., Mori, T., Kemény, L., Bíró, T.: Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes.
J. Invest. Dermatol. 138 (2), 365-374, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2017.07.852>
IF: 6.29

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 37,954

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
14,474**

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, 2022.01.20.

