

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Jenei Adrienn

**Az egészséges és a gyulladós bőr
immunológiai státuszának vizsgálata**

Témavezető: Dr. Kapitány Anikó



**DEBRECENI EGYETEM
PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS
ALLERGOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

AZ ÉRTEKEZÉSBEN ELŐFORDULÓ RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
1. A bőr felépítése	7
1.1 Az epidermisz	7
1.1.1. A stratum corneum.....	7
1.2. A bőr mirigyei.....	9
1.2.1 Az apokrin verejtékmirigy.....	9
1.2.2. Az ekkrin verejtékmirigy.....	10
1.2.3. A faggyúmirigy.....	10
2. A bőr különböző régiói	11
3. A bőr immunrendszere	12
3.1. A dendritikus sejtek	13
3.1.1. Langerhans sejtek.....	14
3.1.2. Dermális dendritikus sejtek.....	14
3.2. A T-sejtek.....	15
3.2.1. A Th1 sejtek.....	16
3.2.2. A Th2 sejtek.....	16
3.2.3. A Th17 sejtek.....	16
3.2.4. A Th22 sejtek.....	17
3.2.5. A Th9 sejtek.....	17
3.2.6. A Foxp3 ⁺ regulatórikus T-sejtek	17
3.3. A keratinociták.....	18
3.4. A bőr immunrendszer mediátorai	18
3.4.1. A citokinek	18
3.4.2. A kemokinek.....	19
3.5. Az antimikrobiális peptidek	20
4. Hidradenitisz szuppurativa	21
4.1. A hidradenitisz szuppurativa pathomechanizmusa	23
CÉLKITŰZÉS.....	26
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	27
1. Mintagyűjtés.....	27
1.1. Bőrbiopsziás minták gyűjtése	27
1.2. A stratum corneum minta gyűjtése	29
2. RNS izolálás bőrbiopsziás mintákból, Reverz Transzkripció és RT-qPCR.....	30
3. A teljes bőrmetszetek rutin festése és immunohisztokémiai jelölése.....	31
3.1. May-Grünwald-Giemsa és a hematoxilin-eozin (H&E) festés.....	31
3.2. Immunohisztokémiai jelölés	31
4. A stratum corneum eltávolítása a bőrfelszínéről.....	33
5. A stratum corneum fehérjetartalmának elúciója a D-Squame korongokról.....	33
6. A stratum corneum fehérjekoncentrációjának meghatározása	34
7. A stratum corneum fehérjetartalmának proteolitikus emésztése.....	34

8. A PRM assay tervezés.....	35
9. Tömegspektrometriás vizsgálat.....	35
10. Az adatok kiértékelése, statisztikai analízise	36
EREDMÉNYEK	37
1. Az egészséges nedves bőr immunkörnyezete és annak megváltozása hidradenitisz szuppuratívában.....	37
1.1. Immunsejtek vizsgálata nedves bőrben és hidradenitisz szuppuratívában	37
1.2. A T-sejt altípusokhoz köthető komponensek.....	39
1.3. A Th17 sejtekhez köthető komponensek	42
2. Egészséges bőrrégiók stratum corneumának vizsgálata tömegspektrometriás módszerrel .	45
2.1. Az AMP tartalom vizsgálatához szükséges módszer optimalizálása.....	45
2.1.1 A mintagyűjtés optimalizálása.....	46
2.1.2. A PRM alapú tömegspektrometriás módszer tervezése és optimalizálása.....	47
2.1.3. A fehérje elúció optimalizálása	50
2.2. Különböző egészséges bőrrégiók antimikrobiális peptid mennyiségének összehasonlító vizsgálata	51
MEGBESZÉLÉS.....	55
1. Az egészséges és a gyulladt teljes bőr különbségei	55
2. Az egészséges bőr stratum corneumának antimikrobiális peptidösszetételének különbségei száraz, nedves és zsíros bőrrégióban.....	57
ÖSSZEFOGLALÁS.....	60
SUMMARY	61
IRODALOMJEGYZÉK.....	62
TÁRGYSZAVAK.....	76
KEY WORDS	77
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	78
FÜGGELÉK.....	79
PUBLIKÁCIÓS LISTA	82
FÜGGELÉK – SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	85

Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke

AD	atopic dermatitis	atópiás dermatitisz
AGR	apocrine gland rich	apokrin mirigyben gazdag
AHR	aryl hydrocarbon receptor	aril-hidrokarbon receptor
AMP	antimicrobial peptide	antimikrobiális peptid
BSA	bovine serum albumin	borjú szérum albumin
CCL	chemokine ligand	kemokin ligand
CCR	CC chemokine receptor	CC kemokin receptor
cDNS	complementary DNA	komplementer DNS
CLDN	claudin	klaudin
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand	kemokin (C-X-C motívum) ligand
CXCR	C-X-C chemokine receptor	C-X-C kemokin receptor
DC	dendritic cell	dendritikus sejt
DCD	dermcidin	dermcidin
dDC	dermal dendritic cell	dermális dendritikus sejt
DLQI	dermatology life quality index	bőrgyógyászati életminőség index
FC	fold change	x-szeres változás
FLG	filaggrin	filaggrin
Foxp	forkhead box protein	forkhead boks fehérje
GP	gland poor	mirigyekben szegény
hBD (DEFB)	human beta-defensin (DEFB)	humán béta-defenzin (DEFB)
HS	hidradenitis suppurativa	hidradenitisz szuppurativa
IDC	inflammatory dendritic cell	inflammatorikus dendritikus sejt
IDEC	inflammatory dendritic epidermal cell	inflammatorikus dendritikus epidermális sejt
IFN	interferon	interferon
Ig	immunoglobulin	immunglobulin
IHC	immunohistochemistry	immunhisztokémia
IL	interleukin	interleukin
KC	keratinocyte	keratinocita
KRT	keratin	keratin
LACRT	lacritin	lakritin
LC	langerhans cell	langerhans sejt
LCN (NGAL)	lipocalin	lipokalin
LL-37	cathelicidin	kathelicidin
LOR	loricrin	lorikrin
LYZ	lysozyme	lizozim
MHC	major histocompatibility complex	fő hisztokompatibilitási komplex
MMP	matrix metalloproteinase	mátrix metalloproteáz
mTOR	mammalian target of rapamycin	rapamicin emlős célpontja
NKT	natural killer T-cell	természetes ölő T-sejt

NLRP	nod-like receptor protein	nod-szerű receptor protein
nr	nonrelevant	nem releváns
PAMP	pathogen-associated molecular pattern	patogén-asszociált molekuláris mintázat
pDC	plasmacytoid dendritic cell	plazmacitoid dendritikus sejt
PPR	papulopustular rosacea	rozácea
PRM MS	Parallel Reaction Monitoring-Mass Spectrometry	célzott parallel tömegspektrometria
Ps	psoriasis vulgaris	pszoriázis
pTreg	peripheral regulatory T-cell	perifériális regulatórikus T-sejt
RT-PCR	real time polymerase chain reaction	valós-idejű polimeráz
S100A	S100 calcium-binding protein A	S100 kalcium kötő fehérje A
SC	stratum corneum	stratum corneum
SDS	sodium dodecyl sulphate	nátrium-dodecil-szulfát
SGR	sebaceous gland rich	faggyúmirigyben gazdag
SIL	stable isotope labelled	stabil izotóppal jelölt
STAT	signal transducer and activator of transcription	transzkripció jelátvivője és aktivátora
T-bet	T-box expressed in T-cell	T boksztot expresszáló T-sejt
TBST	tris buffered saline and Tween 20	trissel pufferelt sóoldat és Tween 20
Th	helper T- cell	segítő T-sejt
TIP-DC	TNF and iNOS producing DC	TNF-et és iNOS-t termelő dendritikus sejt
TJ	tight junction	szoros illeszkedés
TLR	toll-like receptor	toll-szerű receptor
T_{RM}	tissue-resident memory T-cell	Szöveti rezidens memória T-sejt
TSLP	thymic stromal lymphopietin	thymic stromal lymphopietin
tTreg	thymic T-regulatory cell	timusz eredetű regulatórikus T-sejt
UV-VIS	ultraviolet-visible	látható ultraibolya

Bevezetés

A bőr az emberi szervezet első védelmi vonala, véd a külső környezet fizikai, kémiai és mikrobiológiai hatásaival szemben. Az egészséges bőr topográfiaileg eltérő bőrrégiói különböző anatómiai és fizikokémiai sajátosságokkal rendelkeznek, ami alapján 3 bőrrégiót különböztetünk meg: a faggyúmirigyekben gazdag, zsíros (sebaceous gland rich, SGR), az apokrin mirigyekben gazdag, nedves (apocrine gland rich, AGR) valamint a mirigyekben szegény, száraz (sebaceous and apocrine gland poor, GP) bőrrégiókat.

Korábbi kutatások kimutatták, hogy az egészséges bőr topográfiaileg eltérő régiói különböző mikrobióta összetétellel rendelkeznek valamint kutatócsoportunk igazolta, hogy az SGR bőrterület immunológiai tulajdonságaiban különbséget mutat a GP bőrterülethez képest [1]–[4]. Azt azonban eddig még nem vizsgálták, hogy az AGR bőrterületek is sajátos immunmilióval rendelkeznek-e.

A hidradenitisz szuppurativa (HS) egy AGR bőrterületekre lokalizálódó gyulladós bőrbetegség. A pathomechanizmusát vizsgáló korábbi tanulmányokban az immunológiai homeosztázis eltolódásának mértékét a GP bőrrégióhoz hasonlították, ami pontatlan eredményekhez vezetett a gyulladás kialakulásának megismerésével kapcsolatban. Továbbá korábban nem vizsgálták még, hogy az AGR bőrre jellemző sajátos immunmilió hogyan változik meg az ezekre a területekre lokalizálódó HS kialakulása során.

A bőr antimikrobiális peptid (AMP) profiljának vizsgálata diagnosztikai és prediktív jelentőséggel bír. Az AMP-k, mint markerek információt adhatnak a bőrbetegségek kialakulásáról, állapotáról és súlyosságáról. Munkacsoportunk korábbi mRNS és fehérje alapú vizsgálatait során szignifikáns különbséget azonosított bizonyos AMP-k tekintetében a GP, SGR és AGR bőrrégiókat összehasonlítva [1][2][5].

Jelenlegi ismereteink szerint kevés olyan vizsgálati módszer van, mely alkalmas a bőrminták gyors, minimális invazivitással járó és így ismételhető gyűjtésére. Jelenleg az AMP-eket antigén-antitest alapú ELISA és immunohisztokémiai módszerrel (IHC) azonosítják invazív eljárással nyert bőrbioptiás mintákban [6]–[8]. Mivel a biopszia fájdalommal és heggedéssel járó folyamat, ezért nem alkalmas a mintavétel ismétlésére ugyanarról a bőrterületről. Egy minimálisan invazív mintavételi eljárás gyors és megbízható analitikai módszerrel kombinálva lehetőséget teremthet a bőr immunstátusz-változásának nyomon követésére mind az egészséges, mind a klinikai tünetet nem mutató gyulladásban lévő bőr és a már manifestálódott

betegségek esetén is, emellett elősegítheti profilaktikus terápiák kidolgozását és alkalmazását, valamint a kezelések hatékonyságának nyomon követését.

PhD munkám során az egészséges nedves bőr és HS-s léziós bőr immunológiai sajátosságait, valamint a stratum corneum (SC) immunológiai státuszának meghatározására alkalmas diagnosztikai és prediktív markerek új, nem invazív kimutatási lehetőségét vizsgáltam.

Irodalmi áttekintés

1. A bőr felépítése

Az emberi szervezet legnagyobb szerve a bőr, mely fizikai, kémiai és mikrobiológiai barrierként védelmet biztosít a külső környezeti tényezőkkel szemben, de egyben össze is köti a szervezetet környezetével. Három réteg alkotja: az epidermisz, a dermisz és a hipodermisz. Az epidermális eredetű függelékek közé tartozik többek között a faggyúmirigy és a verejtékmirigy, melynek két fő típusát, az ekkrin és az apokrin mirigyeket különböztetjük meg anatómia elhelyezkedésük, struktúrájuk, funkciójuk és szekrétumuk alapján.

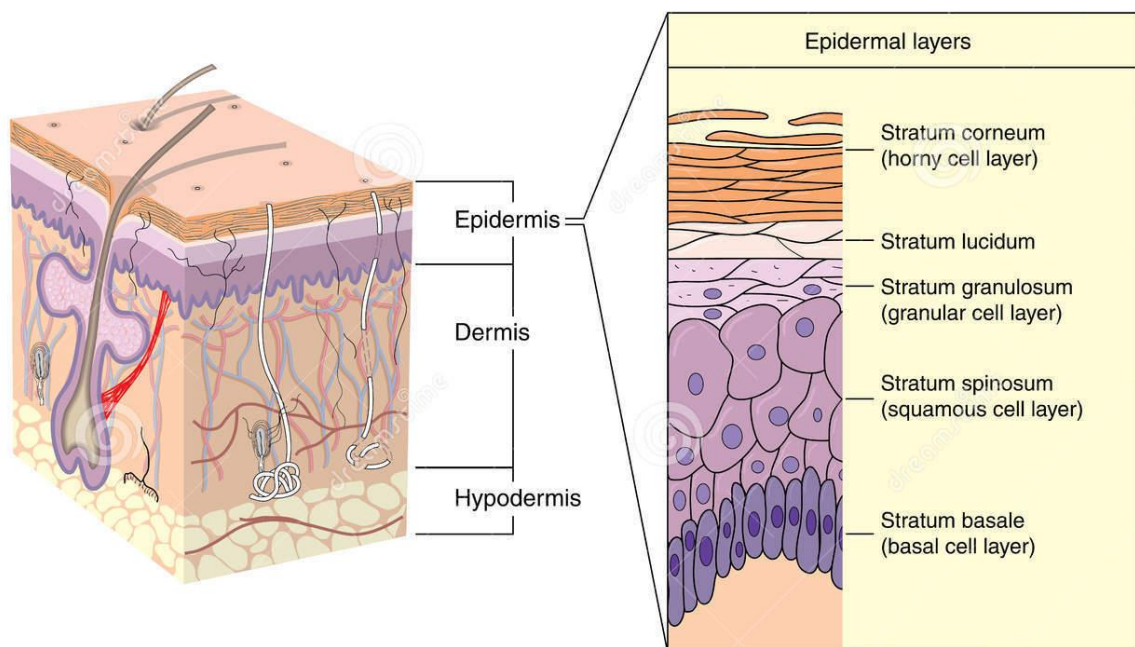
1.1 Az epidermisz

Az epidermisz öt rétegből épül fel (**1. ábra**). A legalsó rétege, a *stratum basale* egyetlen sejtsorból áll. Differenciálatlan sejtjei mitotikus osztódással hozzák létre az epidermisz fő tömegét adó keratinocitákat (KC). A *stratum spinosumot* néhány sejtsor KC alkotja, ahol a poligonális sejtek között dezmoszómák biztosítják az összeköttetést. Az itt található sejtek keratint termelnek. A *stratum granulosum* az epidermisz harmadik, még nem keratinizálódó rétege, mely 1-3 sejtsorból áll. A sejtek keratohialin szemcséket tartalmaznak a filaggrin (FLG) fehérje előanyagaival. Ez a fehérje aggregálódva keratinfilamentumokat alkot, melyek más struktúrfehérjékkel együtt kitöltik az epidermisz legfelső rétegének, a SC elszarusodott sejtjeit. Az epidermisz *stratum lucidum* rétege csak a tenyér és a talp erősen elszarusodott hámrétegében található meg. Általában 3-5 elhalt sejtsorból épül fel. Az epidermisz legfelső rétege a *stratum corneum*.

1.1.1. A stratum corneum

A SC elsődlegesen barrier funkciót lát el. Sejtjei a korneociták, melyek KC eredetű elhalt, mag nélküli, lapos, citoplazmatikus sejtorganellumokkal nem rendelkező sejtek keratinfilamentumokkal kitöltve. A mélyebb rétegekben elhelyezkedő sejtek plazmamembránját extracelluláris lipidréteg borítja, mely a szervezet vízháztartásának egyensúlyát hivatott megtartani.

A SC vastagsága széles spektrum között változik a test különböző területén a külső mechanikai hatások mértékétől függően, de a területileg jellemző vastagsága állandó. Ezt az állandóságot a stratum granulosum irányából történő folyamatos sejtutánpótlás és a SC külső rétegének folyamatos hámlása közötti egyensúly biztosítja. A dinamikus egyensúlyi állapotot a korneociták közötti kohéziós erő mértéke határozza meg, amit három folyamat összehangolt szabályozása tart fent. A kohéziós erő az enzimatikus folyamatok, a sejtek közötti dezmoszómális összeköttetés, valamint a sejtek plazmamembránját borító lipidréteg eredménye [9]. A bőrfelszín felső rétegei felé haladva a korneociták dezmoszómális összeköttetései szétesnek, a lipidréteg összetétele megváltozik és aktiválódnak a kohéziót fenntartó enzimatikus folyamatokat gátló enzimek. Ennek következtében a SC legfelső rétegében a korneociták közötti kohéziós erő gyengül, majd bekövetkezik a hámlás.



1. ábra Az emberi bőr rétegei. (Forrás: Y. Hu, C. Converse, M.C. Lyons and W.H. Hsu: Neural control of sweat secretion: a review*. British Journal of Dermatology (2018) 178, pp1246–1256. [10])

A SC legfelső rétegében a sejtek között kohéziós erő csökkenése lehetővé teszi néhány sejtsor könnyű, fájdalommentes eltávolítását a bőrgyógyászati célokra kifejlesztett ragasztókorong (D-Sqame korong) segítségével (**2. ábra**). A korneociták mellett eltávolíthatók a bőrfelszín mikroflórája, a verejték- és a faggyúmirigyek által termelt és a kivezető csatornákon keresztül a bőrfelszínre szekretált, valamint a sejtközötti állományban elhelyezkedő peptidek.



2. ábra A SC eltávolítására alkalmas D-Squame korong.

1.2. A bőr mirigyei

A bőr számos exokrin mirigyet tartalmaz, melyek szekrétaik közvetlen vagy közvetett úton a bőr felszínére kerülnek. A mirigyek szekretoros részből és kivezető csőből épülnek fel. Sejtjeik epidermisz eredetűek, de a szekretoros rész gyakran a dermisz mélyebb rétegeiben helyezkedik el (3. ábra).

A mirigyeknek három fő típusát különböztetjük meg a szekrétaik, a váladéktermelésük funkciója és a szekréta ürítésének helye szerint: 1) apokrin verejtékmirigy, 2) ekkryn verejtékmirigy és 3) faggyúmirigy.

1.2.1 Az apokrin verejtékmirigy

Az apokrin verejtékmirigy egy felesavarodott csöves mirigy kivezető csöve gyakran elágazik, de szekréta mindig a szőrtüszőbe, a faggyúmirigyek beszájadzása felett ürül. Váladéka a szőrtüsző kivezető csatornáján keresztül kerül a bőr felszínére. Az epidermális eredetű mirigy szekretoros része általában a dermiszben, ritkán a hipodermisz felső szakaszában helyezkedik el (3. ábra).

A pubertás korban működésnek induló mirigy váladéka fehérjéket, szénhidrátokat, lipideket és ammóniát tartalmaz. Összetétele a mirigy elhelyezkedésétől, életszakasztól függően változik. Szekréta mindig a faggyúmirigy szebumával keveredve ürül a szőrtüsző kivezető

csatornáján keresztül a bőr felszínére. Ellentétben a folyamatosan verejtéket termelő ekkrin miriggyel, működése periodikus [11].

1.2.2. Az ekkrin verejtékmirigy

Az ekkrin verejtékmirigy az ajkak és a külső nemi szervek kivételével a teljes testfelületen megtalálható a bőrben. A mirigy egyszerű, vakon végződő csavaros csöve epidermális eredetű, ami általában a dermiszben, néha a hipodermisz felső részében helyezkedik el. A szőrtüszővel nem kapcsolódó kivezető csöve minden esetben közvetlenül az epidermisz felszínén végződik [11] (**3. ábra**).

Az ekkrin mirigy a bőrfelszínre szekretált verejtékének párolgása miatt fontos szerepet játszik a szervezet hőszabályozásában. A bőr felszínére ürülő és ott egy vékony filmréteget létrehozó szekrétum a mirigy szekretoros részében a vér ultrafiltrátumához hasonló összetételű. A kivezetőcsőben a víz és a nátrium jelentős része visszaszívódik, így a bőrfelszínre ürülő verejték hipotóniás, amely alacsony fehérjetartalmú és leginkább AMP-eket tartalmaz (dermcidin (DCD), kathelicidin (LL-37), laktoferrin). Az AMP-k jelentik a szervezet első védelmi vonalát a kórokozókkal szemben [12]–[15].

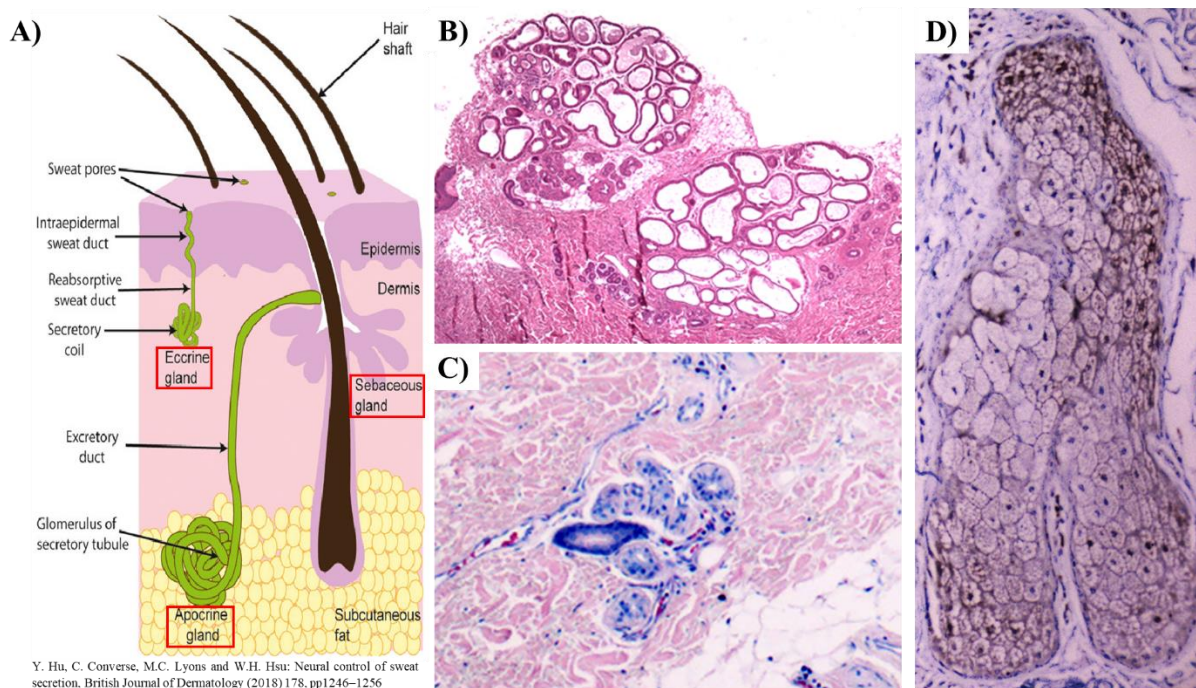
1.2.3. A faggyúmirigy

Az exokrin faggyúmirigy a szőrtüszők kivezetőcsövébe szájadzó mirigy. Egy szőrtüszőhöz több faggyúmirigy is tartozhat. Szekrétuma a holokrin szekréción mechanizmussal termelődő faggyú (szebum), mely a szőrszálak és a bőr felszínének védelmét biztosítja (**3. ábra**).

A faggyúmirigyeknek fontos szerepük van a szervezet vízháztartásának fenntartásában és a mikroorganizmusokkal szembeni védelmében. A szebum gyengén savas kémhatása megakadályozza a patogén mikrobák bőrfelszínen való megtelepedését, bejutását a szervezetbe. Neutralizálják a bőrre kerülő lúgos szennyeződések, ezzel segítenek fenntartani a bőr barrier integritását.

A faggyúmirigy működése és mérete androgén hormonok szabályozása alatt áll. Az androgén hormonok termelésének pubertáskori kezdetével a faggyúmirigy mérete eléri végleges nagyságát és megkezdzi a szebum termelését.

Számos gyulladással járó bőrbetegség kialakulásában szerepet játszik a pilosebaceous - apokrin egység, mely magában foglalja a szőrtüszőt, a szőrmerevítő izmot, a faggyúmirigyet, apokrin mirigyet és a szőrszál kivezető csatornáját (**3. ábra**).



3. ábra A bőr mirigyei. A) Az apokrin, az ekkrin verejtékmirigy és a faggyúmirigy elhelyezkedése a bőrben [37], B) az apokrin verejtékmirigy, C) az ekkrin verejtékmirigy és D) a faggyúmirigy mikroszkópikus képe

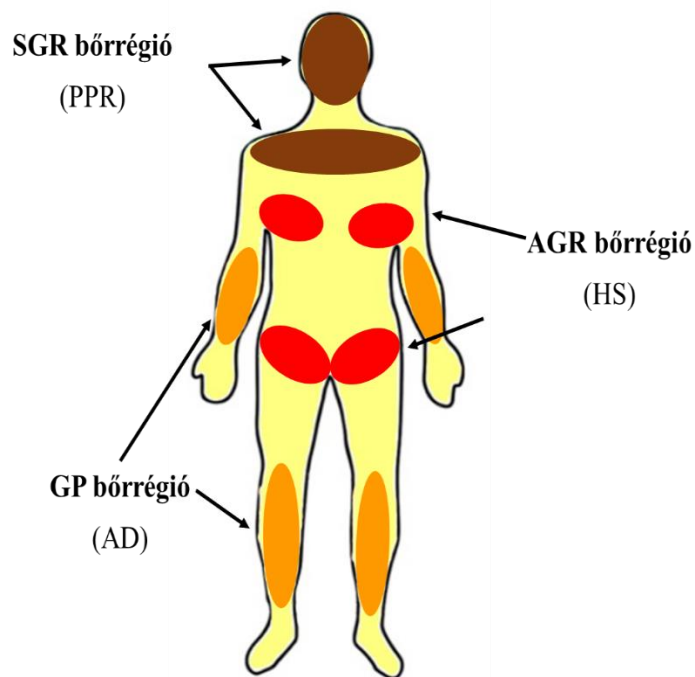
2. A bőr különböző régiói

Korábban igazolták, hogy az egészséges bélcsatorna különböző szakaszainak flórája eltérő összetételű. Ennek analógiájára megvizsgálták a bőrfelszín különbségeit is az eltérő régiókban [3][4]. Kimutatták, hogy a bőr mikrobiális összetétele nem egységes, a mikrobiom régióspecifitást mutat, párhuzamosan a bőr anatómiai, fizikai és kémiai sajátosságaival.

Az egészséges bőr eltérő anatómiai és kémiai tulajdonságai, valamint mikrobióta összetétele alapján 3 fő régiót különböztetünk meg: 1) az apokrin és faggyúmirigyekben szegény (GP), 2) a faggyúmirigyekben gazdag (SGR) és az 3) apokrin mirigyekben gazdag

(AGR) bőrterületeket. A GP bőrterület elsősorban az alkaron, lábszárakon valamint a törzsön jellemző (4. ábra mustár- és citromsárga területe). Az SGR bőrrégió az arcon, a hajas fejbőrön, a mellkas és a hát felső részén helyezkedik el (4. ábra barnával jelölt területe). Az AGR bőrrégió a hónaljokban, az emlők és környezetükben lévő areolák területén, az anus és a külső nemi szervek környékén, a külső fülben és a szempillák körül jellemző (4. ábra piros területe).

Az egészséges bőr topográfiaiban eltérő tulajdonságaival lehet kapcsolatban bizonyos régióspecifikus bőrbetegségek megjelenésének területi specifitása. Jól ismert jelenség, hogy bizonyos bőrbetegségek csak adott bőrterületekre lokalizálódnak: a HS AGR bőrterületekre, a rozácea (PPR) SGR, míg az atópiás dermatitisz (AD) GP bőrterületekre jellemző bőrbetegség.



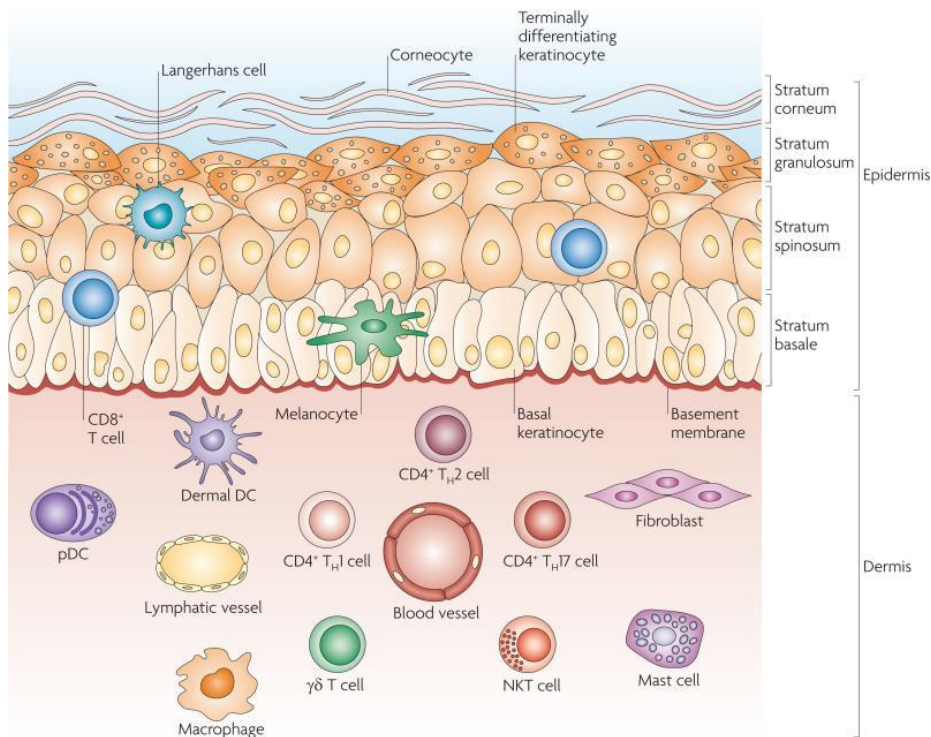
4. ábra Az egészséges bőr topográfiai régiói és az adott bőrterületekre jellemző gyulladásos bőrbetegségek.

3. A bőr immunrendszere

A bőr különböző rétegeiben a veleszületett és az adaptív immunválasz számos eleme megtalálható (5. ábra).

Az epidermiszben a bőr rezidens immunsejtjei közül a Langerhans sejteket (LC), a T-sejtek közül $CD8^+$ T-sejteket a stratum basale és a stratum spinosum KC-ái között találjuk meg.

A dermisz immunsejtjeinek diverzitása az epidermiszéhez képest lényegesen nagyobb. Megtalálhatók benne többek között a dermális dendritikus sejtek (DC), a $CD4^+$ T_{helper} (Th) sejtek, a $\gamma\delta$ T-sejtek, a természetes ölő sejtek (natural killer T, NKT), valamint jelen vannak még a makrofágok, a hízósejtek és a fibroblasztok.



5. ábra A bőr jellemző sejtjei. (Forrás: F. O. Nestle, P. Di Meglio, J. Z. Qin, and B. J. Nickoloff, ‘Skin immune sentinels in health and disease’, *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 10, pp. 679–691, 2009 [16])

3.1. A dendritikus sejtek

A DC-k a közvetlen immunválaszra és az antigén prezentálásra specializálódott sejtek. Valamennyi humán DC nagy számban expresszálja az MHC II (HLA-DR) markert, de hiányoznak a tipikusan származásra utaló markerek: CD3 (T-sejt), CD19/20 (B-sejt) és CD56 (természetes ölő sejtek) [17].

A DC-k az epidermiszben és a dermiszben is jelen vannak. Egészséges bőrben megkülönböztetjük az epidermális LC-eket, a dermális mieloid DC-eket (dDC) és a plazmacitoid DC-eket (pDC), míg gyulladásos bőrben az epidermisz és dermisz inflammatorikus dendritikus epidermális sejtjeit (IDEC), valamint az inflammatorikus dermalis DC-jeit (TIP-DC) [16][18].

3.1.1. Langerhans sejtek

A LC-k a gyulladástól mentes epidermisz szuprabazális rétegeiben helyezkednek el. Sejtjeiben intracitoplazmatikus organellumok, Birbeck granulomok találhatóak. Normál humán epidermiszben a LC-k CD1a-t és langerint/CD207-et expresszálnak [19][20]. Az LC-k az első mikrobiális antigénekkal találkozó DC-k. A lipid antigéneket és a mikrobiális fragmentumokat felvételük és feldolgozásuk után a DC-k prezentálják a naiv CD4⁺ T-sejtek számára [21], mellyel indukálják a Th sejtek differenciálódását és a naiv CD8⁺ T-sejtek proliferációját [22]. A LC-k nagy mennyiségben expresszálnak CD80, CD83, CD86 és CD40 markereket [17][23].

A Langerhans sejteket a dendritikus sejtek egy csoportjaként tartják számon, de vannak olyan csoportosítások, melyben külön sejttypusként kezelik őket, mivel bár bizonyos funkciókat tekintve a dendritikus sejtekhez kapcsolhatók, de eltérő eredetűek.

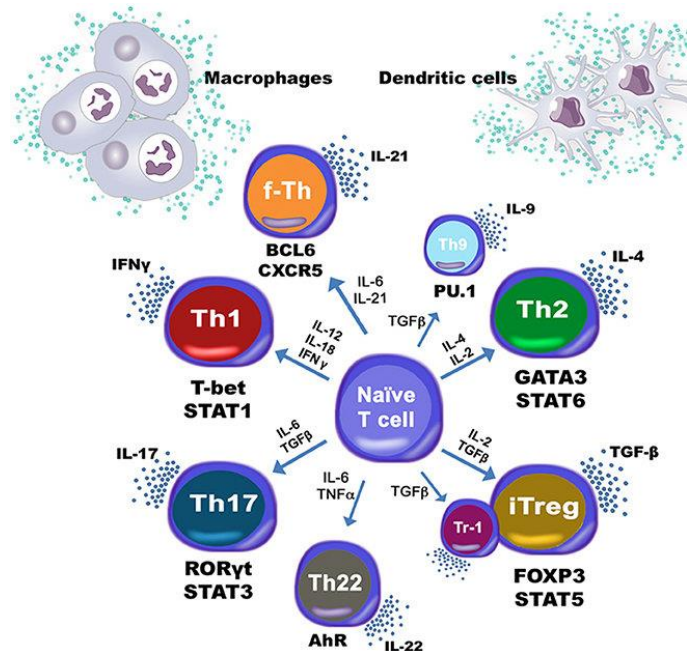
3.1.2. Dermális dendritikus sejtek

A dDC-k egészséges bőrben elsősorban az epidermisz-dermisz határnál helyezkednek el, innen migrálnak a dermisz mélyebb rétegeibe [16]. A dDC-kre általánosan jellemző a CD1c és a CD11c markerek együttes jelenléte. Ezeket a DC-ket három fő csoportba soroljuk: 1) CD1a⁺ DC, 2) CD14⁺ DC és 3) CD 141⁺ DC. A CD1a⁺ DC-k az érettebb dermális DC-k közé tartoznak. Felszínükön nagy mennyiségben expresszálnak CD80, CD83 és CD86 aktivációs markereket. Szerepet játszanak a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek differenciálódásában, proliferációjában [21][22][28]. Az éretlenebb CD14⁺ DC-k elsősorban a veleszületett immunválaszban fontosak. Sejtfelszínükön nagy mennyiségben expresszálnak patogén-felismerő receptorokat (TLR2, TLR4, CD206, CD209) [21][24].

A gyulladásban lévő bőrben további két DC típus jelenik meg: a CD1b, CD1c, CD11b, CD11c, CD23, CD36, CD80, CD86 és CD209 markereket expresszáló IDEC, valamint az MHC II, CD11c, CD14, CD163, CD206, CD209 sejtfelszíni markereket prezentáló TIP-DC-k [21]–[24][28].

3.2. A T-sejtek

Ma már jó ismert, hogy az emberi bőr körülbelül 20 milliárd T-sejtet tartalmaz, mely közel kétszerese a vérben található T-sejtek számának [24][25]. Fontos szerepet játszanak a patogénekkal szembeni védekezésben, hiányuk esetén különböző bőrbetegségek alakulnak ki. Az epidermális T-sejtek főleg a szuprabazális rétegben, míg a dermális T-sejtek az epidermisz és a dermisz határán, elsősorban a dermális papillákban halmozódnak fel [26]. A patogének eltávolítása után az effektor T-sejtek 95 %-a apoptotizál. A megmaradt T-sejtek elveszítik az effektor sejtekre jellemző CD45RA expressziójukat, helyette CD45RO markert szekretálnak [27]. Az így kialakuló memória T-sejteket három csoportba sorolhatjuk. 1) a CCR7⁺, L-szelektin (CD62L)⁺ *centrális memória T-sejtek (T_{CM})* a másodlagos nyirokszervekben cirkulálnak, a bőrben nem jelennek meg [28]. 2) A CCR7⁻, CD62L⁻ *effektor memória T-sejtek (T_{EM})* rövid életűek. Ide tartoznak a CD4⁺ Th és a CD8⁺ citotoxikus sejtek. Aktív résztvevői a fertőzésekkel szembeni immunválasznak. A fertőzés leküzdése után számuk lecsökken, ezzel párhuzamosan megnő a T_{RM} sejtek száma. A T_{EM} képes vándorolni a bőr és a vér között, ezzel biztosítva az összeköttetést a nyirokszervek és a távoli bőrszövet között. A CD4⁺ Th sejteket öt csoportba soroljuk: a Th1, Th2, Th9, Th17 és Th22 sejtek csoportjába (6. ábra) [34][35]. 3) A CCR7⁻ *szöveti-rezidens memória T-sejtek (T_{RM})* re-expresszálják a CD45RA markert [31]. Szerepük van a tartós, gyors, helyi immunválasz kialakulásában. Élettartalmuk hosszú, a bőrszövetből nem vándorolnak el [26][32].



6. ábra A CD4⁺ T sejtek típusai. (Forrás: A. Carbo *et al.*, ‘Computational modeling of heterogeneity and function of CD4⁺ T cells’, *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 2, Jul. 2014. [33])

3.2.1. A Th1 sejtek

Th1-sejtek elsősorban I-es típusú citokineket termelnek: IFN- γ -t, TGF- β -t és IL-2-t. IFN- γ szekréciójuk védelmet biztosít az intracelluláris pathogénekkal szemben, mint amilyen a *Mycobacteriumok* és a vírusok. A naiv T sejtek Th1-irányú differenciációját az IL-12 segíti elő, ami a T-bet transzkripciós faktort aktiválja. Az IL-12 a STAT4, míg az IFN- γ a STAT1 szignál útvonalat aktiválja és gyorsítja a Th1 sejtek differenciálódását. Az aktivált STAT4 és STAT1 szignál útvonal indukálja a T-bet expressziót [30][34]. A Th1 sejtek bőrben a kontakt dermatitisz kezdeti szakaszában dominánsak [35], valamint Th1 típusú immunválasz jellemző pszoriázisban (Ps) is.

3.2.2. A Th2 sejtek

A Th2 sejtek IL-4, IL-5, IL-13, IL-24, IL-25 és IL-31 citokineket termelnek. Differenciálódásuk az IL-4 citokin által aktivált STAT6 szignálútvonalon keresztül történik, amit a GATA3 transzkripciós faktor szabályoz. A Th2 sejtek fontos szerepet játszanak az atópiás betegségek kialakulásában (asztma, AD, ételallergia) [35][40].

3.2.3. A Th17 sejtek

A Th17 sejtek két csoportba sorolhatók: a nem-pathogén {Th17(β)} és a pathogén {Th17(23)} Th17 sejtek csoportjába [37]. A nem-pathogén Th17 – Th17(β) sejtek IL-17A, IL-17F, IL-10 interleukineket, CCL20-at és CXCR6-ot expresszálnak. Differenciálódásukat az IL-6 és a TGF- β 1 proinflammatorikus citokinek jelenléte szabályozza. Az IL-1 β , IL-6 és IL-23 együttes jelenléte esetén a nem-pathogén Th17 – Th17(β) átalakul pathogén Th17- Th17(23) sejté és megindul az IL-22, CCL9, CXCR9, valamint az IL-17A és az IL-17F expressziója [38].

Az IL-23 citokin kulcsszerepet tölt be a Th17 mediált pathogenitás kialakulásában. Irritált KC-k IL-1 β , IL-6 termelése stimulálja a DC-k nyirokcsomókba vándorlását és IL-23 expresszióját. A nyirokcsomókban a T-sejtek Th17 és Th22 sejté differenciálódnak és a bőrbe migrálnak [39]. A bőrben található Th17 és Th22 (skin-homing) sejtek IL-17A-t, IL-17F-

et, IL-22-öt és TNF- α -t termelnek, melyek aktiválják a KC-k IL-33, IL-36, CXCL2, CCL20 és AMP termelését. A patogén Th17 – Th17(23) sejtek szerepet játszanak a HS, a Ps és az AD pathomechanizmusában [10][43][44].

3.2.4. A Th22 sejtek

A bőrben elhelyezkedő Th22 sejtek CCR4-et, CCR6-ot és CCR10-et expresszálnak [42]. Funkciójuk az IL-10 citokin családba tartozó IL-22 citokin termeléséhez köthető. Az IL-22 egy pro- és antiinflammatorikus citokin, amit a Th22 sejtek mellett a Th1, Th17 és $\gamma\delta$ T-sejtek is termelnek. Elsősorban a veleszületett immunválasz aktiválásban játszik fontos szerepet Ps-ban, AD-ben és kontakt dermatitiszben [43].

3.2.5. A Th9 sejtek

A Th9 sejtek a Th2 és a naiv T-sejtekből differenciálódnak IL-4 és TGF- β hatására. Az IL-9-et termelő Th9 sejtek mennyisége elsősorban Ps-ban és AD-ben emelkedik meg [44].

3.2.6. A Foxp3⁺ regulatórikus T-sejtek

A Foxp3⁺CD4⁺ regulatórikus T (Treg) sejteknek immunszuppresszív hatásuk van. Eredetük szerint két csoportba sorolhatók: a tímusz (tTreg) eredetű és a perifériálisan indukált (pTreg) sejtek. A Foxp3-at a CD4⁺ T-sejtek körülbelül 20%-a termeli bőrben és kevesebb, mint 10%-a vérben [45]. CD25-öt, CD39-et és CD73-at expresszálnak, valamint indukálják a TGF- β , IL-10 és IL-35 immunszuppresszív citokinek termelését [46]. A Treg sejtek működésének hiányában számos autoimmun és gyulladásos bőrbetegség alakulhat ki.

3.3. A keratinociták

Az epidermiszt négy sejttípus alkotja: KC-k, LC-k, melanociták és Merkel-féle sejtek. Domináns sejttípusa azonban a KC, mely az epidermisz 95 %-át képezi és a stratum basale rétegében képződik [16].

A KC-k részt vesznek a szervezetet védő passzív fizikai barrier kialakításában. Receptoraiak segítségével képesek a patogénekre specifikus mintázatok (PAMP – pathogen-associated molecular pattern) felismerésére, mellyel befolyásolják a szervezet immunreakcióját azáltal, hogy különbséget tesznek az ártalmatlan és a patogén ingerek között. A KC-k közötti tight junction (TJ) segítségével megakadályozzák a szervezet víz és a benne oldott anyagok vesztését. Számos citokint, kemokint, növekedési faktort, valamint ezek receptorait termelik. Részt vesznek több gyulladásos bőrbetegség kialakulásában, szabályozásában. A KC-k a legnagyobb AMP (humán béta - defenzinek [hBD-k], LL-37, pszoriázin [S100A7], RNase7) termelők, így szabályozzák egyéb sejtek citokin és kemokin termelését, az angiogenezist, a sebgyógyulás folyamatát [16].

3.4. A bőr immunrendszer mediátorai

A bőr fiziko-kémiai barrierként a patogének számára impermeábilis határfelület. Immunológiai barrierként a benne található immunsejtek, KC-k, szebociták, fagociták, DC-k, T-sejtek és hízósejtek számos citokint, kemokint, proteázokat és AMP-t termelnek ezzel is védve a szervezetet a patogének inváziójától [47]–[49].

3.4.1. A citokinek

A citokineket a KC-k és egyéb bőrben található rezidens sejtek termelik, amelyekkel részt vesznek a sejtek közötti kommunikációban és a bőr barrier funkciójának fenntartásában. A citokinek hatással vannak a KC-k proliferációjára, differenciációjára. Egymásra kifejtett hatásuk egy komplex hálózati rendszert eredményez, ami szabályozza a KC-k fiziológiáját és a bőrbarrier egyensúlyi állapotát. A citokinexpresszió homeosztázisában bekövetkező zavar az epidermisz barrier funkciójának károsodását okozza, ami különböző bőrbetegségek

kialakulásához vezet. A citokinek szerepet játszanak mind az egészséges, mind a gyulladásban lévő bőr immunfolyamatainak szabályozásában.

A citokinek és a receptoraik öt csoportba sorolhatók háromdimenziós szerkezetük alapján: 1) az I. típusú interleukin citokin receptor konzervált aminosav egységet tartalmaz az extracelluláris doménjén (IL-4, 6, 13, 21, 23, 31); 2) a II. típusú interleukin citokin receptorai hasonlóak az I. típusú receptorokhoz, de nem tartalmaznak konzervált egységet (IL-19, 20, 22, 24, IFN α , γ); 3) az immunglobulin (Ig) szupercsalád tagjai extracellulárisan az immunglobulin doménnel homológ egységeket tartalmaznak (IL-1 α , β); 4) a tumor nekrosis faktor receptor család tagjai ciszteinben gazdag extracelluláris citokinkötő domént tartalmaznak (TNF α); 5) az IL-17 citokin család más citokincsaládok receptoraival csak kis mértékben homológ struktúrákat tartalmaz (IL-17, 25) [50] (1. táblázat).

1. táblázat A citokin receptorcsaládok és citokinjei [50].

	Citokin receptor családok				
	I. típusú interleukin	II. típusú interleukin	Immunglobulin	Tumor nekrosis faktor	IL-17
Citokinek	IL-4	IL-19	IL-1 α	TNF α	IL-17
	IL-6	IL-20	IL-1 β		IL-25
	IL-13	IL-22			
	IL-21	IL-24			
	IL-23	IFN α			
	IL-31	IFN γ			

3.4.2. A kemokinek

A KC-k a kemokinek egyik fontos forrásai. Az 50-100 aminosavból álló molekulák szerepet játszanak a kemotaxis indukálásában, a sejtek közötti adhézió erősítésében, az effektor leukociták aktiválásban, a makrofágok gyulladás helyszínére történő vonzásában, módosítják a bőr immunválaszát gyulladás során. Szerkezetük alapján négy csoportba sorolhatók: CCL, CXCL, XCL és CX3CL [16][51].

3.5. Az antimikrobiális peptidek

Az antimikrobiális és immunmoduláló peptidek családjába tartozó molekulákat a KC-k, hízó sejtek, sebociták, neutrofil granulociták és az ekrin verejtékmirigyek szekretálják. Ezeknek a kis méretű, gyakran 12-50 aminosavból álló peptideknek [52] szerepük van egészséges bőr homeosztatis állapotának fenntartásában és a patogénekkal szembeni veleszületett immunválaszban. Részt vesznek a immunmoduláló folyamatokban, szabályozzák a sejtek proliferációját, differenciálódását és migrációját, a citokin és kemokin termelést [52][53][55]–[58].

Az AMP-eket a SC mélyebb rétegeiben lévő élő sejteinek laminális testjei termelik, majd exocitózissal a bőrfelszínre szekretálják, ahol egy vékony filmréteget képeznek [6][54][58]. Az AMP-k egyik csoportja az egészséges bőrbarrier homeosztázisát fenntartva folyamatosan jelen van a bőr felszínén, míg mások különböző ingerek hatására indukálódnak (**2. táblázat**). A DCD, hBD-1, LL-37, S100A7, lizozim (LYZ) és a lorikrin (LOR) az egészséges emberi bőr felszínén folyamatosan jelen lévő AMP-k [59]. A bőrbarrier károsodásának következtében azonban megváltozik az AMP-k összetétele, mennyisége. Az indukált AMP-k, úgymint a hBD-2, S100A12, S100A15, RNase 1, 4, 5, mint gyulladásos szignál termelődnek és erősítik a sejt migrációját, proliferációját, differenciálódását, a citokin és kemokin termelést, valamint pro-, antiinflammatorikus és immunmoduláló tulajdonsággal rendelkeznek [48][49][67]–[69][57][60]–[66].

2. táblázat A bőr antimikrobiális peptidjeinek megjelenése [57].

	AMP-k szekréciónak helye				
	Epidermisz	Verejtékmirigy	Sebociták	Neutrofilek	Hízósejtek
Konstitutív AMP-k	hBD1 S100A7 S100A8/A9 LYZ	hBD-k LL-37 DCD	LL-37	α -defensinek LL-37 S100A7	LL-37
Indukált AMP-k	hBD2 hBD3 hBD4 LL-37 S100A7 S100A8/A9 S100A12 S100A15 RNase 1, 4, 5, 7	LL-37	hBD-k LL-37 S100A7		

A *hBD* a KC-k, az epithél sejtek, a neutrofilek, a makrofágok és a fibroцитák által termelt AMP. Baktériumok, vírusok, inflammatorikus citokinek, növekedési faktorok hatására expressziója nő, míg IL-4, IL-10 és IL-13 citokinek hatására csökken. Indukálja a sejtek citokin és kemokin termelését, aktiválja a hízósejteket, elősegíti a kemotaxist és a proliferációt. Gátolja az apoptózist, a gyulladáshoz szükséges citokinek termelését, részt vesz a TJ barrier szabályozásában. Akné vulgárisis és Ps esetén expressziójuk jelentősen megemelkedik, míg AD esetén lecsökken [57].

A *LL-37* a KC-k, neutrofilek, hízósejtek, makrofágok, monociták és T-sejtek által termelt AMP. Baktériumok, vírusok, inflammatorikus citokinek hatására indukálódik, valamint IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10 és IL-13 hatására alulszabályozottá válik. Szabályozza a citokin, kemokin termelést, a sejtproliferációt. Ps-ban, PPR-ban, akné vulgárisisban mennyisége megemelkedik, AD-ben lecsökken [57].

Az *S100A7* peptidet a KC-k, a neutrofilek, a monociták és a limfociták termelik. Mennyisége baktériumok, flagellinek, gyulladáshoz szükséges citokinek hatására nő, IFN- γ és antioxidánsok hatására csökken. Indukálja a sejtek citokin és kemokin termelését, serkenti a kemotaxist, a proliferációt, szabályozza a sejt differenciálódását és a bőr barrier funkcióját. Mennyisége jelentősen emelkedik Ps-ban és AD-ben [57].

A *DCD* az ekkrin verejtékmirigyek nyálkahártya sejtjei által termelt, a mirigy kivezetőcsatornáján keresztül a bőr felszínére szekretálódó AMP. Egészséges bőrben folyamatosan jelen van és szerepet játszik az egészséges bőrfelszín normál flórájának szabályozásában. Indukálja a citokin és kemokin termelődést. Gyulladáshoz szükséges bőrben mennyisége csökken vagy teljesen eltűnik, mivel gyulladásban az ekkrin mirigyek működése megszűnik [8][57][70][71].

4. Hidradenitisz szuppurativa

A HS egy krónikus, visszatérő, a pilosebaceous - apokrin egységek gyulladásával járó bőrbetegség. Leggyakrabban a hónaljban, lágyéki, anus régióban, külső nemi szerveken, combtőben, nőknél mell alatti területen kialakuló bőrbetegség. A lakosság érintettsége 0,05 – 4 % [70][71]. Általában pubertás korban alakul ki és a fertilis kor végéig tart. Pubertáskor előtti HS-ás esetek száma minimális [72][73]. A reprodukív életszakaszban lévő nők érintettsége nagyobb a férfiakéhoz képest [76] és a tünetek csak a menopauza idején csökkennek vagy szűnnek meg.

A nomenklatúra alapján a 'hidradenitisz' elnevezés a verejtékmirigyek gyulladására utal. A kutatások kezdeti szakaszában a HS gyulladásának középpontjában az apokrin mirigyek álltak [77][78]. Ma már tudjuk, hogy a HS primer gyulladása a pilosebaceous – apokrin egységekben alakul ki, ami magában foglalja a szőrtüszőket és a hozzájuk kapcsolódó faggyú- és apokrin mirigyeket. Gyulladás során a szőrtüsző kivezető csatornája hiperkeratózis során eltömődik, ami tárgulatok és sipolyok kialakulását okozza. Az apokrin mirigyek gyulladásos érintettsége másodlagosan alakul ki [79]. A HS-ben szenvedő betegek esetében az apokrin mirigyek száma, sűrűsége és eloszlása nem változik meg az egészségesekhez képest, de a faggyúmirigyek mérete csökkenhet [79]–[81].

A HS számos fenotípusos megjelenését ismerjük, amit az irodalom többféleképpen próbál klasszifikálni. Ez segítséget nyújthat a klinikai gyakorlatban ennek a nem könnyen felismerhető bőrbetegségnek a diagnosztizálásában, amit tovább nehezít az a tény, hogy a jelenleg létező klasszifikációk egyikét sem fogadják el általánosan.

A klinikumban leggyakrabban használt fenotípusos besorolás szerint megkülönböztetjük az „európai” vagy „axilláris-mammiláris” HS-t. Ebben az esetben a hegesedő folliculitis mellett ciszták, felületes csomók, besüllyedt hegek jelennek meg elsősorban a faron és az ágyéki régióban. A betegek gyakran túlsúlyosak és dohányoznak. A *conglobata típusú* HS esetén gyakori az acne conglobata és ciszták kialakulása főleg a háton és az arcon. A betegeknél gyakori a családi halmozódás. A *frikciós furunkulus* típus elsősorban elhízott betegeknél alakul ki a combon, hason, gluteális régióban, ahol a bőr nagyobb gyakorisággal és intenzívebben sűrűlódik. Az *ektópiás típus* a nyakszirten, arcon, hallójárat területén jellemző, míg a *szindrómához társult* típus esetén a pyoderma gangrenosum és az arthritis figyelhető meg, mint társbetegség [82], [83].

A folyamatos, sokszor elviselhetetlen fájdalom, a kedvezőtlen esztétikai látvány, a hegesedés miatt kialakuló mozgás korlátozottság, a sebek erős váladékozása a betegek nagy százalékában a munkahely elvesztését, a párkapcsolatok felbomlását okozza, akadályozza új kapcsolatok kialakításának lehetőségét, ami depresszióhoz, az életminőség jelentős romlásához vezet. A HS kialakulása miatt a fiatal felnőtt korosztály munka- és keresőképessége, reprodukciós rátája jelentősen csökken, ezért pathomechanizmusának minél pontosabb feltárása rendkívül fontos [84].

A HS súlyosságát a Sartorius pontozás, a bőrgyógyászati életminőségi index (dermatology life quality index, DLQI) és a Hurley státusz alapján határozzák meg a legtöbb

esetben. A Sartorius pontozás az érintett régiók, csomók és szinusz traktusok számozása alapján osztályoz. A Hurley rendszer három különböző státuszát írja le a HS-nak:

1. státusz: egy vagy néhány nodusz, tályogképződés, de hegesedés vagy szinusz traktusok nélkül;

2. státusz: ismétlődő tályogképződés, számos nodusz, hegesedéssel és szinusz traktus képződéssel, azonban ezek még szigeteket alkotnak, nem összefüggő a terület érintettsége;

3. státusz: diffúz vagy nagy kiterjedésű összefüggő bőr érintettség több, egymással összefüggő szinusz traktussal és tályoggal, hegesedéssel [85].

4.1. A hidradenitisz szuppurativa pathomechanizmusa

A HS pathomechanizmusa még nem teljesen tisztázott [86]. Kialakulásában számos endogén és exogén faktor vesz részt. Endogén faktorok közé tartozik a családi genetikai halmozódás, az adott régió készenléti immunstátusza és a hormonális hatások. Exogén faktorokhoz soroljuk a dohányzást, az elhízást, az adott régió folyamatos mechanikai érintettségét (súrlódás) [87].

A HS pathogenezisében kiemelt szerepet játszanak a TNF- α és az IL-17 citokinek. A veleszületett és az adaptív immunsejtek által is szekretált TNF- α a HS léziós szövetben, a gyulladás súlyosságával korrelálva, nagyobb mennyiségben mutatható ki, mint az egészséges vagy Ps-os léziós bőrszövetben [86][87].

A TNF- α szerepe sokoldalú a HS gyulladás folyamatában [90]. Hatására megemelkedik a Th17/Treg sejtek aránya, ami a Th17 sejtek által termelt citokinek mennyiségének emelkedését eredményezi [89]. A TNF- α gátlása csökkenti a Th17/Treg sejtek arányát, aminek következtében csökken az IL-17 citokint termelő T-sejtek száma. Ennek hatására csökken az IL-22, az INF- γ és az IL-2 citokint termelő CD4⁺ T-sejtek száma [89]. A TNF- α hatással van az adipociták és az izomsejtek inzulin-szignál útvonalára, valamint gátolja az adipociták antiinflammatorikus hatással rendelkező adiponektin hormon szekrécióját [91].

A HS kialakulásának egyik aktiváló tényezője a dohányzás [92]. A rendszeresen dohányzó betegek körében a HS súlyosabb tünetekkel jelentkezik nemdohányzó társaikhoz képest [72][91]. A füstben található nikotin hatására emelkedik az ekkrin mirigyek szekréciója.

A szekrétum nikotin tartalma indukálja a KC-k és a Th17 sejtek TNF- α termelését. A nikotin stimulálja a makrofágokból az IL-1 β és a TNF- α felszabadulását és a mátrix metalloproteázok (MMP) expressziójának növekedését [94].

HS lézióban megfigyelték a Toll-like receptorok (TLR) és az MMP-k nagy mennyiségét [95]. A TLR4 aktiválja a különböző proinflammatorikus citokinek (TNF- α , IL-1 β , IL-6), valamint antiinflammatorikus citokin (IL-10) génexpresszióját [96]. Az MMP-k közvetlenül aktiválják a gyulladást előidéző faktorokat. A HS lézióban megjelenő MMP2-t a TNF- α , míg az MMP9-t a TLR-k, a TNF- α és az IL-17 citokinek indukálják [94].

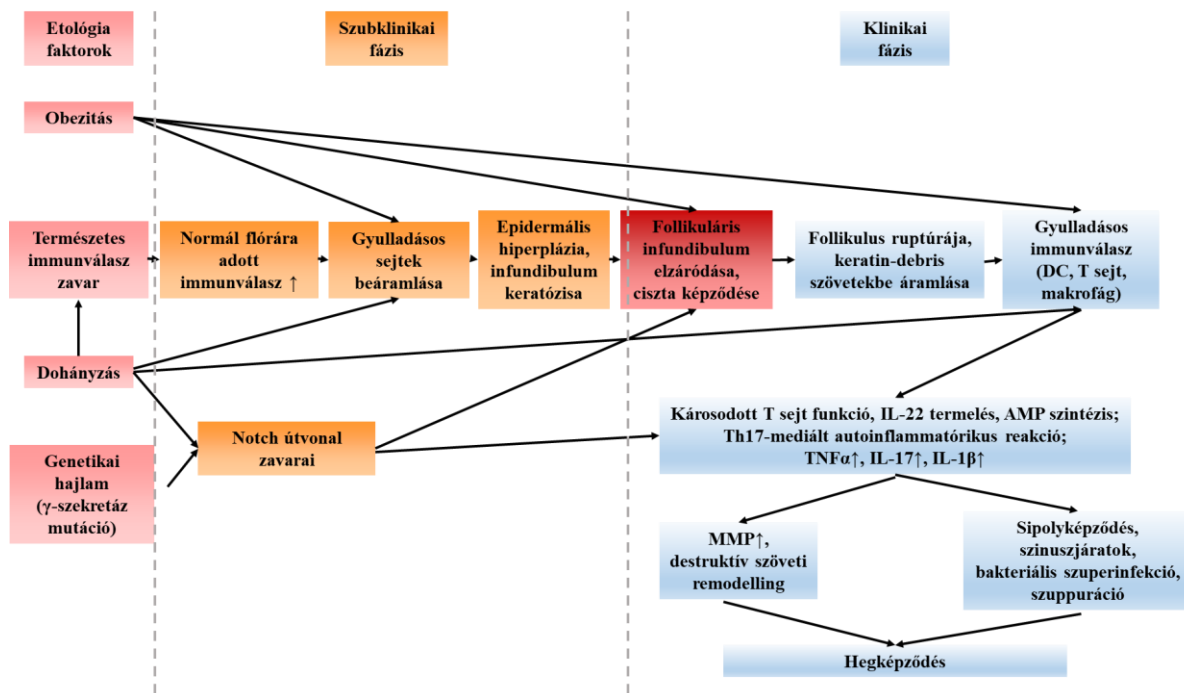
Az IL-17A citokint az IL-23 által stimulált CD4⁺ T-sejtekből differenciálódó Th17 sejtek nagy mennyiségben szekretálják. A Th17 sejtek nagy számban jelennek meg léziós és perilezionális HS bőrben egészséges kontrollhoz képest [5][87]. A Th17 sejtek által termelt IL-17 citokin mennyisége erős korrelációt mutat a HS gyulladás súlyosságával, de nincs összefüggésben a nemmel, a korrallal és a dohányzással [95][96]. Az IL-17 indukálja az IL-1 β , IL-6 és TNF- α expresszióját a nod-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammaszómákon keresztül. Az inflammaszómák aktiválják a caspase-1-et, ami indukálja az IL-1 β és az IL-18 proinflammatorikus citokinek termelését. Az IL-1 β emelkedett mennyiségben van jelen mind a léziós, mind a perilezionális HS-ás bőrben [86][88].

A HS gyulladásos folyamataiban további citokinek is szerepet játszanak. Az IL-23 a nem gyulladásos Th17 sejtek gyulladásos formába való differenciálódásában közreműködő citokin [99]. A veleszületett és az adaptív immunválaszban részt vevő IL-36 a KC-k és a monociták által nagy mennyiségben termelt citokin, mely szignifikánsan nagyobb mennyiségben van jelen HS lézióban, mint egészséges bőrben [100]–[102]. Az IL-6 proinflammatorikus citokin számos gyulladásos folyamatban vesz részt. Nagy mennyiségben detektálható elsősorban középsúlyos vagy súlyos HS-ás bőrben az egészséges bőrhöz képest [92][101][102]. Az INF- γ HS pathogenezisében betöltött szerepe még nem teljesen tisztázott, de számos tanulmány kimutatta, hogy HS lézióban mennyisége jelentősen nagyobb, mint az egészséges bőrben [5][103].

Mindezen változások eredője, hogy HS gyulladás során a KC-k intenzív proliferációba kezdenek, a kommenzális baktériumokra adott immunválaszunk patológiás irányba eltolódik, aminek hatására a citokin és az AMP termelésének egyensúlyi állapota felborul [106]. A gyulladásos sejtek, köztük a T-sejtek és a veleszületett immunválasz sejtjei nagy számban beáramlanak a folliculáris infundibulum sejtjei közé. A proinflammatorikus citokinek és

kemokinek expressziója megemelkedik, ami a szőrtüszők epitheliumának hiperpláziájához, az infundibulum keratóziséhez vezet [106]. A betegség lefolyása, az eddig klinikai tüneteket nem mutató szubklinikai szakaszból átlép a klinikai fázisba. Ebben a szakaszban a follikuláris infundibulum elzáródása ciszták kialakulásához vezet, a keratinrostok és a szövettörmelékek a perifollikuláris szövetekben maradványok újabb gyulladásos folyamatokat indukálnak, ami a DC-knek és a T-sejteknek a dermisz mélyebb rétegeibe történő fokozott beszűrődését, aktiválódását eredményezi. A visszamaradt keratin sipolyok, szinuszjáratok kialakulását okozza, bakteriális kolonizáció és gennyesedés (szuppuráció) mellett [106] (7. ábra).

A HS kezelésében jelenleg lokális, szisztémás és biológiai típusú gyulladáscsökkentő terápiák, valamint sebészi kezelés áll a bőrgyógyászok rendelkezésére. Ez utóbbiak a HS kórlefordulásának sokszínűsége miatt sok esetben csak időleges tünetmentességet eredményeznek. A hatékony terápia lehetőség kidolgozása érdekében nélkülözhetetlen a betegség molekuláris folyamatainak pontos ismerete.



7. ábra A HS pathogenesisének hipotézise. AMP – antimikrobiális peptid; DC – dendritikus sejt; IL – interleukin; MMP – mátrix metalloproteináz; Th – T helper sejt; TNF – tumor nekrozis faktor, (Forrás: K. Gáspár, É. Remenyik, and A. Szegedi, 'The pathophysiology of hidradenitis suppurativa', *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szle.*, vol. 92, no. 5, pp. 215–219, Oct. 2016 [107])

Célkitűzés

Jelen doktori értekezés alapjául szolgáló kísérletsorozatok céljai:

I/1. Az egészséges apokrin és faggyúmirigyekben szegény (GP) és az apokrin mirigyekben gazdag (AGR) bőrrégiók immun és barrier sajátosságai közötti különbségek feltárása.

I/2. Az apokrin mirigyekben gazdag bőrterületek sajátosságainak vizsgálata abból a szempontból, hogy hogyan változnak meg a nedves bőrre lokalizálódó gyulladásoos bőrbetegség, a HS kialakulása során.

II/1. Egy minimálisan invazív, tape stripping technikával történő SC mintagyűjtési módszer beállítása tömegspektrometriás analízishez.

II/2. A PRM alapú tömegspektrometriás mérés paramétereinek optimalizálása SC mintára.

II/3. . Egy új, hexánmentes fehérje kinyerési módszer kidolgozása és összevetése a hexán alapú módszerrel.

II/4. Az egészséges bőr különböző régióiban a SC AMP összetételének vizsgálata a nagy specifitással rendelkező PRM alapú tömegspektrometriás módszer segítségével.

Anyagok és módszerek

A vizsgálatainkhoz használt bőربيopsziás és SC minták gyűjtése a Debreceni Egyetem Bőrgyógyászati Klinika és Sebészeti Klinika Járóbeteg Szakrendeléseinek megjelent betegektől, valamint egészséges önkéntesektől történt. Valamennyi résztvevő aláírta a vizsgálat elvégzéséhez szükséges, a Helsinkai nyilatkozat irányelveinek megfelelő és a DE RKEB/IKEB által elfogadott Betegbeleegyező nyilatkozatot (az etikai engedélyek száma: 4492 -2015 - DE RKEB/IKEB, 5064 – 2018 - DE RKEB/IKEB). Vizsgálatainkhoz egészséges személyek és gyulladásos bőrbetegségben szenvedő betegek mintáit használtuk. Az egészséges személyek bőrén nem manifesztálódott és kórtörténetükben sem jelent meg gyulladásos bőrbetegség. A gyulladásos bőrbetegségben szenvedő betegek közepes vagy súlyos tünetekkel rendelkeztek, az esetleges terápiás kezelésük mintavétel előtt pontosan meghatározott időben le lett állítva.

1. Mintagyűjtés

1.1. Bőربيopsziás minták gyűjtése

Első kutatási projektünk során egészséges személyektől származó nedves (AGR, n=8) és száraz (GP, n=8) bőrmintákat, valamint a HS-ás betegektől származó léziós bőrmintákat (n=8) vizsgáltunk. A GP mintákat lábszárról vagy alkarról, az AGR és a HS mintákat axilláris régióból nyertünk (**3. táblázat**). Kutatócsoportunk definíciója szerint apokrin mirigyekben gazdag bőrről akkor beszélünk, ha az apokrin mirigyek száma a teljes bőrmetszet 100x-os mikroszkópos nagyítása során meghaladja a kettőt [5].

A vizsgált HS-ban szenvedő betegek közé olyan személyek kerültek beválogatásra, akik 18 év felettek, középsúlyos vagy súlyos HS tünetekkel rendelkeztek, és tüneteik legalább 6 hónapja jelentkeztek először. Mintavétel előtt a betegek biológiai terápiában nem részesültek, a hagyományos szisztémás terápiát 4 héttel, míg a helyi kezeléseket 4 nappal a biopszia előtt leállították.

3. táblázat. Az egészséges és a HS-ban szenvedő betegek vizsgált bőrmintáinak összefoglalása.

GP bőr (n=8)					AGR bőr (n=8)				
Donor kód	Nem	Kor	Mintavétel helye	Apokrin mirigyek száma	Donor kód	Nem	Kor	Mintavétel helye	Apokrin mirigyek száma
GP1	N	63	lábszár	-	AGR1	N	76	hónalj	++
GP2	N	66	alkar	-	AGR2	N	79	hónalj	+++
GP3	N	55	felkar	-	AGR3	N	42	hónalj	+
GP4	N	64	lábszár	-	AGR4	N	82	hónalj	++
GP5	F	80	lábszár	-	AGR5	N	56	hónalj	+
GP6	F	66	felkar	-	AGR6	N	58	hónalj	+++
GP7	F	81	lábszár	-	AGR7	N	76	hónalj	+++
GP8	F	56	lábszár	-	AGR8	N	75	hónalj	++
Átlag ± SD		66,3 ± 9,66			Átlag ± SD		68 ± 14,21		

HS bőr (n=8)							
Donor kód	Nem	Kor	Mintavétel helye	Apokrin mirigyek száma	Sartorius	DLQI	Hurley
HS1	F	28	hónalj	+	79	18	III
HS2	F	60	hónalj	+	55	14	II
HS3	F	34	hónalj	+++	44	13	II
HS4	F	25	hónalj	+	136	15	III
HS5	N	20	hónalj	+++	48	26	II
HS6	N	23	hónalj	++	81	20	III
HS7	N	31	hónalj	++	137	23	III
HS8	N	27	hónalj	+++	85	25	II
Átlag ± SD		31 ± 12,51			83,13 ± 36,41	19,25 ± 5,06	

Az apokrin mirigy számának jelölése a mikroszkópikus látótér 100-as nagyításán látható apokrin mirigyek száma alapján történt: abban az esetben, ha a minta nem tartalmazott apokrin mirigyeket, n=0, ' - ' jelölést alkalmaztunk (GP-száraz bőr); ha $n \geq 2$ apokrin mirigy volt a mintában, akkor '+' jelölést (AGR-nedves bőr). A „+” jelzések száma az apokrin mirigyek mennyiségét jelöli: n = 2 vagy 3 esetén (+), n = 4 vagy 5 esetén (++) , míg $n \geq 6$ esetén (+++). Az GP bőr nem tartalmazott apokrin és faggyúmirigyeket sem. A HS bőrben az apokrin mirigyek száma szerinti pontozás megegyezett az AGR bőrnél leírt pontozással.

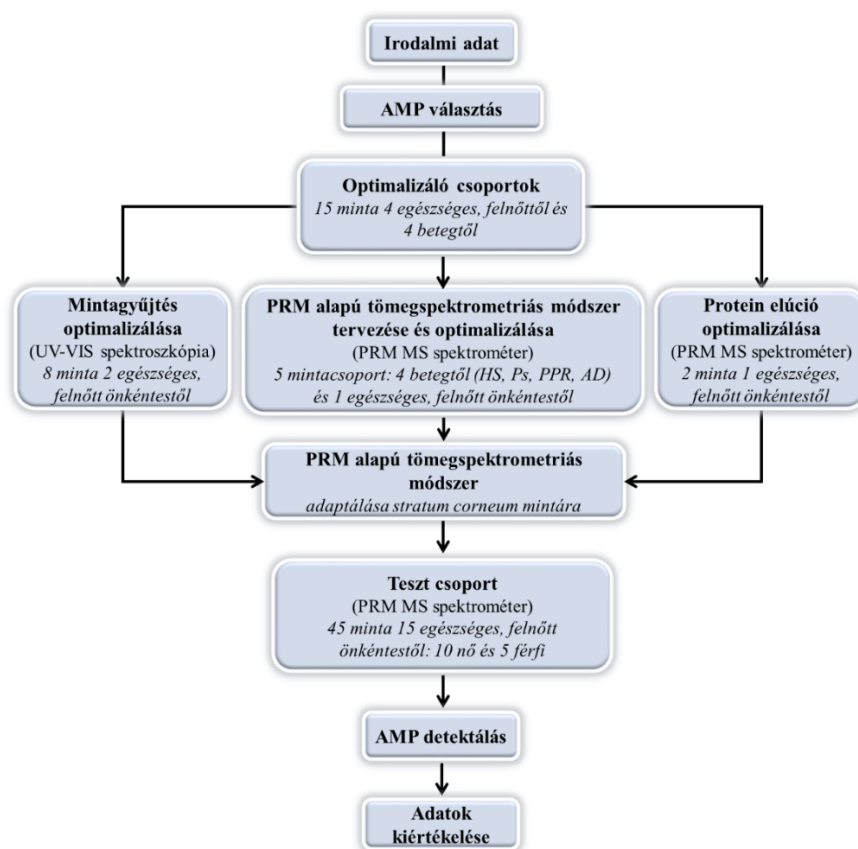
A begyűjtött bőrbioptziás minták egyik feléből génszintű vizsgálatok történtek RT-qPCR módszerrel. Ebben az esetben a mintákat RNAlater reagensben (Qiagen, Hilden, Németország) tároltuk -70 fokon az RNS izolálásig. A minták másik felét IHC vizsgálatokhoz használtuk. Ebben az esetben a teljes bőrmetszeteket formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk.

1.2. A stratum corneum minta gyűjtése

23 felnőtt önkéntestől (19 egészséges és 4 beteg [HS, Ps, PPR, AD]) összesen 60 SC mintát gyűjtöttünk be (függelék 1. táblázat).

Mivel a minta kinyeréséhez és analizéséhez egy olyan új módszert alkalmaztunk, mely korábbi irodalmakban még nem volt leírva, ezért a begyűjtött minták egyik felét a vizsgálati módszer optimalizálására használtuk fel. Első lépésként a mintagyűjtés metodikáját optimalizáltuk (2 egészséges önkéntes: 1 nő, kora: 41 év; 1 férfi, kora: 34 év), ezt követte a PRM alapú tömegspektrometriás módszer beállítása (egy súlyos HS-ás nő, kora: 44 év; 1 közepesen súlyos Ps-os férfi, kora: 30 év; 1 súlyos PPR-ás nő, kora: 40 év; 1 közepesen súlyos AD-es férfi, kora: 44 év; 1 egészséges férfi, kora: 34 év), majd a fehérjemennyiség kinyerését optimalizáltuk (1 egészséges férfi, kora: 34 év) a méréshez.

A minták másik felében az egészséges bőr három régiójának SC-ban található AMP-k összetételét vizsgáltuk (15 egészséges önkéntes: 10 nő, életkor megoszlás medián értéke: 28 ± 9.7 év; 5 férfi, életkor megoszlás medián értéke: 35 ± 10.8 év) (8. ábra).



8. ábra. A SC vizsgálat munkamenete

2. RNS izolálás bőrbopsziás mintákból, Reverz Transzkripció és RT-qPCR

Az RNAlater oldatban tárolt mintákat teljes RNS izolálás során TriReagent oldatban (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) homogenizáltuk Tissue Lyser-ben (Qiagen) autoklávozott vasgolyók segítségével (Qiagen). Az izolálás során nyert teljes RNS tisztaságának és koncentrációjának ellenőrzése NanoDrop Spectrophotométerrel (Thermo Scientific, Bioscience, Budapest, Hungary) történt. Az RNS minőségét az Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segítségével ellenőriztük.

A kinyert RNS a High Capacity cDNS Archive Kit (Invitrogen, Life Technologies, San Francisco, CA) gyári ajánlásnak megfelelően, hőindukált enzimmel került átírásra komplementer DNS-é (cDNS). A mintákat DNase I (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) enzimmel kezeltük, annak érdekében, hogy elkerüljük a genomi DNS kontaminációt.

Az RT-qPCR vizsgálatokhoz gyárilag megtervezett FAM-MGB assay-t használtunk. A mérések triplikátumban történtek TaqMan® Gén expressziós Master Mix használatával (Applied Biosystem, Life Technologies).

A mérésekhez használt gyári primerek (4. táblázat):

4. táblázat. Az RT-qPCR méréshez használt primerek.

Név	Kód	Név	Kód
PPIA	Hs99999904_m1	CCL2	Hs00234140_m1
IL-17	Hs00174383_m1	CCL3	Hs00234142_m1
IL-10	Hs00174086_m1	CCL19	Hs00171149_m1
IL-1 β	Hs00174097_m1	CCL20	Hs00355476_m1
CD80	Hs01045163_m1	CCL23	Hs00270756_m1
CD83	Hs00188486_m1	CCL24	Hs00171082_m1
CD86	Hs01567026_m1	TSLP	Hs00263639_m1
IL-6	Hs00985639_m1	S100A7	Hs00161488_m1
TGF β	Hs00171257_m1	S100A8	Hs00374264_g1
RORc	Hs01076112_m1	S100A9	Hs00610058_m1
IL-12B	Hs01011518_m1	DEFB4B (hBD-2)	Hs00175474_m1
TBX21	Hs00203436_m1	LCN2	Hs01008571_m1
IFN γ	Hs00174143_m1	LOR	Hs01894962_s1
TNF α	Hs00174128_m1	FLG	Hs00856927_g1
IL-13	Hs00174379_m1	CLDN1	Hs00221623_m1
GATA3	Hs00231122_m1	KRT17	Hs00356958_m1
FOXp3	Hs01085834_m1	KRT79	Hs00418343_m1
CCR4	Hs00747615_s1	TLR2	Hs01872448_s1
CCR8	Hs00174764_m1	TLR4	Hs00152939_m1
IL-22	Hs00220924_n1	NLRP3	Hs00918082_m1
AHR	Hs00907314_m1		

A mérések minden esetben a LightCycler® 480 System (Roche Magyarország Kft., Budaörs, Magyarország) műszerrel történtek a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumában. A célgének relatív mRNS mennyiségét a komparatív $\Delta\Delta C_t$ módszer használatával határoztuk meg a standard görbéhez viszonyítva. A mérések PPIA mRNS expressziós szintjéhez lettek normalizálva.

3. A teljes bőrmetszetek rutin festése és immunohisztokémiai jelölése

Első lépésben a teljes bőrmintákat az apokrin mirigyek száma szerinti osztályoztuk. A szöveti részletek pontos meghatározása May-Grünwald-Giemsa festéssel történt. A HS léziókból származó bőrminták pathológiai súlyosságát haematoxylin-eosin (H&E) festés után határoztuk meg. A metszetek pathológiai vizsgálatát a DE Bőrgyógyászati Klinika patológusa végezte. A bőrminták osztályozása után a célfehérjék mennyiségének meghatározása IHC-i jelöléssel történt.

3.1. May-Grünwald-Giemsa és a hematoxin-eozin (H&E) festés

A formalinban fixált paraffinba ágyazott metszeteket Pathoclear I. és Pathoclear II. (Molar Chemical Kft., Magyarország) oldatban 4 percig deparaffináltuk, majd az acetoneban és izopropil alkoholban rehidratált metszeteket 30 percig Gimsa-May-Grünwald oldatban (Molar Chemical Kft., Magyarország) festettük. A festés híg ecetsavas differenciálása után a víztelenítés izopropanolban és acetoneban történt.

A hematoxin-eozin (H&E) festés során a metszeteket deparaffinálása után 2-2 percig festettük hematoxin, majd eozin (Molar Chemical Kft., Magyarország) oldatban.

3.2. Immunohisztokémiai jelölés

Az IHC jelöléshez a 3 mikronos metszetek deparaffináltuk, majd rehidratálása után az endogén peroxidázokat 3%-os H_2O_2 oldattal kötöttük meg 15 perces kezeléssel. Hőindukált antigénfeltárás után az aspecifikus antitest bekötődéseket 1 %-os szarvasmarha szérum albuminnal (bovine serum albumin - BSA) (Sigma-Aldrich Kft.) blokkoltuk, majd a

metszeteket nedves kamrában, 4 °C-on, egész éjszakán át inkubáltuk az alábbi primer antitestekkel (5. táblázat):

5. táblázat. Az IHC jelöléshez használt antitestek listája.

Antitest neve	Izotípus/klonalitás	Gyártó	Katalógus száma	Hígítás/ pH
humán IL 17	nyúl, poliklonális	Covalab	pab70016	1:200, pH 6
humán IFN γ	nyúl, poliklonális	Novus Biologicals	NBP1-19761	1:3000, pH 9
humán CCL2/MCP1	egér, monoklonális	Novus Biologicals	NBP2-22115	1:300, pH 6
humán CCL20/MIP-3- α	egér, monoklonális	LifeSpan Bioscience	LS-B7409	1:150, pH 6
humán S100A8	nyúl, poliklonális	Sigma-Aldrich	HPA024372	1:500, pH 6
humán lipokalin/LCN2 (NGAL)	nyúl, poliklonális	Invitrogen	PA5-32476	1:100, pH 6
humán lorikrin	nyúl, monoklonális	Novus Biologicals	NBP1-33610	1:800, pH 9
humán KRT17	nyúl, poliklonális	Abcam	ab53707	1:200, pH 9
humán TNF α	egér, monoklonális	Sigma-Aldrich	SAB1404480-100UG	1:600, pH 9
humán CD4	nyúl, monoklonális	Abcam	ab133616	1:500, pH 9
humán CD11c	nyúl, monoklonális	Abcam	ab52632	1:100, pH 6
humán CD83	egér, monoklonális	Abcam	ab123494	1:450, pH 9
humán CD163	egér, monoklonális	LifeSpan Bioscience	LS-B7224-250	1:75, pH 6
humán IL-10	egér, monoklonális	Covalab	mab30207	1:300, pH 9
humán AHR	nyúl, poliklonális	Sigma-Aldrich	HPA029723	1:75, pH 6
humán TSLP	nyúl, poliklonális	Abcam	ab47943	1:600, pH 6
humán filaggrin	egér, monoklonális	Abcam	ab17808	1:150, pH 6

Ezt követően az anti-egér/anti-nyúl HRP-konjugált másodlagos antitestet (Dako) 15 percig, nedves kamrában a gyártó ajánlásának megfelelően használtuk. Az antitestekkel való jelölések előtt és után a mintákat TBST mosó pufferrel háromszor mostuk 5 percen keresztül. A fehérje jelenlétére utaló jelet Vector® VIP és ImmPACT™ NovaRED™ Kit (VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA) használatával detektáltuk. A háttérfestés metil-zöld oldattal történt.

Annak érdekében, hogy a különböző bőrterületek mintáiban egy adott fehérje mennyiségét össze tudjuk hasonlítani, a jelölés idejét standardizáltuk. Egy fehérje jelölését minden esetben egymással parallel, ugyanabban az időben végeztük. Minden fehérje jelölés alkalmával a normalizálást pozitív, negatív és izotípus kontroll használata mellett végeztük [egér és nyúl IgG (Covalab), nyúl immunoglobulin frakció (Dako)].

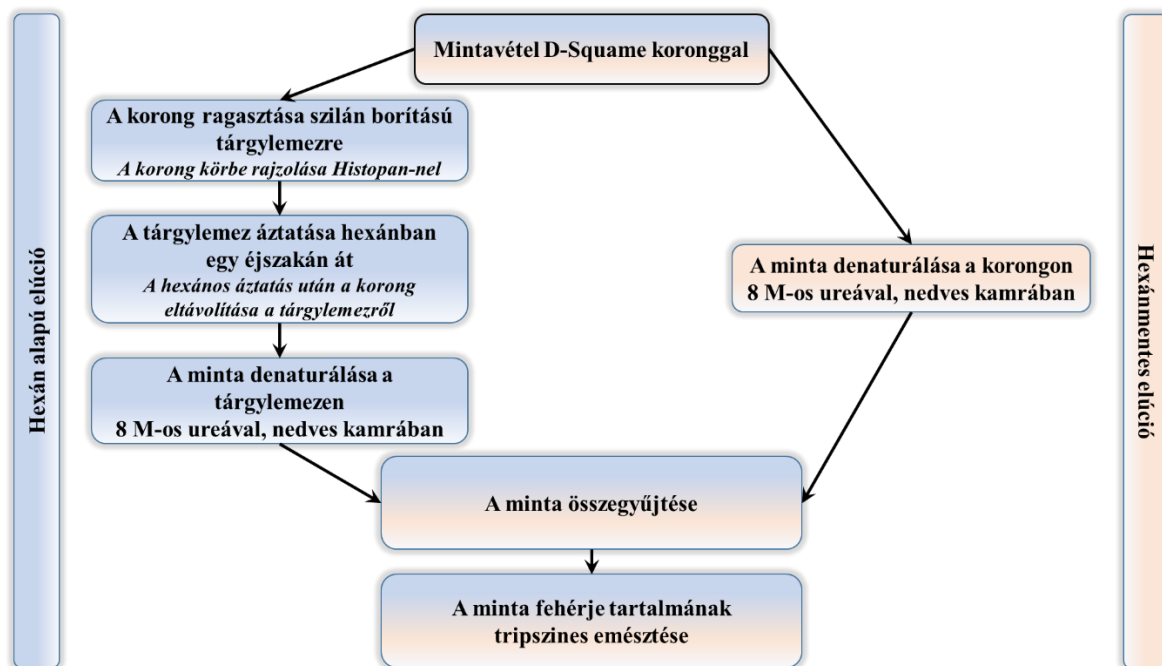
4. A stratum corneum eltávolítása a bőrfelszínéről

A SC-t az irodalomban leírt, bőrgyógyászati mintavételre kifejlesztett D-Squame korongok segítségével gyűjtöttük be a bőrfelszínről tape stripping módszerrel. A mintavétel standardizálásához fontos volt, hogy a mintavételt minden esetben azonos személy végezte, púdermentes latex kesztyű használatával. A mintaadók a mintavétel előtt 24 órával nem mosták meg detergensekkel a mintavétel helyét, nem használtak semmilyen kozmetikumot. Közvetlenül a mintavétel előtt a bőrfelszínt nem tisztítottuk le alkoholos fertőtlenítővel. A D-Squame korongokat 10 másodpercig, közepes erővel nyomtuk a bőr felszínére. Ezt követően a SC-ot tartalmazó korongokat nedves kamrában, szobahőmérsékleten tároltuk a minta feldolgozásáig, ami minden esetben a mintavétel napján megtörtént.

5. A stratum corneum fehérjetartalmának elúciója a D-Squame korongokról

Korábbi irodalmi adatok alapján a tape stripping technikával eltávolított fehérjéket hexán alapú módszerrel nyerték ki a korongok felszínéről [7][106]. Ezt a módszert használva a korongokat szilán borítású tárgylemezekre (Sigma-Aldrich Kft.) ragasztottuk, majd egy éjszakán át, szobahőmérsékleten hexánban áztattuk. A metszeteket 8 M-os ureában denaturáltuk 30 percig, szobahőmérsékleten, nedves kamrában (**9. ábra**).

A SC-ból kinyerhető AMP mennyiségének növelése érdekében a hexán alapú extrakciós módszert a következők szerint módosítottuk. A D-Squame korongokat a bőr felszínéről való eltávolítása után nedves kamrába helyeztük úgy, hogy a korong mintát tartalmazó oldala felfelé nézzen, majd közvetlenül a korongra helyeztük a 8 M-os ureát, ami denaturálta a fehérjéket (**9. ábra**).



9. ábra A hexán és hexánmentes elúciós módszerek munkamenete

6. A stratum corneum fehérjekoncentrációjának meghatározása

A SC korong fehérje tartalmát 10 ml 0.1%-os SDS oldatban 2 percig szonikáltuk, majd 10 percig 5500 rpm-en, 4 °C-on centrifugáltuk. A minták beszáritása után 2 ml Milli-Q vízben oldottuk vissza.

A fehérje koncentrációk meghatározásához a Pierce BCA Protein Assay Kit-et (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts) használtuk a gyártó által meghatározott protokollt követve 96 lyukú mikrotiter lemezen. Negatív kontrollként a 0.1%-os SDS oldat szolgált. A fehérjetartalmat 570 nm hullámhosszon mértük le a Labsystem Multiskan MS spektrofotométer segítségével (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts).

7. A stratum corneum fehérjetartalmának proteolitikus emésztése

A tripszines emésztés előtt a fehérjék redukciója 10 mM-os ditiotreitollal történt 1 órán át 37 °C-on. Ezt követően 20 mM-os jódcetamid oldattal alkiláltuk 45 percig szobahőmérsékleten, sötétben. A tripszin hozzáadása előtt az oldat urea tartalmát 1 M koncentrációra hígítottuk 25 mM-os ammónium-bikarbonát oldattal. A fehérjéket 37 °C-on egy éjszakán át emésztettük stabilizált, MS tisztaságú TPCK vizsgált szarvasmarha tripszinnel

(Sigma-Aldrich Kft.). A tripszin:fehérje arány 1:25 volt. Emésztés után a mintákat vákuum koncentrátorban (ThermoScientific) beszárítottuk, majd 100 µl 1 %-os hangyasavban (VWR International Kft.) visszaoldottuk.

A minták sómentesítése C18-as PierceTip hegygel (ThermoScience) történt. Az eluátumokat beszárítás után -20 °C-on tároltuk a tömegspektrometriás analízisig. Mérés előtt a peptideket 10 µl 1 %-os hangyasavban oldottuk vissza.

8. A PRM assay tervezés

A PRM assay tervezéséhez 13 AMP 18 aminosav szekvenciáját (**9. táblázat**) választottuk ki az UniProt adatbázisból (www.uniprot.org). A kiválasztott fehérjéről korábbi vizsgálataink, valamint irodalmi adatok alapján megállapítottuk, hogy alkalmasak az egészséges bőr és gyulladásos bőrbetegségek jellemzésére.

A fehérjék aminosav szekvenciáit az UniProt adatbázisból letöltöttük, és az ExPaSy PeptideCutter szoftver (https://web.expasy.org/peptide_cutter/) segítségével in silico tripszines hasítást végeztünk. A 100% hasítási valószínűséggel keletkező 5-14 aminosav hosszúságú triptikus peptid szekvenciákkal BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) analízist végeztünk az NCBI nem redundáns fehérje szekvencia adatbázisban, és azonosítottuk az egyedi, fehérje-specifikus peptideket. A keresés eredményeként kapott fehérje specifikus peptideket használtuk a PRM alapú tömegspektrometriás analízishez. A kiválasztott peptidek stabil izotóppal jelölt (SIL) szintetikus formáit a JPT Peptide Technologies GmbH-től (Németország) szereztük be és a későbbiekben minőségi és kvantitálási kontrollként használtuk.

9. Tömegspektrometriás vizsgálat

A tripszinnel emésztett SC minták tömegspektrometriás vizsgálatát randomizálás után duplikátumban végeztük el azonos mérési feltételek mellett. A tömegspektrometriás analízis előtt minden mintához a korábbi beállításoknak megfelelő SIL peptid-mennyiséget adtuk.

A PRM analíziseket Orbitrap Fusion tömegspektrométeren (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) végeztük el, a kromatográfiás elválasztást az Easy nLC1200 nanoUPLC (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) készülék biztosította.

A peptidek 60 perces víz-acetonitril gradiens alkalmazásával 300 nl/perc áramlási sebességgel voltak elválasztva Acclaim PepMap C18 (20 mm x 75 µm, 3 µm részecskeméret, 100 Å pórusátmérő, Thermo Scientific) segítségével egy Acclaim PepMap RSLC (150 mm x 50 µm, 2 µm részecskeméret, 100 Å pórusátmérő, Thermo Scientific) előtétoszlopon történt sómentesítés után. Az 'A' puffer LC minőségű víz volt 0,1 % hangyasavval (VWR), míg a 'B' puffer LC minőségű acetonitril 0,1 % hangyasavval. A elválasztás során a 'B' puffer aránya 5 % -ról 20 % -ra nőtt 5 perc alatt, majd 45 % -os emelkedés következett be 40 perc alatt. Ezután a 'B' puffer aránya 3 perc alatt 85 % -ra lett növelve, majd 5 percig 85 % -on lett tartva. Ezután a 'B' puffer arány 1 perc alatt 5% -ra csökkent és ezen a szinten volt tartva 6 percen keresztül.

A PRM analíziseket célzott MS2 módban végeztük el. A prekursor ionok kiválasztását követően 30 % normalizált CID energiával fragmentáltuk a peptideket, majd a fragmens ionokat az Orbitrap analizátorban (50000 felbontás, AGC cél: 1,0e4, centroid mód) regisztráltuk 114-1000 m/z tartományban.

10. Az adatok kiértékelése, statisztikai analízise

A teljes bőr IHC és RT-qPCR vizsgálatát legalább két ismétlésben és biológiai triplikátumban végeztük el. A statisztikai számításokhoz a GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) és az Excel szoftvert használtunk. A statisztikai szignifikanciát az ANOVA egyirányú variancia analízisével, a Newman-Keuls post hoc teszt használatával számítottuk ki (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001). A grafikonokon a 95 %-os konfidencia intervallum alsó és felső értékét, valamint az átlagértékeket ábrázoltuk, amit a Panoramic Viewer szoftverrel értékeltünk ki.

A SC fehérjéinek kvantálásához a Skyline szoftvert használtuk [109]. Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk meg az adatok normalitását. Mivel az adatok nem követték a normál eloszlást, a vizsgált három csoportot a Kruskal-Wallis próbával hasonlítottuk össze Dunn's post hoc teszt segítségével. A statisztikai analízist a GraphPad Prism 8.0.1 szoftverrel végeztük el (GraphPad Software, San Diego, CA). Az adatokat átlagban \pm SEM ábrázoltuk. A különbségeket abban az esetben tekintettük szignifikánsnak, ha a p-érték kisebb volt 0,05-nél (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Eredmények

1. Az egészséges nedves bőr immunkörnyezete és annak megváltozása hidradenitisz szuppuratívában

Mivel munkacsoportunk korábbi vizsgálatainak során kimutatta, hogy a faggyúmirigyekben gazdag bőrt eltérő immun és permeabilitási barrier sajátosságok jellemzik, mint a mirigyekben szegény bőrrégiókat, így jelen munkánk során először a harmadik bőrrégiókat, az apokrin mirigyekben gazdag, nedves bőr jellegzetességeinek vizsgálatát tűztük ki célul, majd azt vizsgáltuk, hogy az AGR bőr immunkarakterisztikája fogékony-e ezen területeket egy IL-17 mediálta gyulladás kialakulására.

1.1. Immunsejtek vizsgálata nedves bőrben és hidradenitisz szuppuratívában

Az AGR bőrterület sejtes összetételét elsőként a GP bőrterülethez hasonlítottuk. Fehérjeszintű vizsgálataink azt mutatták, hogy az egészséges AGR bőrterületen a CD11c⁺ DC-k és a CD4⁺ T-sejtek szignifikánsan nagyobb számban voltak jelen az egészséges GP bőrterülethez hasonlítva, míg a LC-k (CD1a⁺) és a makrofágok (CD163⁺) számában nem detektáltunk szignifikáns különbséget a két bőrrégió között. Vizsgáltuk a DC-k érési és aktivációs markereinek (CD80, CD83 és CD86) expresszióját is (gén és/vagy fehérje szinten), amelyek a vizsgálatok többségében nem mutattak jelentős különbséget a két egészséges bőrrégió között (**6. táblázat, 10. ábra**).

Egészséges nedves bőr és léziós HS bőrminták fehérje szinten történő összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy a HS bőrmintákban a CD11c⁺ DC-k és a CD4⁺ T-sejtek száma szignifikánsan tovább nőtt az AGR bőrmintákhoz képest, a DC-k aktivált állapotba kerültek, valamint szignifikáns mennyiségű CD163⁺ makrofág jelent meg. A DC-k magasabb aktiváltsági fokát a génexpressziós vizsgálatok is alátámasztották (**6. táblázat, 10. ábra**).

6. táblázat. Sejtes elemek számának és aktiváltságának összehasonlítása a mirigyekben szegény, az apokrin mirigyekben gazdag, valamint a HS-ás bőrben¹.

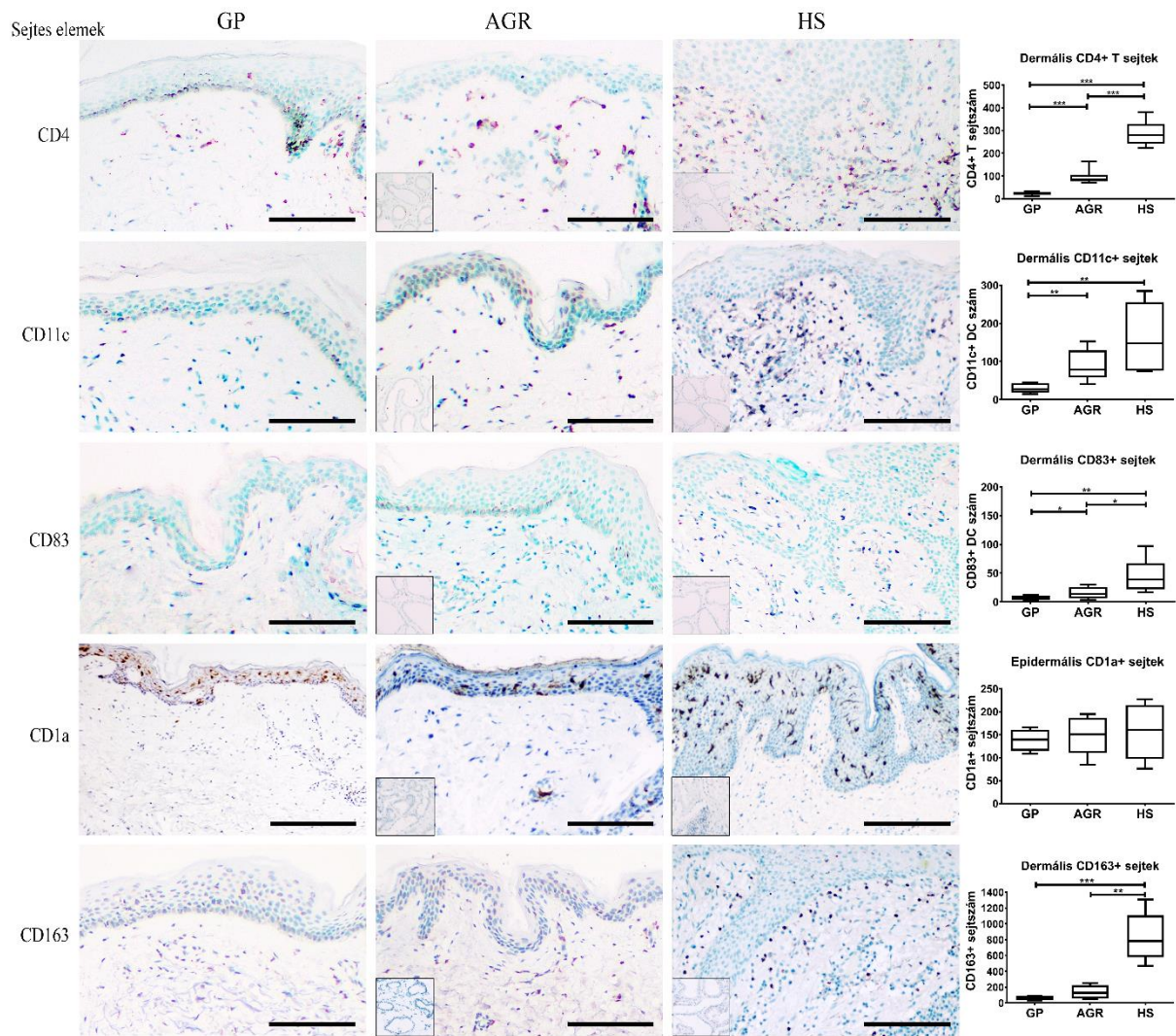
Változók	AGR vs GP					HS vs AGR				
	RT-qPCR		IHC			RT-qPCR		IHC		
	p-érték ¹	AGR/ GP (FC) ²	p-érték ¹	AGR/ GP (FC) ²	Ref. ³	p-érték ¹	HS/ AGR (FC) ²	p-érték ¹	HS/ AGR (FC) ²	Ref. ³
Sejtes elemek										
CD4 ⁺ T-sejtek	nr	nr	<0.0001	4.02↑	#	nr	nr	<0.0001	3.02↑	[110]– [112]
CD11c ⁺ DC-k	nr	nr	0.001	2.99↑	#	nr	nr	0.038	1.74↑	[110] [111]
CD80 ⁺ sejtek	0.825	0.83	nr	nr	#	0.018	18.39 ↑	nr	nr	#
CD83 ⁺ sejtek	0.714	1.26	0.020	2.25↑	#	0.008	2.26↑	0.003	2.90↑	#
CD86 ⁺ sejtek	0.683	0.70	nr	nr	#	0.004	2.94↑	nr	nr	#
CD1a ⁺ DC-k	nr	nr	0.286	1.06	#	nr	nr	0.302	1.10	#
CD163 ⁺ sejtek	nr	nr	0.111	2.12	#	nr	nr	0.004	6.02↑	[113]

GP - apokrin és faggyúmirigyben szegény, AGR – apokrin mirigyben gazdag, DC – dendritikus sejt, FC – fold change, HS – hidradenitisz szuppurativa, IHC – immunohisztokémia, nr – nem releváns, RT-qPCR – kvantitatív real-time PCR, Th – T helper, DLA - detektálási limit alatt.

¹A fehérje és az mRNS szintek közötti statisztikai analízist ANOVA egyirányú variancia analízis használatával végeztük el Newman-Keuls post hoc teszt segítségével. A félkövér betűtípussal írt adatok a szignifikáns különbséget jelzik.

²A nyílak a szignifikáns változás irányát mutatják.

³#Azokat az adatokat jelzi, melyeket jelenlegi tudásunk szerint nem közöltek korábban. Minden molekula esetén, mindegyik csoportban 8-8 mintát vizsgáltunk. A számok azokat a referenciák között megtalálható publikációkat jelzik, melyek az adott molekulával kapcsolatban korábban megjelentek HS esetén.



10. ábra. A sejtes komponensek immunfestésének és kvantifikálásának reprezentatív ábrái GP, AGR és HS bőrmintákban. Minden molekulát, minden csoportban 8-8 mintán vizsgáltunk. A sejtszámok analizését vakon végeztük a Panoramic Viewer szoftver használatával. A jobb alsó sarokban lévő méretvonalak mérete = 100 μ m. Az AGR és HS képek bal alsó sarkában az apokrin mirigyek képei láthatók. A grafikonok a Panoramic Viewer segítségével meghatározott fehérjék mennyiségét ábrázolja, ahol a boksok a 95%-os konfidencia intervallum alsó és felső értékét, valamint az átlagértéket mutatják (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, amit ANOVA egyirányú variancia analízissel, Newman-Keuls post hoc teszt segítségével határoztunk meg). ANOVA – variancia analízis, GP – apokrin és faggyúmirigyekben szegény, AGR – apokrin mirigyekben gazdag, DC – dendritikus sejt, HS – hidradenitisz szuppurativa.

1.2. A T-sejt altípusokhoz köthető komponensek

Következő lépésként a különböző T-sejt altípusokhoz köthető citokinek és transzkripciós faktorok expresszióját vizsgáltuk. IHC vizsgálataink alapján elmondható, hogy az IL-17⁺ és IL10⁺ sejtek szignifikánsan nagyobb számban jelentek meg az egészséges AGR bőrterületen a GP bőrrégióhoz képest, sőt ez utóbbi régióban ezek a sejtek majdnem teljesen hiányoztak.

Kvantitatív RT-qPCR módszerrel a fent említett T-sejtekhez kapcsolódó faktorok expressziója nem mutatott szignifikáns különbséget a vizsgált egészséges bőrrégiók (AGR, GP) között (7. táblázat, 11. ábra).

7. táblázat. Az adaptív immunválasz komponenseihez köthető molekulák expressziós szintjeinek összehasonlítása a mirigyekben szegény, az apokrin mirigyekben gazdag, valamint a HS-ás bőrben.

Változók	AGR vs GP					HS vs AGR				
	RT-qPCR		IHC		Ref. ³	RT-qPCR		IHC		Ref. ³
	p-érték ¹	AGR/ GP (FC) ²	p-érték ¹	AGR/ GP (FC) ²		p-érték ¹	HS/ AGR (FC) ²	p- érték ¹	HS/ AGR (FC) ²	
Th17 immunválaszhoz kapcsolódó faktorok										
IL-17A	0.191	0.61	0.0003	GP- ben DLA	#	<0.0001	167.45 ↑	0.001	4.98 ↑	[108]–[110] [112]
IL-10	0.322	0.72	0.0003	2.31 ↑	#	0.111	2.26	<0.00 01	4.8 ↑	[109][110] [113][114]
IL-1B	0.786	2.33	nr	nr	#	0.032	40.24 ↑	nr	nr	[109][114]
IL-6	0.333	1.01	nr	nr	#	0.206	1.66	nr	nr	[110][113]
IL-23A	0.481	1.22	nr	nr	#	0.001	3.43 ↑	nr	nr	[110]
TGFB1	0.206	0.71	nr	nr	#	0.016	2.61 ↑	nr	nr	[115]
RORC	0.095	0.82	nr	nr	#	0.056	0.43	nr	nr	#
Th1 immunválaszhoz kapcsolódó faktorok										
IL-12B	0.500	GP-ben DLA	nr	nr	#	0.036	8.26 ↑	nr	nr	[109][110]
TBX21	0.536	0.74	nr	nr	#	0.016	6.18 ↑	nr	nr	#
IFNG	0.600	0.85	0.005	GP- ben DLA	#	0.267	7.63	0.005	11.01 ↑	[109][110] [112][114]
TNFA ⁺	0.222	0.62	0.083	GP- ben DLA	#	0.016	1.90 ↑	0.001	22.61 ↑	[111][114]– [116]
Th2 immunválaszhoz kapcsolódó faktorok										
IL-13	DLA	DLA	0.142	2.12	#	DLA	DLA	0.143	1.47	[110][117]
GATA3	0.222	0.65	nr	nr	#	0.008	0.24	nr	nr	#
Th-22 immunválaszhoz kapcsolódó faktorok										
IL-22	DLA	DLA	nr	nr	#	0.050	AGR- ben DLA	nr	nr	[109][112]
AHR	0.155	1.59	0.44	0.74	#	0.004	3.97 ↑	0.13	0.51	#
Treg immunválaszhoz kapcsolódó faktorok										
FOXP3	>0.999	1.12	nr	nr	#	0.229	1.57	nr	nr	[120]
CCR4	>0.999	1.10	nr	nr	#	0.032	4.32	nr	nr	#
CCR8	0.714	0.70	nr	nr	#	0.802	0.90	nr	nr	#

GP - apokrin és faggyúmirigyekben szegény, AGR – apokrin mirigyekben gazdag, FC – fold change, HS – hidradenitisz szuppurativa, IHC – immunohisztokémia, nr – nem releváns, RT-qPCR – kvantitatív real-time PCR, Th – T helper, TGFB – 'transforming growth' faktor – β, TNFA – tumor nekrozis faktor – α, Treg – regulátor T-sejt, DLA - detektálási limit alatt.

¹A fehérje és az mRNS szintek közötti statisztikai analízist az ANOVA egyirányú variancia analízis használatával végeztük el Newman-Keuls post hoc teszt segítségével. A félkövér betűtípussal írt adatok a szignifikáns különbséget jelzik.

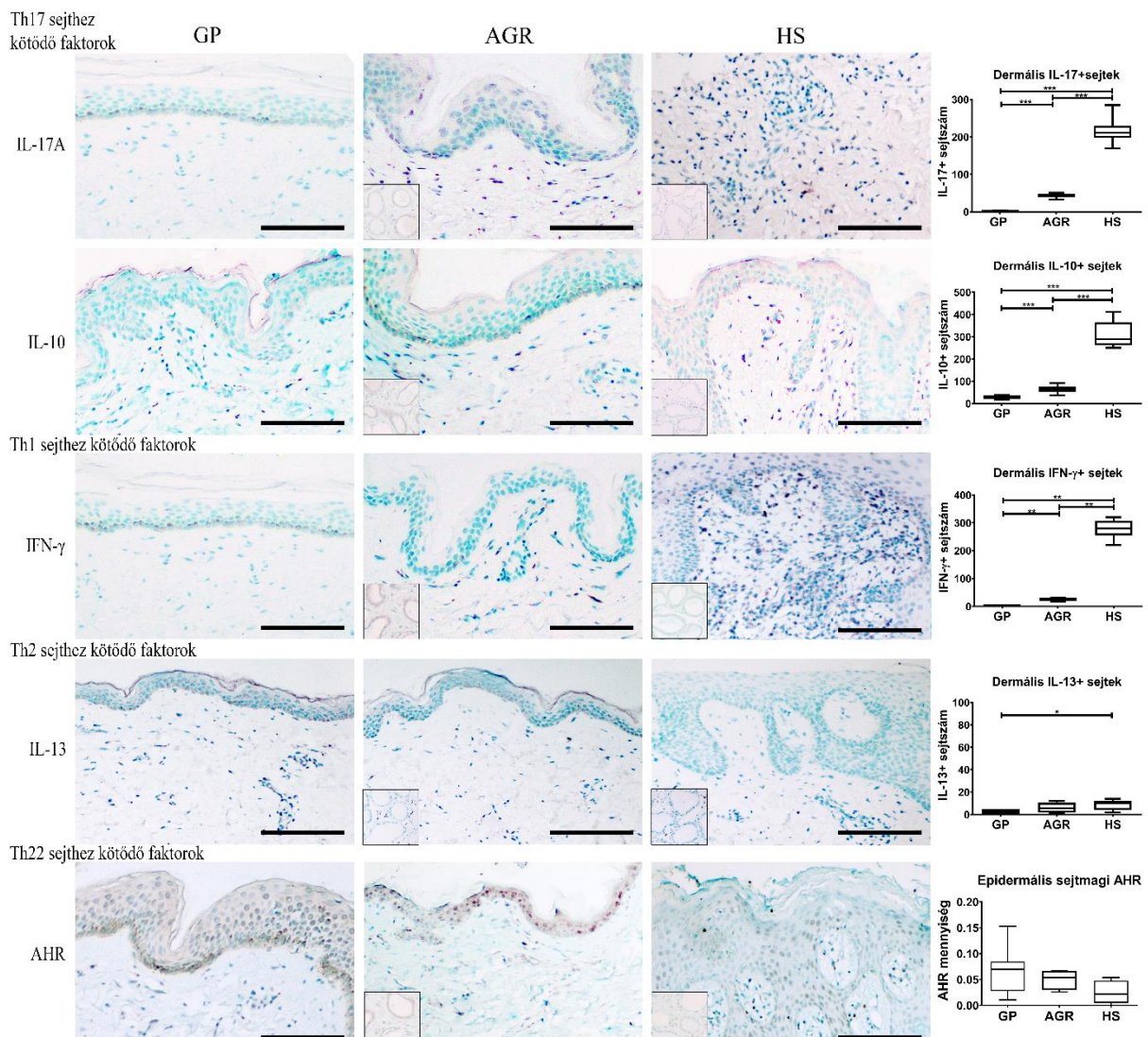
²A nyílak a szignifikáns változás irányát mutatják.

³#Azokat az adatokat jelzi, melyeket jelenlegi tudásunk szerint nem közöltek korábban. Minden molekula esetén 8-8 mintát vizsgáltunk mindegyik csoportban. A számok azokat a referenciák között megtalálható publikációkat jelzik, melyek az adott molekulával kapcsolatban korábban megjelentek HS esetén.

⁴IL-17-hez kapcsolódó faktorok.

Az IL-17⁺/IL-10⁺ sejteken túl néhány IFN- γ ⁺ sejtet is azonosítottunk az AGR bőrterületeken IHC vizsgálattal, míg GP bőrben ez a sejtípus nem volt detektálható (7. táblázat, 11. ábra). Th2, Th22 és Treg sejtekhez köthető molekulák tekintetében nem találtunk jelentős eltéréseket a két egészséges bőrrégió között.

Egészséges AGR és léziós HS minták összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy a Th17 sejtekhez köthető molekulák (IL-1 β , IL-17A, IL-23A, TGF- β), valamint a Th1 sejteket jellemző faktorok (IL-12B, TBX21, TNF- α) géneexpressziós szintje szignifikánsan magasabb volt HS bőrben, mint az egészséges AGR bőrben. Ráadásul IHC vizsgálataink azt mutatták, hogy az IL-17⁺, IL-10⁺ sejtek száma szignifikánsan tovább növekedett és nagy mennyiségű TNF- α ⁺ és az IFN- γ ⁺ sejt jelent meg a HS-ás bőrmintákban az egészséges AGR bőrterületekhez képest (7. táblázat, 11. ábra).



11. ábra. A különböző Th alcsoportokhoz kötődő komponensek immunfestésének és kvantifikálásának reprezentatív ábrái GP, AGR és HS bőrmintákban. Minden molekulát, minden csoportban 8-8 mintán vizsgáltunk. A sejtszámok analízisét vakon végeztük a Panoramic Viewer szoftver használatával. A kép jobb alsó sarkában lévő méretvonalak mérete = 100 μm . Az AGR és HS képek bal alsó sarkában az apokrin mirigyek képei láthatóak. A grafikonok a Panoramic Viewer segítségével meghatározott fehérje mennyiségét ábrázolják. A boksok a 95%-os konfidencia intervallum alsó és felső értékét, valamint az átlagértéket mutatják (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, melyet ANOVA egyirányú variancia analízissel határoztunk meg, Newman-Keuls post hoc tesztet segítségével). AHR – aril-hidrokarbon receptor, GP – apokrin és faggyúmirigyekben szegény, AGR – apokrin mirigyekben gazdag, ANOVA – variancia analízis, HS – hidradenitisz szuppurativa, IFN- γ – interferon gamma, IL – interleukin.

1.3. A Th17 sejtekhez köthető komponensek

Vizsgálataink következő részében a bőr immunstátuszát meghatározó kemokinek, AMP-k, barrier és proinflammatorikus molekulák jelenlétét vizsgáltuk meg AGR, GP és léziós HS bőrben.

Összehasonlítva az egészséges AGR bőrterületet a GP bőrterülettel, csak néhány esetben tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Génexpressziós szinten a KRT79, fehérje szinten a kemokinek közül a CCL2, CCL20, AMP-k közül a TSLP, LCN2, valamint a FLG, mint a bőrbarrier egyik jellemző molekulája mutatott szignifikáns eltérést AGR bőrben GP bőrhöz képest (**8. táblázat, 12. ábra**).

A léziós HS és az AGR bőrmintákat összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a HS bőrmintákban a CCL3, CCL19, CCL20, CCL23 kemokinek, a DEFB4B, S100A7, S100A8, S100A9 és a LCN2 AMP-k, valamint a KRT17 barrier molekula génexpressziós szintje szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges AGR bőrben. A Th17-hez kötődő kemokinek közül a CCL2, CCL20, az AMP-k közül az S100A8, LCN2 és a barrier molekulák közül a KRT17 szignifikánsan emelkedett mennyisége fehérje szinten is kimutatható volt, míg a LOR molekula fehérje mennyisége szignifikánsan csökkent a HS bőrben az AGR mintához képest. Mindez azt jelzi, hogy a HS léziós bőrben az IL-17 által szabályozott immunválasz van jelen (**8. táblázat, 12. ábra**).

8. táblázat. A Th17-hez köthető komponensek expressziós szintjeinek összehasonlítása a mirigyekben szegény, az apokrin mirigyekben gazdag, valamint a HS-ás bőrben¹.

Változók	AGR vs GP					HS vs AGR				
	RT-qPCR		IHC			RT-qPCR		IHC		
	p-érték ¹	AGR/ GP (FC) ²	p- érték ¹	AGR/ GP (FC) ²	Ref. ³	p- érték ¹	HS/ AGR (FC) ²	p- érték ¹	HS/AGR (FC) ²	Ref. ³
Kemokinek										
CCL2 ⁺	0.714	1.37	0.004	5.08 ↑	#	0.222	1.59	0.012	4.64 ↑	#
CCL20 ⁺	0.857	0.73	0.004	2.4 ↑	#	0.016	3.89 ↑	0.004	6.79 ↑	[114]
CCL3	0.714	0.66	nr	nr	#	0.016	15.94 ↑	nr	nr	#
CCL19	0.857	0.82	nr	nr	#	0.029	4.05 ↑	nr	nr	#
CCL23	0.413	1.23	nr	nr	#	0.016	2.36 ↑	nr	nr	#
CCL24	0.250	2.69	nr	nr	#	0.571	1.59	nr	nr	#
Antimikrobiális peptidek										
TSLP	0.397	0.84	0.006	331.56 ↑	#	0.437	.091	0.179	1.24	#
S100A7 ⁺	0.413	1.06	nr	nr	#	0.016	27.62 ↑	nr	nr	[109] [116] [119]
S100A8 ⁺	0.667	1.21	0.171	2.34	#	0.016	30.75 ↑	0.029	5.82 ↑	[109] [119] [120]
S100A9 ⁺	0.413	1.70	nr	nr	#	0.016	28.38 ↑	nr	nr	[109] [119] [120]
DEFB4B ⁺	0.571	2.02	nr	nr	#	0.016	113.67 ↑	nr	nr	[113] [115] [119]
LCN2 ⁺	0.310	3.87	0.004	1.38 ↑	#	0.008	7.13 ↑	0.018	6.4 ↑	[123]
Barrier molekulák										
LOR ⁺	0.825	1.02	0.518	0.74	#	0.310	0.69	0.036	0.7 ↓	#
FLG ⁺	0.110	1.68	0.037	0.8 ↓	#	0.395	2.99	0.095	1.60	#
CLDN1	0.679	1.31	nr	nr	#	0.310	0.67	nr	nr	#
KRT17 ⁺	0.262	1.10	0.329	1.14	#	0.009	2.94 ↑	0.008	5.62 ↑	[122] [123]
KRT79	0.036	14.55 ↑	nr	nr	#	0.222	0.44	nr	nr	#
Proinflammatorikus molekulák										
TLR2	0.825	1.25	nr	nr	#	0.048	5.16 ↑	nr	nr	[111] [113]
TLR4	>0.999	0.88	nr	nr	#	0.018	3.38 ↑	nr	nr	[115]
NLRP3	0.191	0.91	nr	nr	#	0.071	4.21	nr	nr	[122]
IL-1B ⁺	0.786	2.33	nr	nr	#	0.032	40.24 ↑	nr	nr	[109] [114]
TNFA ⁺	0.222	0.62	0.083	GP-ben DLA	#	0.016	1.89 ↑	0.001	22.61 ↑	[111] [114]– [116]

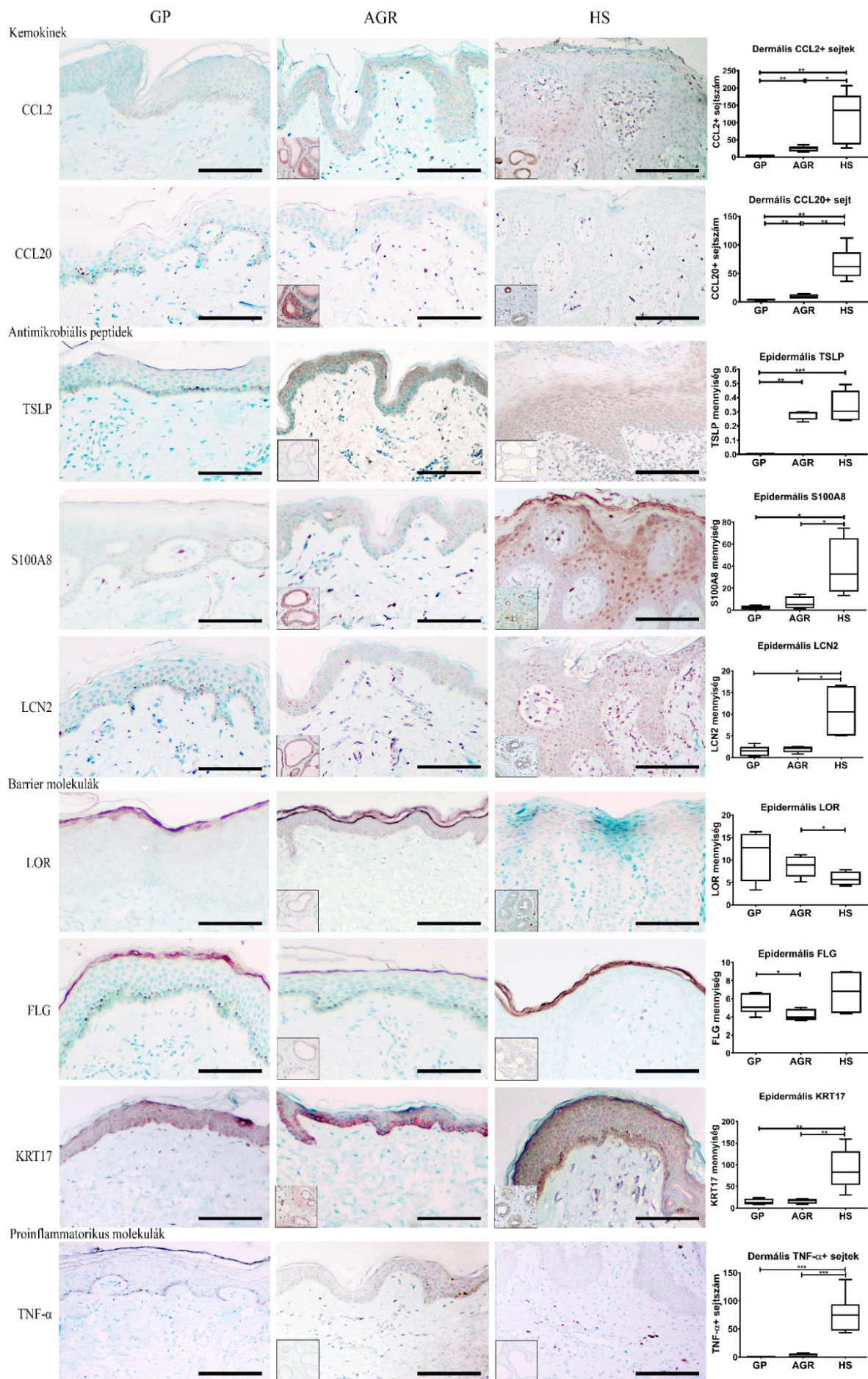
GP - apokrin és faggyúmirigyekben szegény, AGR – apokrin mirigyekben gazdag, CCL – kemokin (C-C motívum) ligand, FC – fold change, HS – hidradenitisz szuppurativa, IHC – immunohisztokémia, nr – nem releváns, RT-qPCR – kvantitatív real-time PCR, Th – T helper sejt, TLR – toll-szerű receptor, TNFA – tumor nekrozis faktor – α , DLA - detektálási limit alatt.

¹A fehérje és az mRNS szintek közötti statisztikai analízist az ANOVA egyirányú variancia analízis használatával végeztük el Newman-Keuls post hoc teszt segítségével. A félkövér betűtípussal írt adatok a szignifikáns különbséget jelzik.

²A nyílak a szignifikáns változás irányát mutatják.

³#Azokat az adatokat jelzi, melyeket jelenlegi tudásunk szerint nem közöltek korábban. Minden molekula esetén 8-8 mintát vizsgáltunk mindegyik csoportban. A számok azokat a referenciák között megtalálható publikációkat jelzik, melyek az adott molekulával kapcsolatban korábban megjelentek HS esetén.

⁴IL-17-hez kapcsolódó faktorok.



12. ábra. A Th17 sejthez köthető kemokinek, AMP-k, barrier és proinflammatorikus molekulák immunfestésének és kvantifikálásának reprezentatív ábrái GP, AGR és HS bőrmintákban. Minden molekulát, minden csoportban 8-8 mintán vizsgáltunk meg. A sejtszámok analízisét vakon végeztem a Panoramic Viewer szoftver használatával. A kép jobb alsó sarkában lévő méretvonalak mérete = 100 μ m. Az AGR és HS képek bal alsó sarkában az apokrin mirigyek képei láthatóak. A grafikonok a Panoramic Viewer segítségével meghatározott fehérje mennyiségét ábrázolják. A boksok a 95%-os konfidencia intervallum alsó és felső értékét, valamint az átlagértéket mutatják (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, melyet az ANOVA egyirányú variancia analízisével határoztunk meg, Newman-Keuls post hoc teszt segítségével). GP – apokrin és faggyúmirigyekben szegény, AGR – apokrin mirigyekben gazdag, AMP – antimikrobiális peptid, ANOVA – variancia analízis, CCL – kemokin (C-C motívum) ligand, FLG – filaggrin, HS – hidradenitisz szuppurativa, KRT – keratin, LCN – lipokalin, LOR – lorikrin, TNF- α – tumor nekrozis faktor alfa, TSLP – thymic stromal lymphopietin.

A proinflammatorikus molekulák vizsgálata során megállapítható, hogy sem fehérje, sem génexpressziós szinten nem tapasztalható jelentős eltérés az egészséges GP és az AGR bőrrégió között, HS bőrben mennyiségük szignifikánsan megemelkedett (**8. táblázat, 12. ábra**).

A TLR2, TLR4, NLRP3, IL-1 β és a TNF- α komponensek fehérje és génexpressziós szinten egészséges AGR és GP bőrben alacsonynak mutatkoztak, míg HS bőrben szignifikánsan nagyobb mennyiségben voltak jelen az AGR bőrrégióval összehasonlítva (**8. táblázat, 12. ábra**).

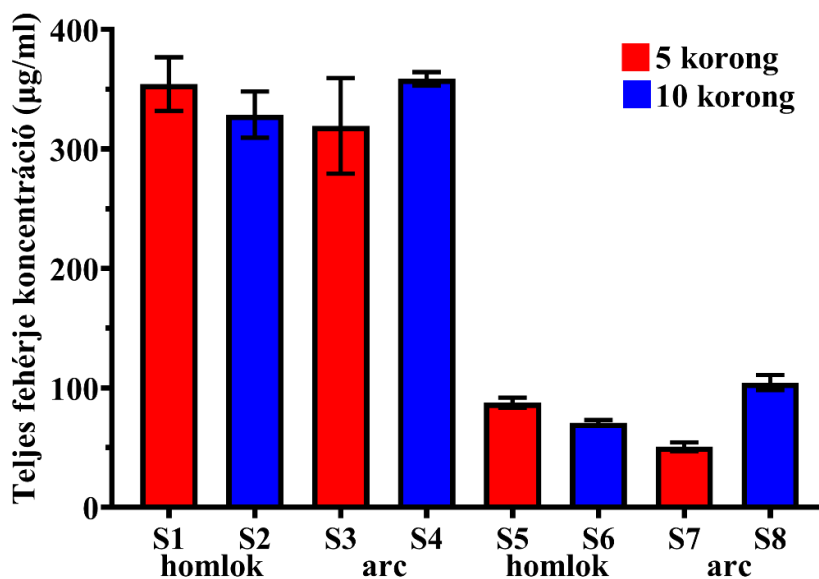
2. Egészséges bőrrégiók stratum corneumának vizsgálata tömegspektrometriás módszerrel

2.1. Az AMP tartalom vizsgálatához szükséges módszer optimalizálása

Második kutatási projektünk célja a különböző bőrrégiók SC-ban jelen levő AMP-k azonosítása, expressziójuk összehasonlítása. A SC AMP tartalmának meghatározásához vizsgálataink első részében optimalizáltuk a minta gyűjtését, a fehérje kinyerésének metodikáját és az PRM alapú tömegspektrometriás módszert egészséges, valamint gyulladt bőrben. A fehérjét speciális D-Sqame adhéziós koronggal gyűjtöttük be az egészséges, kezeletlen és tisztítatlan bőrfelszínről. A SC mintákat egészséges egyének homlokáról, valamint arcáról gyűjtük.

2.1.1 A mintagyűjtés optimalizálása

A SC-ról D-Squame koronggal eltávolítható fehérje mennyisége korlátozott. Annak érdekében, hogy a legnagyobb mennyiségű fehérjét tudjuk kinyerni, első lépésben résztvevőnként 5 vagy 10 korongot használtunk fel, hogy meghatározzuk a kinyert fehérje mennyiségének és a mintavételhez alkalmazott korongok számának összefüggését. Minden korongot az adott bőrrégióon belül különböző területre ragasztottuk, majd a minták teljes fehérje koncentrációját az 5 vagy 10 korong fehérje tartalmának egybegyűjtése után mértük meg (13. ábra).



13. ábra. A homlokról és arcról gyűjtött SC minták teljes fehérje koncentrációja. Az 'y' tengely a fehérje koncentrációt mutatja µg/ml-ben, míg az 'x' tengely két egyén (S1-S4 és S5-S8) mintáit. Az oszlopok az átlag ± SEM értéket ábrázolják. A piros oszlopok az 5 korongról, míg a kék oszlopok a 10 korongról származó fehérje koncentrációt mutatják.

Az 13. ábrán megfigyelhető, hogy a SC-ból nyerhető teljes fehérje mennyisége inkább egyénekre specifikus tulajdonság, nem függ attól, hogy melyik bőrrégióról vagy hány korong felhasználásával lett eltávolítva a SC.

A mintavétel során megfigyeltük, hogy ugyanarról a helyről három vagy annál több korong eltávolítása jelentős diszkomfort érzést okozott a mintaalanyoknak, ezért minden további mintavétel esetén egy régióban öt különböző helyre ragasztott korongot használtunk.

2.1.2. A PRM alapú tömegspektrometriás módszer tervezése és optimalizálása

Korábbi vizsgálataink során az egészséges bőr három különböző régióját összehasonlítva szignifikáns különbségeket detektáltunk különböző AMP-k (S100A7, S100A8, S100A9, hBD2, LCN2, valamint TSLP) expressziójában gén és/vagy fehérje szinten [1][2][5]. Jelen munkánk során a korábbi kísérleteink célmolekuláit kiegészítve az egészséges bőr egyensúlyi állapotában és gyulladt bőr mélyebb rétegeiben jelen lévő további AMP-k (hBD1, 3, 4, LL-37, LACRT, LYZ és DCD) SC-ban jelen lévő mennyiségét vizsgáltuk [57][85][124][125].

A kiválasztott AMP-k fehérjeszekvenciáit bioinformatikai módszerekkel analizáltuk, majd azonosításra kerültek az egyedi fehérje-specifikus triptikus peptidszekvenciák. A triptikus peptidszekvenciák a fehérje triszinnel történő emésztése során kinyert fragmentumok szekvenciái. Az így kiválasztott peptidszekvenciák kerültek felhasználásra a PRM alapú tömegspektrometriás analízis során (**9. táblázat**).

A kvantitáláshoz a kiválasztott, endogén peptidok szintetikus SIL peptid megfelelőjét használtuk. A PRM adatokat a Skyline szoftver segítségével analizáltuk, majd feltöltöttük a Panoramic repozitóriumba (<https://tinyurl.com/mbbuwrw>). Amikor az endogén peptid és a szintetikus SIL peptid spektruma ugyanabban a retenciós időben azonosítható volt (koelúciót mutatott), a vizsgált peptidet azonosítottként fogadtuk el. Amennyiben az endogén peptid spektruma nem mutatott koelúciót a neki megfelelő szintetikus SIL peptid spektrumával, ki lett zárva a további analízisből. Az endogén és a szintetikus SIL peptidok arányát a Skyline szoftver segítségével határoztuk meg. Az így meghatározott arányok lettek felhasználva a vizsgálati csoportok esetében a kiválasztott AMP-k komparatív analízisére.

9. táblázat. A vizsgált fehérjék fehérje-specifikus peptidjei.

Gén név	Fehérje név	UniProt ID	Fehérje-specifikus egyedi peptid	Prekurzor ion (m/z)
S100A8	kalcium-hoz kötődő protein A8	P05109	ALNSIIDVYHK	424.903
			ALNSIIDVYHK*	427.574
S100A8	kalcium-hoz kötődő protein A8	P05109	GADVWFK	411.71
			GADVWFK*	415.718
S100A9	kalcium-hoz kötődő protein A9	P06702	DLYNFLK	456.744
			DLYNFLK*	460.752
LL-37	kathelicidin	P49913	LLGDFFR	434.239
			LLGDFFR*	439.243
DCD	dermcidin	P81605	ENAGEDPGLAR	564.767
			ENAGEDPGLAR*	569.771
hBD1	humán béta-defenzin 1	P60022	IQGTCYR	449.216
			IQGTCYR*	454.22
hBD2	humán béta-defenzin 2	O15263	GIGDPVTCLK	530.278
			GIGDPVTCLK*	534.285
hBD3	humán béta-defenzin 3	P81534	GIINTLQK	443.771
			GIINTLQK*	447.778
hBD4	humán béta-defenzin 4	Q8WTQ1	ICGYGTAR	449.216
			ICGYGTAR*	454.22
LACRT	lakritin	Q9GZZ8	QELNPLK	421.242
			QELNPLK*	425.249
LACRT	lakritin	Q9GZZ8	SILLTEQALAK	593.855
			SILLTEQALAK*	597.862
LCN2	lipokalin-2	P80188	VPLQQNFQDNQFQGK	895.944
			VPLQQNFQDNQFQGK*	899.951
LCN2	lipokalin-2	P80188	SYNVTSVLFR	593.316
			SYNVTSVLFR*	598.32
LCN2	lipokalin-2	P80188	TFVPGCQPGFTLGNIK	932.966
			TFVPGCQPGFTLGNIK*	936.973
LYZ	lizozim	P61626	GISLANWMCLAK	682.346
			GISLANWMCLAK*	686.353
LYZ	lizozim	P61626	WESGYNTR	506.727
			WESGYNTR*	511.731
S100A7	pszoriázin	P31151	SIIGMIDMFHK	646.33
			SIIGMIDMFHK*	650.337
TSLP	thymic stromal lymphopoietin	Q969D9	CLEQVSQLQGLWR	808.914
			CLEQVSQLQGLWR*	813.918

A táblázat a PRM assay-hez kiválasztott gének, fehérjék nevét, az UniProt ID-t, a fehérje-specifikus egyedi peptidek szekvenciáját, valamint a kiválasztott peptidek prekurzor ionjainak m/z értékét mutatja be. A "*" a stabil izotóppal jelölt (stabil isotope labelled, SIL) aminosavakat, az aláhúzott betű a módosított karbamidometilált ciszteineket jelöli.

Annak érdekében, hogy a SC mintákban jelen lévő konstitutív és indukált AMP-k azonosíthatóságáról megbizonyosodjunk egészséges, valamint gyulladásozós bőrbetegségben szenvedő önkéntesektől gyűjtöttünk SC mintát. Négy gyulladásozós bőrbetegségben szenvedő

beteg (HS, Ps, PPR, AD), valamint egy önkéntes egészséges résztvevő lett bevonva a vizsgálat ezen részébe (**függelék 1. táblázat**). A HS mintákat hónalji régióból, a Ps mintákat az alsó végtagról, a PPR mintákat arcról és az AD mintákat combról gyűjtöttük be, míg az egészséges kontroll minták homlokról származtak. Az SC mintákból 'AMP koktélt' készítettünk, mely pozitív kontrollként szolgált a tömegspektrometriás analízishez.

Mind egészséges, mind gyulladós bőrben sikerült detektálni az S100A8 fehérje ALNSIIDVYHK és GADVWFK peptidjét, az LCN2 fehérje VPLQQNFQDNQFQG peptidjét, a DCD fehérje ENAGEDPGLAR peptidjét, a LACRT fehérje SILLTEQALAK peptidjét és az LYZ fehérje WESGYNTR peptidjét. Az S100A9 fehérje DLYNFLK peptidje, az LL-37 fehérje LLGDDFR peptidje és a LCN2 fehérje TFVPGCQPGEFTLGNIK peptidje csak a gyulladós bőrben volt jelen. Az S100A7 fehérje SIIGMIDMFHK peptidje, a hBD1 fehérje IQGTCYR peptidje, a hBD2 fehérje GIGDPVTCLK peptidje, a hBD3 fehérje GIINTLQK peptidje, a hBD4 fehérje ICGYGTAR peptidje, a LCN2 fehérje SYNVTSVLFR peptidje, a TSLP fehérje CLEQVSQLQGLWR peptidje, a LACRT fehérje QELNPLK peptidje, valamint a LYZ fehérje GISLANWMCLAK peptidje sem a gyulladós, sem az egészséges bőrből származó SC-ban nem volt detektálható mennyiségben jelen (**10. táblázat**).

10. táblázat. Az egészséges és gyulladós SC mintákban azonosított AMP-k listája.

Fehérje	Peptid	Egészséges bőr	Gyulladt bőr
S100A9	DLYNFLK	-	+
LL-37	LLGDDFR	-	+
LCN2	TFVPGCQPGEFTLGNIK	-	+
S100A8	ALNSIIDVYHK	+	+
S100A8	GADVWFK	+	+
LCN2	VPLQQNFQDNQFQGK	+	+
DCD	ENAGEDPGLAR	+	+
LACRT	SILLTEQALAK	+	+
LYZ	WESGYNTR	+	+
S100A7	SIIGMIDMFHK	-	-
hBD1	IQGTCYR	-	-
hBD2	GIGDPVTCLK	-	-
hBD3	GIINTLQK	-	-
hBD4	ICGYGTAR	-	-
LCN2	SYNVTSVLFR	-	-
TSLP	CLEQVSQLQGLWR	-	-
LACRT	QELNPLK	-	-
LYZ	GISLANWMCLAK	-	-

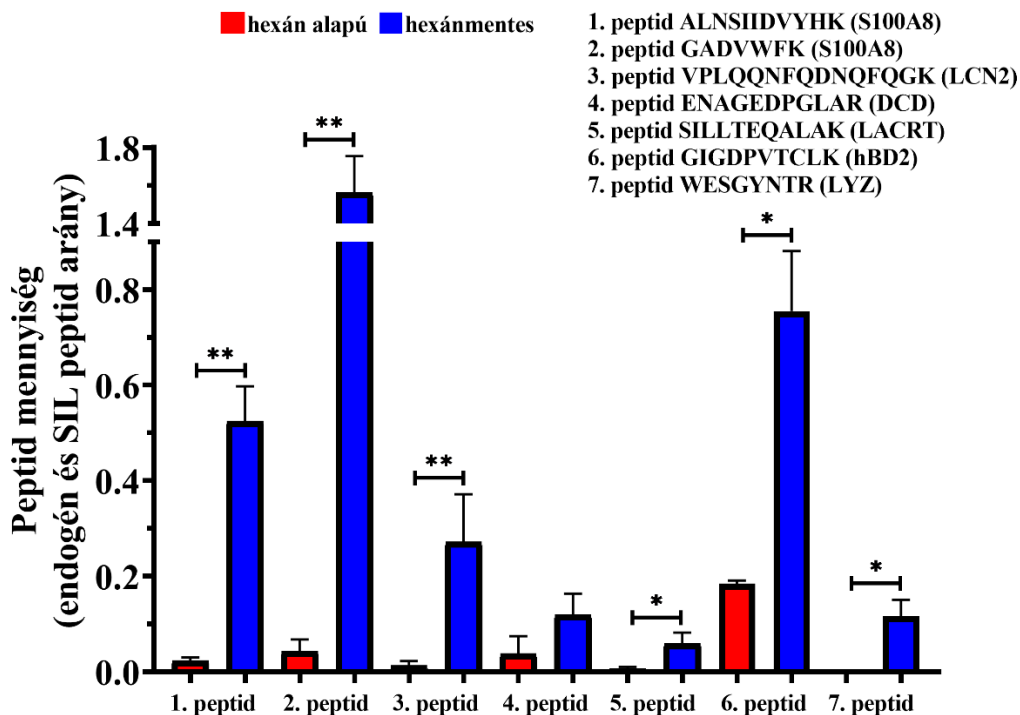
Az AMP-ket PRM alapú tömegspektrometriás módszerrel detektáltuk egészséges és gyulladós bőrben. A táblázat bemutatja a vizsgált fehérjéket, a hozzájuk tartozó specifikus peptidok szekvenciáját, valamint jelenlétét vagy hiányát egészséges és gyulladós SC mintában. A '+' a fehérjék jelenlétét, míg a '-' annak hiányát jelöli. A fehérjék a génneveikkel vannak jelölve.

2.1.3. A fehérje elúció optimalizálása

Egészséges és gyulladt bőrben a vizsgált 18 peptidből 9-et lehetett detektálni (DLYNFLK peptid az S100A9 fehérjéből, LLGDFFR peptid az LL-37 fehérjéből, TFVPGCQPGEFTLGNIK peptid az LCN2 fehérjéből, ALNSIIDVYHK peptid és GADVWFK peptid az S100A8 fehérjéből, VPLQQNFQDNQFQGGK peptid a LCN2 fehérjéből, ENAGEDPGLAR peptid a DCD fehérjéből, SILLTEQALAK peptid a LACRT fehérjéből, WESGYNTR peptid a LYZ fehérjéből), a másik 9 peptid nem volt jelen detektálható mennyiségben a vizsgált mintákban. A fehérje elúciójához az irodalomban korábban leírt hexán alapú elúciós eljárást használtuk. Annak érdekében, hogy tisztázzuk, vajon az említett 9 peptid alacsony hozamának a hexán alapú elúciós eljárás-e az oka, a következő lépésben a hexán alapú elúciós eljárást összehasonlítottuk a hexánmentes elúciós eljárással. Tíz koronggal gyűjtöttünk SC mintát egy egészséges felnőtt férfi homlokáról, amit két részre osztottuk a hexán alapú és a hexánmentes peptid kinyerési módszerhez [7][108].

A korongról kinyert fehérjéket tripszines emésztése után tömegspektrométer segítségével vizsgáltuk meg. A hexán alapú és a hexánmentes technikával kinyert peptidek mennyiségét hat fehérje hét peptidjének összehasonlításával határoztuk meg. A peptidmennyiségek relatív kvantitálására az endogén és SIL peptidek arányát használtuk (**14. ábra**). Az így meghatározott arányszám a minták peptid mennyiségét mutatja meg a szintetikus SIL peptidek mennyiségéhez normalizálva; a magasabb arány a minta nagyobb peptidmennyiségét jelzi.

Tapasztalataink szerint a hexánmentes elúciós módszerrel szignifikánsan nagyobb peptidmennyiséget lehet kinyerni a korongokról, mint a hexán alapú eljárással. Ezért a további vizsgálatokhoz a hexánmentes elúciós eljárást használtuk.

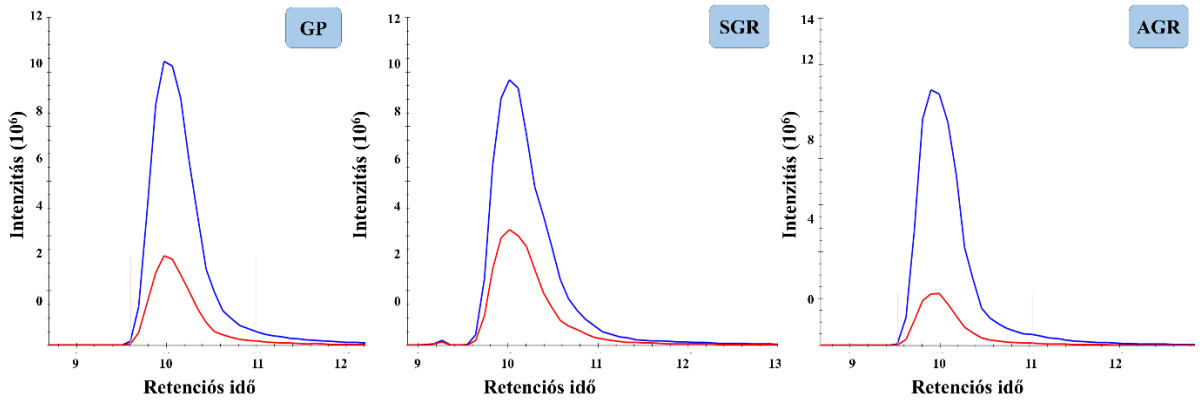


14. ábra. A kiválasztott peptidek mennyiségének összehasonlítása hexán alapú és hexánmentes elúciós folyamat esetén. Az 'y' tengely mutatja a peptid mennyiségének endogén és SIL peptid arányát a vizsgált peptidek esetében. A piros oszlopok a hexán alapú elúció esetén, míg a kék oszlop a hexánmentes elúció esetén mutatja a peptidek arányát.

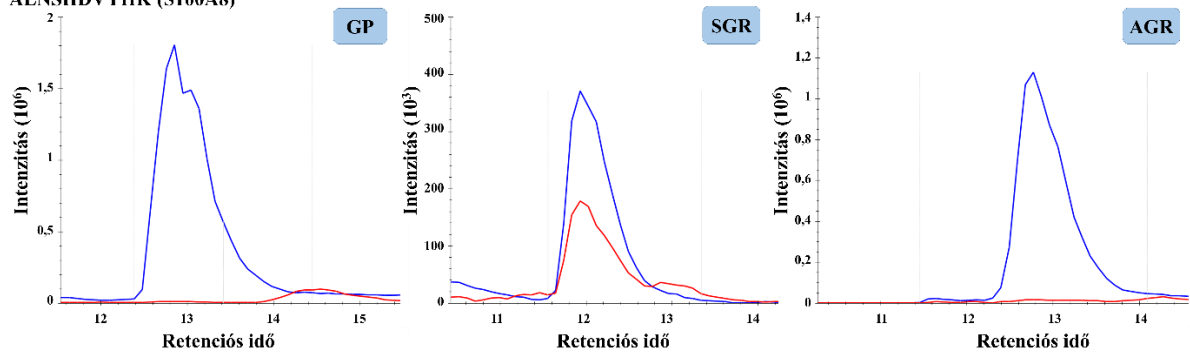
2.2. Különböző egészséges bőrrégiók antimikrobiális peptid mennyiségének összehasonlító vizsgálata

A módszer optimalizálása után az egészséges GP, SGR és AGR bőrrégiók AMP mennyiségének összehasonlító vizsgálatát végeztük el. A SC mintákat 15 egészséges (10 nő és 5 férfi) résztvevő GP, SGR, AGR bőrrégiójából gyűjtöttük (**függelék 1. táblázat**). A SC minták rendre az alkarról, a homlokról és a hónalj területéről lettek gyűjtve, ami a GP, SGR, és AGR bőrrégiókat reprezentálja. A begyűjtött minták fehérjemennyiségét az optimalizált peptid elúciós módszerrel nyertük ki a korongokról, majd PRM alapú tömegspektrometriás módszer segítségével meghatároztuk a vizsgált 18 AMP endogén és SIL peptid arányát a három (GP, SGR, AGR) bőrrégióban (**15. ábra**).

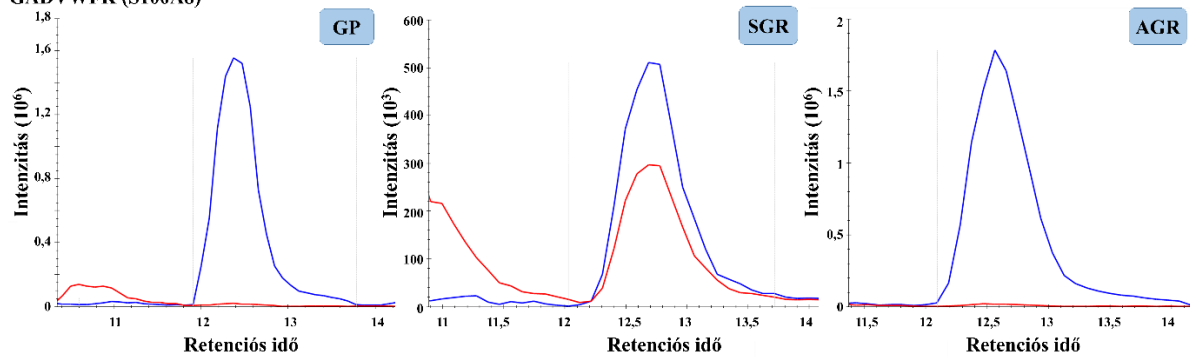
ENAGEDPGLAR (DCD)



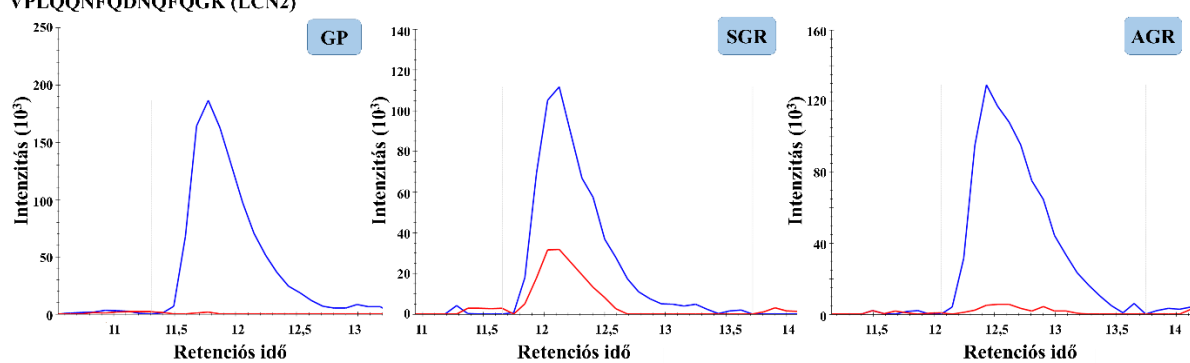
ALNSIIDVYHK (S100A8)

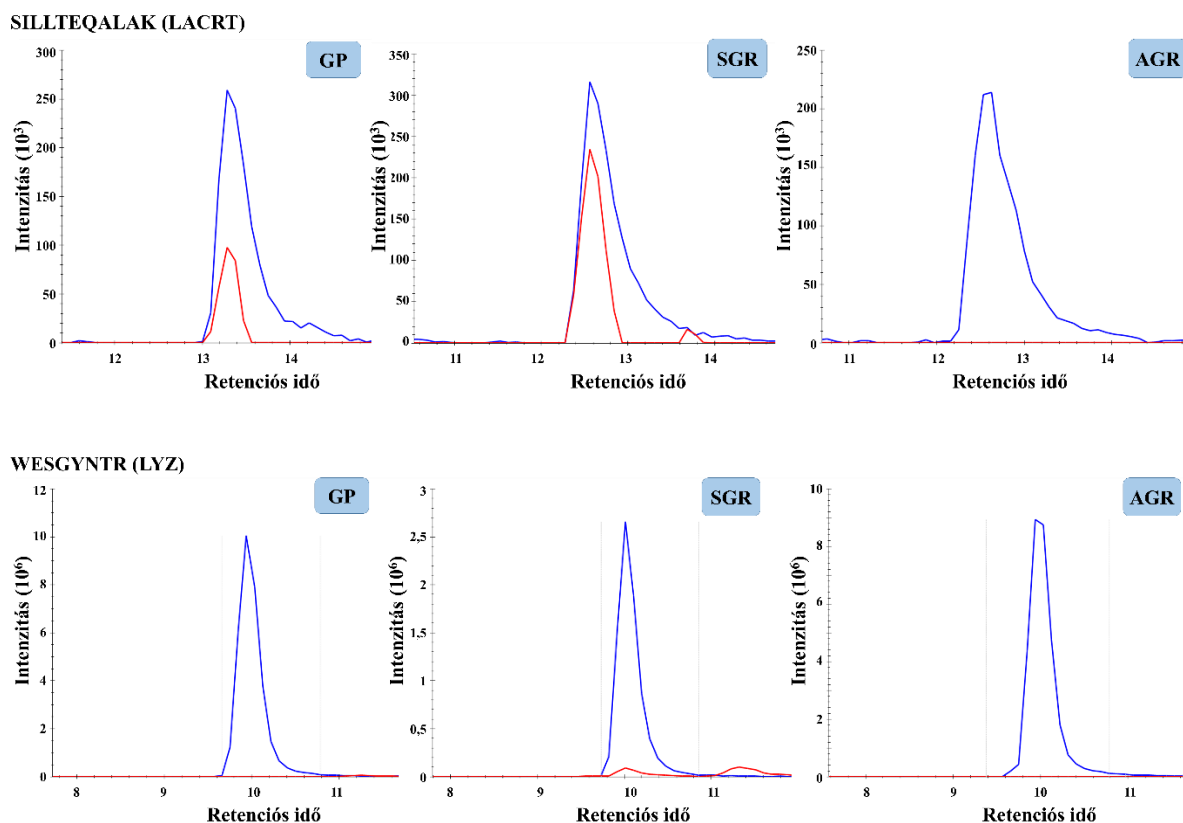


GADVWFK (S100A8)



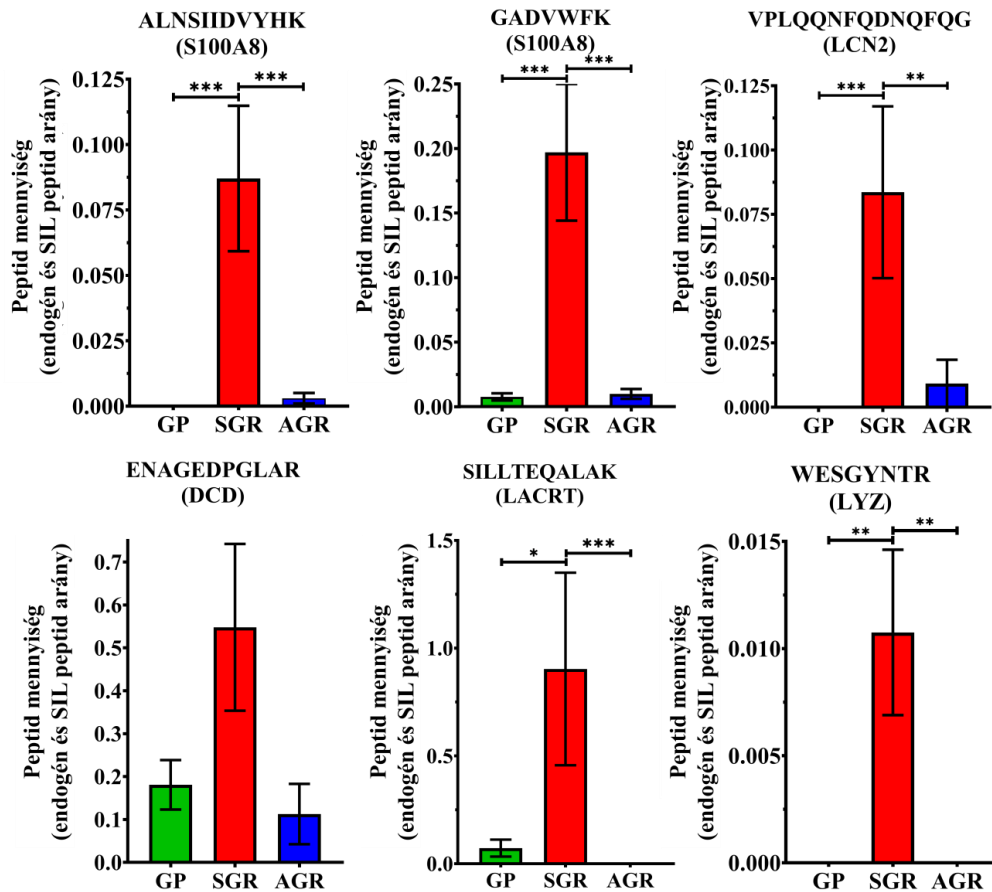
VPLQQNFQDNQFQ GK (LCN2)





15. ábra. Reprezentatív PRM spektrumok. Az 'y' tengely a kromatográfiás csúcsok intenzitását, míg az 'x' tengely a retenciós időt (perc) mutatja. A kék vonal a szintetikus SIL peptidok, míg a piros vonal az endogén peptid intenzitását mutatja. GP - apokrin és faggyúmirigyekben szegény, SGR - faggyúmirigyekben gazdag, AGR - apokrin mirigyekben gazdag.

A kvantifikálás feltételeinek öt fehérje hat peptidje felelt meg koelúciójuk alapján (**15. ábra**). Az S100A8 fehérje ALNSIIDVYHK peptidjét és a LCN2 fehérje VPLQQNFQDNQFQGK peptidjét nem, míg a S100A8 fehérje GADVWFK peptidét alacsony mennyiségben tudtuk GP bőrrégióban detektálni. Ezek a peptidok AGR területen emelkedettebb, míg SGR bőrterületen szignifikánsan nagyobb mennyiségben voltak jelen a GP bőrterülethez képest. A LACRT fehérje SILLTEQALAK peptidje és a LYZ fehérje WESGYNTR peptidje AGR bőrben nem volt mérhető. GP bőrben a LACRT fehérje SILLTEQALAK peptidje alacsony mennyiségben, a LYZ fehérje WESGYNTR peptidje nem volt detektálható. Ez a két peptid szignifikánsan nagyobb mennyiségben volt jelen SGR bőrben a GP és az AGR bőrrégiókhöz hasonlítva. A DCD fehérje ENAGEDPGLAR peptidje mindhárom bőrrégióban detektálható mennyiségben volt jelen, viszont az egyes bőrterületek DCD mennyiségében nem volt szignifikáns különbség (**16. ábra**).



16. ábra. A vizsgált AMP-k mennyisége különböző bőrrégiók SC-ban. Az 'y' tengelyen az endogén és SIL peptid arány átlaga \pm SEM látható, míg az 'x' tengely a bőrrégiókat mutatja. * jelöli a szignifikáns különbségeket (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). GP - apokrin és faggyúmirigyekben szegény, SGR - faggyúmirigyekben gazdag, AGR - apokrin mirigyekben gazdag.

Megbeszélés

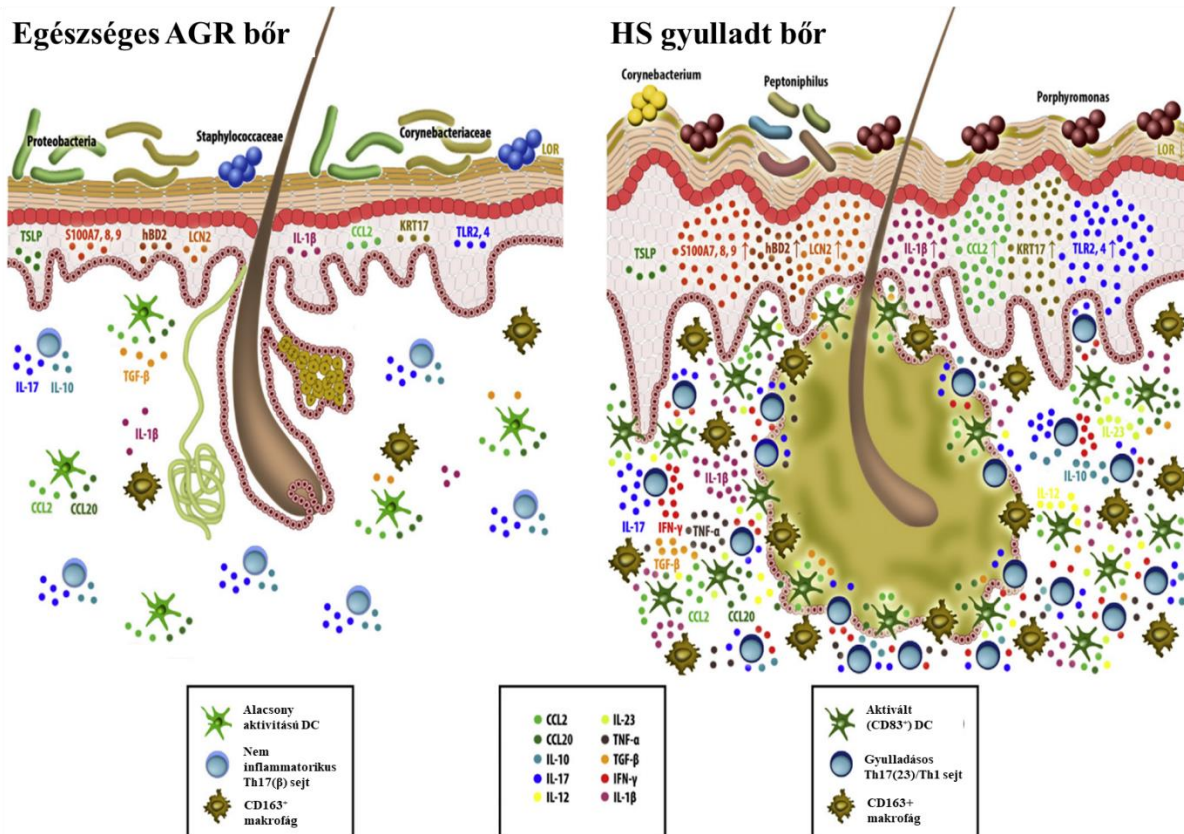
1. Az egészséges és a gyulladt teljes bőr különbségei

Munkacsoportunk jelentős eltéréseket talált a topográfiaileg eltérő egészséges bőrrégiók immunológiai és barrier sajátosságai között, valamint a nedves bőr és a nedves bőrön lokalizálódó HS-ás gyulladt bőr immunparamétereiben. Nedves bőrben egy nem gyulladós IL-17/IL-10 citokin környezet figyelhető meg száraz bőrrel összehasonlítva, szignifikánsan magasabb T- és DC szám jelenlétében. A sejtek aktivitásában viszont nem tapasztaltunk emelkedést, gyulladós jelleget nem mutattak. A nedves bőr nem gyulladós IL-17/IL-10 milióját IL-17-hez köthető kemokinek, AMP-k és barrier tulajdonságok jelenléte egészíti ki.

Korábbi irodalmi adatok szerint a HS manifesztációját egy szubklinikus gyulladós állapot előzi meg, mely a folliculusok kommenzális baktériumai ellen irányuló aberráns KC válasszal kezdődik [83][85]. Az egészséges nedves bőr egy sajátos régió-specifikus mikrobióta környezettel rendelkezik, az erre a területre specifikus kémiai miliónek, pH-nak, páratartalomnak és hőmérsékletnek köszönhetően. Ez a sajátos kommenzális flóra homeosztatisz kapcsolatot tart fenn az AGR bőr régió-specifikus immun és barrier környezetével [75][77].

Hipotézisünk szerint a HS kialakulása során ez az „AGR-specifikus” homeosztatisz szimbiózis módosul (vagy ki sem alakul teljesen), így a nem gyulladós IL-17/IL-10 környezet károsodik. Ezek a folyamatok vezetnek az IL-17/IFN- γ típusú gyulladás kialakulásához HS-ban (**17. ábra**).

Kísérleti eredményeink szerint a HS pathomechanizmusa nagyon hasonlít a Crohn betegségben leírt patológias folyamatokhoz [107][108].



17. ábra. Az egészséges AGR és a HS-ás bőr immunstátuszának sematikus képe. Az egészséges apokrin mirigyben gazdag és a HS bőr mikrobióta összetétele Grice and Segre (2011) és Ring et al. (2017) közleményei alapján lettek ábrázolva [105][106]. AGR – apokrin mirigyekben gazdag, CCL – kemokin (C-C motívum) ligandum, DC – dendritikus sejt, HS – hidradenitisz szuppurativa, Th17(β) – nem gyulladásos T-helper 17, Th17(23) – gyulladásos T-helper 17, TLR – Toll-szerű receptor, TNF-α – tumor nekrozis faktor-α.

Eredményeink arra utalnak, hogy az egészséges AGR bőrre jellemző nem gyulladásos IL-17 immunmilió hajlamossá teheti ezt a területet olyan IL-17 típusú gyulladásos betegségek kialakulására, mint amilyen a HS, mivel a nedves bőr összes jellegzetes adaptív és veleszületett immun és barrier jellegzetessége HS-ban is megtalálható, sőt felerősödött formában van jelen. Emellett HS-ban újabb aktivációs és gyulladásos markerek is megjelennek, létrehozva egy gyulladásos környezetet. Tehát az egészséges AGR bőrben alacsony mennyiségben jelen lévő, gyulladásos aktivitást nem mutató T-sejtek, DC-k, kemokinek, AMP-k és barrier molekulák egyensúlyának eltolódásával kifejeződik egy IL-17 által szabályozott gyulladásos betegség, melyet jelentős kemokin, AMP és barrier eltérések jellemeznek. Emellett magas IFN-γ és TNF-α expressziós szintet is detektáltunk HS léziós bőrben, mellyel kapcsolatban az irodalmi adatok eddig ellentmondásosak voltak [85].

2. Az egészséges bőr stratum corneumának antimikrobiális peptidösszetételének különbségei száraz, nedves és zsíros bőrrégióban

Az AMP-k fontos szerepet játszanak a bőr homeosztatisz állapotának fenntartásában, a bőr felszínén elhelyezkedő normálflóra optimális környezetének biztosításában, a patogén mikróbák inváziójának gátlásában. Az AMP-k jelenléte vagy hiánya, mennyiségük emelkedése vagy csökkenése a bőrbarrier egyensúlyi állapotának változását jelző markerek lehetnek [5][6][9][13][17][109].

Korábbi tanulmányokban ugyanarról a helyről 6 vagy több koronggal távolítottak el SC-ot, valamint az első korong fehérje tartalmát kizárták a vizsgálatból. A SC mélyebb rétegei felé haladva a korneociták közötti kohéziós erő nő [9][109][110], ennek megfelelően a tape stripping technikával eltávolítható fehérje mennyisége exponenciálisan csökken a SC mélyebb rétegei felé haladva [135]. Megfigyelték azt is, hogy a mintavételek során a mintát adó személy diszkomfort érzete nő, ha ugyanarról a helyről több korongot távolítanak el [9]. A SC legfelső rétege biztosítja az első védelmi vonalat a szervezetet érő kórokozókkal szemben, ezért a bőrfelszínre szekretált AMP-k összetételének meghatározása szempontjából a SC vizsgálatának kiemelkedő jelentősége van [6]. Vizsgálatainkhoz az első korong fehérjetartalmát használtuk fel és egy helyről csak egy korongot távolítottunk el.

Az AMP összetételében bekövetkező változások prediktív markerként a bőrfelszínen megjelenő, betegségre utaló fizikai jelek megjelenése előtt bekövetkezhetnek. Bőrgyulladás esetén bizonyos AMP-k jelenléte vagy hiánya, expressziós szintje a gyulladás súlyosságára utalhat [57], így vizsgálatának klinikai relevanciája lehet.

Az egészséges bőr topográfiaileg eltérő területeinek és a gyulladásos bőrbetegségek pathomechanizmusának vizsgálata szempontjából a SC analízisének kiemelkedő jelentősége van mind a kutatásban, mind a klinikumban. Jelenleg a bőrben lezajló immunológiai változások vizsgálatához biopsziával gyűjtenek mintát, mely egy invazív, sebképződéssel járó eljárás. Épp ezért felmerült az igény egy minimális invazivitással járó, fájdalom és hegképződés nélküli mintagyűjtési módszer iránt. A klinikai gyakorlatban ez a vizsgálati módszer kiegészítheti a korábbi protokollokat, segítheti a pontos diagnózis meghozatalát, valamint a megfelelő terápiás lehetőség kiválasztását.

Vizsgálataink során kidolgoztunk egy, a korábbi tanulmányokban leírt hexán alapú elúciós módszerrel ellentétben [7][108] új, hexánmentes elúciós módszert. A mintagyűjtéshez

D-Squame korongot használtunk. Mivel a D-Squame koronggal eltávolítható fehérje mennyisége korlátozott, az volt a célunk, hogy a korongról kinyerhető fehérje mennyiségét növeljük. Összehasonlítva a hexán alapú és hexánmentes technikát, az utóbbival szignifikánsan nagyobb mennyiségű fehérjét lehetett kinyerni a korongok felszínéről. A hexánmentes elúciós technika esetén a fehérje denaturálása közvetlenül a korong felszínéről történt, míg a hexán alapú mintakinyerési módszer esetén a fehérjét tartalmazó korongokat először egy szilán borítású tárgylemezre kellett ragasztani és a fehérjék denaturálása csak a hexános áztatás után történt meg. A denaturálás előtt beiktatott hexánnal történő áztatás, méréseink szerint jelentős fehérje veszteséssel jár, de ennek bizonyítása további vizsgálatokat igényel.

Korábbi irodalmakban a SC proteomikai vizsgálatához az általunk is használt tape stripping mintavételi módszert használták, azzal a különbséggel, hogy ugyanarról a bőrfelszínről több koronggal távolították el a fehérjetartalmat. Ezt követően antigén-antitest felismerésen alapuló (ELISA, IHC) molekuláris biológiai módszerrel különböző AMP-eket detektáltak (hBD, LL-37, RNase 7, S100A7, DCD) [1], [2], [5]–[8], [67], [70], [71], [132]. Ezzel ellentétben, mi a minták analíziséhez a Parallel Reaction Monitoring (PRM) alapú tömegspektrometriás módszert választottuk. A PRM egy célzott, hibrid tandem tömegspektrometriás módszer, ahol az analízist egy nagy felbontású analizátor (Orbitrap) segítségével végeztük el [9][109][136]. A PRM MS nagy specifitása, érzékenysége, széles dinamikai tartománya és multiplex tulajdonságai miatt alkalmas olyan biológiai minták vizsgálatára, amelyekben a minta fehérjetartalma alacsony [137]. Mivel a SC külső rétegeiből eltávolítható fehérje mennyisége tape stripping módszerrel korlátozott, ezért a PRM alapú tömegspektrometriás módszer alkalmas a minták pontos analízisére.

A SC mintákban 6 olyan AMP-t (S100A7, S100A8, S100A9, hBD2, LCN2, TSLP) vizsgáltunk meg, aminek expressziós szintjét a teljes bőrmintában is meghatároztuk a munkafolyamat első szakaszában. Ezen kívül további 7 olyan AMP-t (hBD1, 3, 4, DCD, LACRT, LYZ, LL37) is beválasztottunk a vizsgálataink második szakaszába, melyek konstitutív vagy indukált AMP-ként jellemző markerei az egészséges vagy gyulladásozó bőrnek. A vizsgált 13 AMP közül 5 fehérje 6 peptidjét (az S100A8 fehérje ALNSIIDVYHK és GADVWFK peptidét, a LCN2 fehérje VPLQQNFQDNQFQGK peptidjét, a DCD fehérje ENAGEDPGLAR peptidjét, a LACRT fehérje SILLTEQALAK peptidjét és a LYZ fehérje WESGYNTR peptidjét) tudtuk detektálni az egészséges bőr különböző régióiban.

A kimutatható 5 fehérjéből 4-et (S100A8, LCN2, LACRT és a LYZ fehérjék) szignifikánsan nagyobb mennyiségben detektáltunk SGR bőrrégióban összehasonlítva a GP és

az AGR bőrrégiókkal. Az S100A8 fehérje ALNSIIDVYHK és GADVWFK peptidjeit és a LCN2 fehérje VPLQQNFQDNQFQGG peptidjét jelentősen nagyobb mennyiségben tudtuk detektálni AGR bőrben összehasonlítva a GP bőrrégióval, valamint szignifikánsan nagyobb mennyiségben volt jelen SGR bőrterületen, mint GP és AGR bőrben. Ezek az adatok összhangban vannak a vizsgálataink első részében tapasztaltakkal.

Két, korábban nem vizsgált AMP-t is azonosítottunk SC-ban (a LACRT SILLTEQALAK peptidjét és a LYZ WESGYNTR peptidjét), melyek szignifikánsan nagyobb mennyiségben voltak jelen SGR bőrterületen, mint GP vagy AGR bőrterületen. A GP bőrben a LYZ és a LCN2 hiánya, valamint az S100A8 alacsony szintje alátámasztja, hogy az egészséges AGR és SGR bőrterületet egy nem gyulladásos, de „készenléti” immunstátusz jellemzi a GP bőrterülethez képest [1][2][10].

Az ekkrin verejtékmirigyek által termelt DCD-t a három egészséges bőrrégióban közel azonos mennyiségben tudtuk detektálni, mely összhangban van az irodalmi adatokkal [70]. A DCD az egészséges bőr felszínén, néhány kivételtől eltekintve mindenhol megtalálható az ekkrin verejtékmirigy által termelt és a bőr felszínére szekretált verejték miatt. Mennyisége jelentősen csökken vagy teljesen eltűnik gyulladásos bőrbetegség kialakulása során az ekkrin mirigyek működési zavara miatt. Vagyis a DCD mennyiségének változása fontos indikátor lehet bizonyos gyulladásos bőrbetegségek kezdeti stádiumában [70][71][124].

Az AMP-k fontos szerepet játszanak bizonyos bőrbetegségek pathogenezisében, mennyiségük összefügghet a betegségek súlyosságával. A tape stripping technikával nyert SC fehérje tartalmának PRM alapú tömegspektrometriás analízise lehetőséget biztosít az AMP-k vizsgálatára. Ez segítséget nyújthat a különböző bőrbetegségek (HS, AD, Ps, PPR) pathomechanizmusának kutatásában, a klinikai gyakorlatban pedig a betegség súlyosságának monitorozásában [133]. Hasznos lehet továbbá a terápiás hatékonyság nyomonkövetésében, mivel lehetőséget biztosít a bőrfelszín AMP összetételének meghatározására terápia előtt és után.

Összefoglalás

Az emberi bőr nem csak az anatómiai, kémiai és mikrobióta összetételében mutat különbséget a topográfiailag eltérő három fő bőrterületen (mirigyekben szegény [GP], faggyúmirigyekben gazdag [SGR], apokrin mirigyekben gazdag [AGR]), hanem immunstátuszukban és barrier tulajdonságaikban is. Ez megmagyarázhatja azt a tényt, hogy különböző bőrterületeken eltérő, az adott régióra specifikus gyulladásos bőrbetegségek alakulnak ki. Ilyen például GP bőrterületen az AD, AGR régióban a HS és SGR területen az akné és a PPR előfordulása [2][115].

Elsőként fehérje és gén szinten vizsgáltuk az egészséges AGR bőr és egy AGR bőrre lokalizálódó gyulladásos bőrbetegség, a HS immunológiai jellegzetességeit. GP bőrrel összehasonlítva AGR bőrben egy nem gyulladásos IL-17/IL-10 citokin környezet figyelhető meg, emelkedett CD4⁺ Th sejt és gyulladásos aktivitást nem mutató CD11c⁺ DC számmal. Az IL-17-hez köthető kemokinek, AMP-k és barrier molekula szintje szignifikánsan nagyobb AGR-ben, mint GP-ben. HS-ás bőrben ez az AGR-specifikus, nem gyulladásos IL-17/IL-10 környezet gyulladásos IL-17/IFN- γ típusú környezetté alakul, valamint az AGR bőrben már jelen levő gyulladásos markerek mellett újabbak is megjelennek. Összehasonlítva az egészséges AGR bőrrel, HS-ás bőrben szignifikánsan megemelkedett az immunválasz sejtjes elemeinek száma és aktivitása, a Th1/Th17 immunválaszokhoz köthető citokinek és transzkripció faktorok, kemokinek, AMP-k és barrier molekulák mennyisége.

Ezt követően kidolgoztunk és optimalizáltunk egy olyan PRM alapú tömegspektrometriás módszert, mely során egy minimálisan invazív mintagyűjtési és vizsgálati technika segítségével az egészséges és gyulladásos bőr SC AMP összetételét analizáltuk. Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a koronggal eltávolítható SC mennyisége az egyénekre specifikus és nem függ a vizsgált bőrrégiótól. Kimutattuk, hogy a hexánmentes elúciós technikával szignifikánsan nagyobb mennyiségű fehérjét nyerhetünk ki a korongokról, mint a hexán alapú elúciós módszerrel. Összehasonlítva az egészséges SGR bőrterület SC AMP mennyiségét a GP vagy az AGR bőrterület SC-ának AMP mennyiségével, szignifikáns különbséget detektáltunk 4 fehérje 5 peptidje (S100A8, LCN2, LACRT és a LYZ fehérjék peptidjei) kapcsán. A különböző bőrterületek SC-ában a DCD fehérje peptidjének mennyiségében nem detektáltunk jelentős eltérést. Ezen vizsgálati módszer segítséget nyújthat a bőrbetegségek pathomechanizmusának kutatásában, a klinikai gyakorlatban a gyulladásos specifikus AMP-k meghatározásával képet kaphatunk a gyulladás mértékéről.

Summary

Based on our results, the three main topographically different skin regions (gland-poor [GP], sebaceous gland-rich [SGR], apocrine gland-rich [AGR]) are equipped with a significantly different immune and barrier supply, similarly to the previously reported topographical distinctions of their microbiota and chemical milieu. The variances in immune and permeability barrier characteristics among the skin regions may explain the fact that different region-specific skin diseases localise to different skin areas. For instance, AD is typical on GP, HS is common in AGR and acne or PPR occur on SGR skin regions. First, we investigated the immune status of healthy AGR skin regions and that of HS, an inflammatory skin disease specially localized to AGR areas. Our results revealed a non-inflammatory IL-17/IL-10 cytokine environment on AGR skin compared with GP skin, with increased CD4⁺ Th and non-activated CD11c⁺ DC counts. The expression of IL-17 related chemokines, AMPs and barrier molecules were increased significantly in AGR skin, compared to GP skin. In HS, the AGR specific non-inflammatory IL-17/IL-10 status turns to an inflammatory environment characterized by IL-17/IFN γ cytokine milieu supplemented with further inflammatory markers. The amounts of cellular components associated with enhanced immune response and their activation markers, Th1/Th17 related factors, chemokines, AMPs and barrier molecules were increased significantly in HS compared with healthy AGR skin.

Next, we developed and optimised a PRM-based mass spectrometry method to detect the AMP content of SC in healthy and inflamed skin using a minimally invasive sample collection technique. We observed that the abundance of AMPs in the SC collected by D-Squame discs was specific to the individual, but were independent from the skin regions. Significantly higher AMP amounts could be extracted from the discs using our novel hexane-free elution technique, compared with hexane-based methods. Comparing the AMP content of healthy SGR skin with that of GP and AGR regions, we could detect significant differences in the case of 5 peptides of 4 proteins (two peptides from S100A8, one from LCN2, LACRT and LYZ). No significant differences could be detected in the case of the peptide of DCD protein in the SC of different skin regions. Applying this method for the investigation of inflammatory skin diseases may help us to better understand their pathomechanisms and may provide information on disease severity (based on AMP quantitation) in the clinical practice.

Irodalomjegyzék

- [1] G. Béke *et al.*, ‘Immunotopographical differences of human skin’, *Front. Immunol.*, vol. 9, no. MAR, pp. 1–15, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00424.
- [2] Z. Dajnoki *et al.*, ‘Sebaceous Gland-Rich Skin Is Characterized by TSLP Expression and Distinct Immune Surveillance Which Is Disturbed in Rosacea’, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 137, no. 5, pp. 1114–1125, 2017, doi: 10.1016/j.jid.2016.12.025.
- [3] U. . Grice *et al.*, ‘The skin microbiome’, *Nat Rev Microbiol*, vol. 9, no. 4, pp. 244–253, 2013, doi: 10.1038/nrmicro2537.The.
- [4] A. Bouslimani *et al.*, ‘Molecular cartography of the human skin surface in 3D’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 17, pp. E2120–E2129, 2015, doi: 10.1073/pnas.1424409112.
- [5] A. Jenei *et al.*, ‘Apocrine Gland-Rich Skin Has a Non-Inflammatory IL-17-Related Immune Milieu, that Turns to Inflammatory IL-17-Mediated Disease in Hidradenitis Suppurativa’, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 139, no. 4, pp. 964–968, 2019, doi: 10.1016/j.jid.2018.10.020.
- [6] M. L. Clausen *et al.*, ‘Measurements of AMPs in stratum corneum of atopic dermatitis and healthy skin-tape stripping technique’, *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-20204-8.
- [7] Y. Sano *et al.*, ‘Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in the horny layer of patients with atopic dermatitis’, *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 171, no. 3, pp. 330–337, 2013, doi: 10.1111/cei.12021.
- [8] P. Y. Ong *et al.*, ‘Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis’, *N. Engl. J. Med.*, vol. 347, no. 15, pp. 1151–1160, 2002, doi: 10.1056/NEJMoa021481.
- [9] T. Egelrud *et al.*, ‘Desquamation in the stratum corneum’, *Acta Dermato-Venereologica, Suppl.*, no. 208, pp. 44–45, 2000, doi: 10.1080/000155500750042853.
- [10] Y. Hu *et al.*, ‘Neural control of sweat secretion: a review’, *Br. J. Dermatol.*, vol. 178, no. 6, pp. 1246–1256, 2018, doi: 10.1111/bjd.15808.
- [11] L. B. Baker *et al.*, ‘Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat

- composition in human health', *Temperature*, vol. 6, no. 3, pp. 211–259, Jul. 2019, doi: 10.1080/23328940.2019.1632145.
- [12] M. Murakami *et al.*, 'Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin', *J. Invest. Dermatol.*, vol. 119, no. 5, pp. 1090–1095, 2002, doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.19507.x.
- [13] J. H. Park *et al.*, 'An antimicrobial protein, lactoferrin exists in the sweat: Proteomic analysis of sweat', *Exp. Dermatol.*, vol. 20, no. 4, pp. 369–371, 2011, doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01218.x.
- [14] F. Niyonsaba *et al.*, 'The human antimicrobial peptide dermcidin activates normal human keratinocytes', *Br. J. Dermatol.*, vol. 160, no. 2, pp. 243–249, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08925.x.
- [15] C. Y. Cui *et al.*, 'Eccrine sweat gland development and sweat secretion', *Exp. Dermatol.*, vol. 24, no. 9, pp. 644–650, 2015, doi: 10.1111/exd.12773.
- [16] F. O. Nestle *et al.*, 'Skin immune sentinels in health and disease', *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 10, pp. 679–691, 2009, doi: 10.1038/nri2622.
- [17] M. Collin *et al.*, 'Human dendritic cell subsets', *Immunology*, vol. 140, no. 1, pp. 22–30, Sep. 2013, doi: 10.1111/imm.12117.
- [18] Béke G. *et al.*, 'A bőr immunrendszerének felépítése és működése.', *Immunológiai Szle.*, vol. 8, no. 7:(2), pp. 13–20, 2015.
- [19] N. Romani *et al.*, 'Epidermal Langerhans cells—Changing views on their function in vivo', *Immunol. Lett.*, vol. 106, no. 2, pp. 119–125, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.imlet.2006.05.010.
- [20] J. Seneschal *et al.*, 'Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells', *Immunity*, vol. 36, no. 5, pp. 873–884, 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.018.
- [21] R. E. Hunger *et al.*, 'Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells', *J. Clin. Invest.*, vol. 113, no. 5, pp. 701–708, Mar. 2004, doi: 10.1172/JCI19655.
- [22] E. Klechevsky *et al.*, 'Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells

- and CD14+ Dermal Dendritic Cells', *Immunity*, vol. 29, no. 3, pp. 497–510, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.immuni.2008.07.013.
- [23] A. Boltjes *et al.*, 'Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation', *Front. Immunol.*, vol. 5, Apr. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00131.
- [24] R. A. Clark *et al.*, 'The Vast Majority of CLA + T Cells Are Resident in Normal Skin', *J. Immunol.*, vol. 176, no. 7, pp. 4431–4439, Apr. 2006, doi: 10.4049/jimmunol.176.7.4431.
- [25] A. Matejuk *et al.*, 'Skin Immunity', *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 66, no. 1, pp. 45–54, 2018, doi: 10.1007/s00005-017-0477-3.
- [26] R. A. Clark *et al.*, 'Skin-Resident T Cells: The Ups and Downs of On Site Immunity', *J. Invest. Dermatol.*, vol. 130, no. 2, pp. 362–370, Feb. 2010, doi: 10.1038/jid.2009.247.
- [27] C. A. Michie *et al.*, 'Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms', *Nature*, vol. 360, no. 6401, pp. 264–265, Nov. 1992, doi: 10.1038/360264a0.
- [28] S. N. Mueller *et al.*, 'Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence', *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 31, no. 1, pp. 137–161, Mar. 2013, doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095954.
- [29] W. R. Heath *et al.*, 'The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells', *Nat. Immunol.*, vol. 14, no. 10, pp. 978–985, Oct. 2013, doi: 10.1038/ni.2680.
- [30] T. Nomura *et al.*, 'The panoply of $\alpha\beta$ T cells in the skin', *J. Dermatol. Sci.*, vol. 76, no. 1, pp. 3–9, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.07.010.
- [31] R. Sabat *et al.*, 'T cell pathology in skin inflammation', *Semin. Immunopathol.*, vol. 41, no. 3, pp. 359–377, 2019, doi: 10.1007/s00281-019-00742-7.
- [32] S. N. Mueller *et al.*, 'Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence', *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, no. 2, pp. 79–89, Feb. 2016, doi: 10.1038/nri.2015.3.
- [33] A. Carbo *et al.*, 'Computational modeling of heterogeneity and function of CD4+ T cells', *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 2, Jul. 2014, doi: 10.3389/fcell.2014.00031.
- [34] V. Lazarevic *et al.*, 'T-bet in disease', *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 7, pp. 597–606, Jul.

- 2011, doi: 10.1038/ni.2059.
- [35] C. M. Olesen *et al.*, ‘Advancement through epidermis using tape stripping technique and Reflectance Confocal Microscopy’, *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–6, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-48698-w.
- [36] B. S. Kim *et al.*, ‘Innate lymphoid cells and allergic inflammation’, *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 25, no. 6, pp. 738–744, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.coi.2013.07.013.
- [37] Y. Kurebayashi *et al.*, ‘Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of $\gamma\delta$ T h17 cells’, *Genes to Cells*, vol. 18, no. 4, pp. 247–265, Apr. 2013, doi: 10.1111/gtc.12039.
- [38] Y. Kurebayashi *et al.*, ‘Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of $\gamma\delta$ T h17 cells’, *Genes to Cells*, vol. 18, no. 4, pp. 247–265, Apr. 2013, doi: 10.1111/gtc.12039.
- [39] R. Yoshiki *et al.*, ‘IL-23 from Langerhans Cells Is Required for the Development of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Dermatitis by Induction of IL-17A-Producing $\gamma\delta$ T Cells’, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, no. 7, pp. 1912–1921, Jul. 2014, doi: 10.1038/jid.2014.98.
- [40] S. Nakajima *et al.*, ‘IL-17A as an Inducer for Th2 Immune Responses in Murine Atopic Dermatitis Models’, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, no. 8, pp. 2122–2130, Aug. 2014, doi: 10.1038/jid.2014.51.
- [41] W. Hueber *et al.*, ‘Effects of AIN457, a Fully Human Antibody to Interleukin-17A, on Psoriasis, Rheumatoid Arthritis, and Uveitis’, *Sci. Transl. Med.*, vol. 2, no. 52, pp. 52ra72–52ra72, Oct. 2010, doi: 10.1126/scitranslmed.3001107.
- [42] H. Fujita *et al.*, ‘The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases’, *J. Dermatol. Sci.*, vol. 72, no. 1, pp. 3–8, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.028.
- [43] H. Fujita *et al.*, ‘The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases’, *J. Dermatol. Sci.*, vol. 72, no. 1, pp. 3–8, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.028.
- [44] C. Schlapbach *et al.*, ‘Human TH9 Cells Are Skin-Tropic and Have Autocrine and Paracrine Proinflammatory Capacity’, *Sci. Transl. Med.*, vol. 6, no. 219, pp. 219ra8–219ra8, Jan. 2014, doi: 10.1126/scitranslmed.3007828.

- [45] R. Sanchez Rodriguez *et al.*, ‘Memory regulatory T cells reside in human skin’, *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 3, pp. 1027–1036, Mar. 2014, doi: 10.1172/JCI72932.
- [46] T. Honda, Y. Miyachi *et al.*, ‘Regulatory T cells in cutaneous immune responses’, *J. Dermatol. Sci.*, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.06.004.
- [47] J. Harder *et al.*, ‘The skin surface as antimicrobial barrier: present concepts and future outlooks’, *Exp. Dermatol.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–5, Jan. 2013, doi: 10.1111/exd.12046.
- [48] F. Niyonsaba *et al.*, ‘Multifunctional Antimicrobial Proteins and Peptides: Natural Activators of Immune Systems’, *Curr. Pharm. Des.*, vol. 15, no. 21, pp. 2393–2413, Jul. 2009, doi: 10.2174/138161209788682271.
- [49] F. Niyonsaba *et al.*, ‘Human Defensins and Cathelicidins in the Skin: Beyond Direct Antimicrobial Properties’, *Crit. Rev. Immunol.*, vol. 26, no. 6, pp. 545–576, 2006, doi: 10.1615/CritRevImmunol.v26.i6.60.
- [50] K. H. Hänel *et al.*, ‘Cytokines and the skin barrier’, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 4, pp. 6720–6745, 2013, doi: 10.3390/ijms14046720.
- [51] P. Di Meglio *et al.*, ‘The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function’, *Immunity*, vol. 35, no. 6, pp. 857–869, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.immuni.2011.12.003.
- [52] A. W. Borkowski *et al.*, ‘The coordinated response of the physical and antimicrobial peptide barriers of the skin’, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 131, no. 2, pp. 285–287, 2011, doi: 10.1038/jid.2010.360.
- [53] A. Chan *et al.*, ‘Cellular basis of secondary infections and impaired desquamation in certain inherited ichthyoses’, *JAMA Dermatology*, vol. 151, no. 3, pp. 285–292, 2015, doi: 10.1001/jamadermatol.2014.3369.
- [54] T. Akiyama *et al.*, ‘The Human Cathelicidin LL-37 Host Defense Peptide Upregulates Tight Junction-Related Proteins and Increases Human Epidermal Keratinocyte Barrier Function’, *J. Innate Immun.*, vol. 6, no. 6, pp. 739–753, 2014, doi: 10.1159/000362789.
- [55] F. Hattori *et al.*, ‘The antimicrobial protein S100A7/psoriasin enhances the expression of keratinocyte differentiation markers and strengthens the skin’s tight junction barrier’, *Br. J. Dermatol.*, vol. 171, no. 4, pp. 742–753, Oct. 2014, doi: 10.1111/bjd.13125.

- [56] C. Kiatsurayanon *et al.*, ‘Host Defense (Antimicrobial) Peptide, Human β -Defensin-3, Improves the Function of the Epithelial Tight-Junction Barrier in Human Keratinocytes’, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, no. 8, pp. 2163–2173, Aug. 2014, doi: 10.1038/jid.2014.143.
- [57] F. Niyonsaba *et al.*, ‘Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases’, *Exp. Dermatol.*, vol. 26, no. 11, pp. 989–998, 2017, doi: 10.1111/exd.13314.
- [58] P. Kaleja *et al.*, ‘Evaluation and improvement of protein extraction methods for analysis of skin proteome by noninvasive tape stripping’, *J. Proteomics*, vol. 217, no. November 2019, p. 103678, 2020, doi: 10.1016/j.jprot.2020.103678.
- [59] A. Bardan *et al.*, ‘Antimicrobial peptides and the skin’, *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 4, no. 4, pp. 543–549, 2004, doi: 10.1517/14712598.4.4.543.
- [60] É. Csösz *et al.*, ‘Quantitative body fluid proteomics in medicine — A focus on minimal invasiveness’, *J. Proteomics*, vol. 153, pp. 30–43, 2017, doi: 10.1016/j.jprot.2016.08.009.
- [61] É. Csösz *et al.*, ‘Salivary proteome profiling of oral squamous cell carcinoma in a Hungarian population’, *FEBS Open Bio*, vol. 8, no. 4, pp. 556–569, 2018, doi: 10.1002/2211-5463.12391.
- [62] G. Percoco *et al.*, ‘Antimicrobial peptides and pro-inflammatory cytokines are differentially regulated across epidermal layers following bacterial stimuli’, *Exp. Dermatol.*, vol. 22, no. 12, pp. 800–806, Dec. 2013, doi: 10.1111/exd.12259.
- [63] J. G. H. Dinulos *et al.*, ‘Keratinocyte expression of human β defensin 2 following bacterial infection: Role in cutaneous host defense’, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 10, no. 1, pp. 161–166, 2003, doi: 10.1128/CDLI.10.1.161-166.2003.
- [64] G. Kalló *et al.*, ‘Changes in the chemical barrier composition of tears in Alzheimer’s disease reveal potential tear diagnostic biomarkers’, *PLoS One*, vol. 11, no. 6, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0158000.
- [65] I. Nagy *et al.*, ‘Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes’, *Microbes Infect.*, vol. 8, no. 8, pp. 2195–2205, 2006, doi: 10.1016/j.micinf.2006.04.001.

- [66] J. Schaubert *et al.*, ‘Antimicrobial peptides and the skin immune defense system’, *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 124, no. 3 SUPPL. 2, pp. 13–18, 2009, doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.014.
- [67] K. Yamasaki *et al.*, ‘Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea’, *Nat. Med.*, vol. 13, no. 8, pp. 975–980, 2007, doi: 10.1038/nm1616.
- [68] É. Csosz *et al.*, ‘Proteomics investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population highlights the importance of identification of population-tailored biomarkers’, *PLoS One*, vol. 12, no. 5, pp. 1–21, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0177282.
- [69] É. Csősz *et al.*, ‘Diabetic retinopathy: Proteomic approaches to help the differential diagnosis and to understand the underlying molecular mechanisms’, *J. Proteomics*, vol. 150, pp. 351–358, 2017, doi: 10.1016/j.jprot.2016.06.034.
- [70] S. Rieg *et al.*, ‘Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions’, *Br. J. Dermatol.*, vol. 151, no. 3, pp. 534–539, 2004, doi: 10.1111/j.1365-2133.2004.06081.x.
- [71] S. Rieg *et al.*, ‘Deficiency of Dermcidin-Derived Antimicrobial Peptides in Sweat of Patients with Atopic Dermatitis Correlates with an Impaired Innate Defense of Human Skin In Vivo’, *J. Immunol.*, vol. 174, no. 12, pp. 8003–8010, 2005, doi: 10.4049/jimmunol.174.12.8003.
- [72] J. E. Revuz *et al.*, ‘Prevalence and factors associated with hidradenitis suppurativa: Results from two case-control studies’, *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 59, no. 4, pp. 596–601, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.jaad.2008.06.020.
- [73] I. Cosmatos *et al.*, ‘Analysis of patient claims data to determine the prevalence of hidradenitis suppurativa in the United States’, *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 68, no. 3, pp. 412–419, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.jaad.2012.07.027.
- [74] Y. M. Mengesha *et al.*, ‘Prepubertal hidradenitis suppurativa: Two case reports and review of the literature’, *Pediatr. Dermatol.*, vol. 16, no. 4, pp. 292–296, 1999, doi: 10.1046/j.1525-1470.1999.00077.x.
- [75] R. A. Palmer *et al.*, ‘Early-onset hidradenitis suppurativa’, pp. 501–503, 2001.

- [76] I. Cosmatos *et al.*, ‘Analysis of patient claims data to determine the prevalence of hidradenitis suppurativa in the United States’, *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 68, no. 3, pp. 412–419, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.jaad.2012.07.027.
- [77] A. C. Jahns *et al.*, ‘Microbiology of hidradenitis suppurativa (acne inversa): a histological study of 27 patients’, *APMIS*, vol. 122, no. 9, pp. 804–809, Sep. 2014, doi: 10.1111/apm.12220.
- [78] B. N. Khandalavala *et al.*, ‘Finasteride in Hidradenitis Suppurativa: A “Male” Therapy for a Predominantly “Female” Disease.’, *J. Clin. Aesthet. Dermatol.*, vol. 9, no. 6, pp. 44–50, Jun. 2016, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27386051>.
- [79] S. Kamp *et al.*, ‘Hidradenitis suppurativa: a disease of the absent sebaceous gland? Sebaceous gland number and volume are significantly reduced in uninvolved hair follicles from patients with hidradenitis suppurativa’, *Br. J. Dermatol.*, vol. 164, no. 5, pp. 1017–1022, May 2011, doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10224.x.
- [80] J. Blok *et al.*, ‘Increased Expression of Integrin $\alpha 6\beta 4$ in the Basement Membrane Zone Lining the Sebaceous Glands in Hidradenitis Suppurativa’, *Acta Derm. Venereol.*, vol. 95, no. 8, pp. 994–996, 2015, doi: 10.2340/00015555-2186.
- [81] W. P. Morgan *et al.*, ‘The distribution, size and density of the apocrine glands in hidradenitis suppurativa’, *Br. J. Surg.*, vol. 66, no. 12, pp. 853–856, Dec. 2005, doi: 10.1002/bjs.1800661206.
- [82] C. C. Zouboulis *et al.*, ‘European S1 guideline for the treatment of hidradenitis suppurativa/acne inversa’, *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, vol. 29, no. 4, pp. 619–644, Apr. 2015, doi: 10.1111/jdv.12966.
- [83] C. C. Zouboulis *et al.*, ‘Hidradenitis Suppurativa/Acne Inversa: Criteria for Diagnosis, Severity Assessment, Classification and Disease Evaluation’, *Dermatology*, vol. 231, no. 2, pp. 184–190, 2015, doi: 10.1159/000431175.
- [84] I. Cosmatos *et al.*, ‘Analysis of patient claims data to determine the prevalence of hidradenitis suppurativa in the United States’, *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 69, no. 5, p. 819, 2013, doi: 10.1016/j.jaad.2013.06.042.
- [85] G. Kelly *et al.*, ‘Hidradenitis suppurativa: The role of immune dysregulation’, *Int. J. Dermatol.*, vol. 53, no. 10, pp. 1186–1196, 2014, doi: 10.1111/ijd.12550.

- [86] R. K. Andersen *et al.*, 'Pathophysiology of hidradenitis suppurativa', *Hidradenitis Suppurativa A Dis. Prim.*, pp. 19–26, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-50594-7_3.
- [87] E. Prens *et al.*, 'Pathophysiology of hidradenitis suppurativa: An update', *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 73, no. 5, pp. S8–S11, 2015, doi: 10.1016/j.jaad.2015.07.045.
- [88] H. H. van der Zee *et al.*, 'Elevated levels of tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-10 in hidradenitis suppurativa skin: a rationale for targeting TNF- α and IL-1 β ', *Br. J. Dermatol.*, vol. 164, no. 6, pp. 1292–1298, Jun. 2011, doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10254.x.
- [89] B. Moran *et al.*, 'Hidradenitis Suppurativa Is Characterized by Dysregulation of the Th17:Treg Cell Axis, Which Is Corrected by Anti-TNF Therapy', *J. Invest. Dermatol.*, vol. 137, no. 11, pp. 2389–2395, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.jid.2017.05.033.
- [90] J. W. Frew *et al.*, 'A systematic review and critical evaluation of inflammatory cytokine associations in hidradenitis suppurativa', *F1000Research*, vol. 7, p. 1930, Dec. 2018, doi: 10.12688/f1000research.17267.1.
- [91] A. Malara *et al.*, 'Adipokines are dysregulated in patients with hidradenitis suppurativa', *Br. J. Dermatol.*, vol. 178, no. 3, pp. 792–793, Mar. 2018, doi: 10.1111/bjd.15904.
- [92] Z. Bukvić Mokos *et al.*, 'Understanding the Relationship Between Smoking and Hidradenitis Suppurativa.', *Acta Dermatovenerol. Croat.*, vol. 28, no. 1, pp. 9–13, Jul. 2020, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32650845>.
- [93] C. Dessinioti *et al.*, 'Hidradenitis suppurativa (acne inversa) as a systemic disease', *Clin. Dermatol.*, vol. 32, no. 3, pp. 397–408, May 2014, doi: 10.1016/j.clindermatol.2013.11.006.
- [94] A. Shah *et al.*, 'The critical role of macrophages in the pathogenesis of hidradenitis suppurativa', *Inflamm. Res.*, vol. 66, no. 11, pp. 931–945, Nov. 2017, doi: 10.1007/s00011-017-1074-y.
- [95] S. R. Goldberg *et al.*, 'Hidradenitis suppurativa', *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 82, no. 5, pp. 1045–1058, May 2020, doi: 10.1016/j.jaad.2019.08.090.
- [96] A. Savva *et al.*, 'Impact of Toll-like receptor-4 and tumour necrosis factor gene polymorphisms in patients with hidradenitis suppurativa', *Br. J. Dermatol.*, vol. 168, no. 2, pp. 311–317, Feb. 2013, doi: 10.1111/bjd.12105.

- [97] Ł. Matusiak *et al.*, ‘Increased interleukin (IL)-17 serum levels in patients with hidradenitis suppurativa: Implications for treatment with anti-IL-17 agents’, *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 76, no. 4, pp. 670–675, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.jaad.2016.10.042.
- [98] D. Jiménez-Gallo *et al.*, ‘Effects of adalimumab on T-helper-17 lymphocyte- and neutrophil-related inflammatory serum markers in patients with moderate-to-severe hidradenitis suppurativa’, *Cytokine*, vol. 103, pp. 20–24, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.cyto.2017.12.020.
- [99] C. Schlapbach *et al.*, ‘Expression of the IL-23/Th17 pathway in lesions of hidradenitis suppurativa’, *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 65, no. 4, pp. 790–798, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.jaad.2010.07.010.
- [100] R. Thomi *et al.*, ‘Increased expression of the interleukin-36 cytokines in lesions of hidradenitis suppurativa’, *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, vol. 31, no. 12, pp. 2091–2096, Dec. 2017, doi: 10.1111/jdv.14389.
- [101] S. Hessam *et al.*, ‘Interleukin-36 in hidradenitis suppurativa: evidence for a distinctive proinflammatory role and a key factor in the development of an inflammatory loop’, *Br. J. Dermatol.*, vol. 178, no. 3, pp. 761–767, Mar. 2018, doi: 10.1111/bjd.16019.
- [102] R. Di Caprio *et al.*, ‘IL-36 cytokines are increased in acne and hidradenitis suppurativa’, *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 309, no. 8, pp. 673–678, Oct. 2017, doi: 10.1007/s00403-017-1769-5.
- [103] H. Xu *et al.*, ‘Increased serum interleukin-6 levels in patients with hidradenitis suppurativa’, *Adv. Dermatology Allergol.*, vol. 1, pp. 82–84, 2017, doi: 10.5114/ada.2017.65626.
- [104] G. Kelly *et al.*, ‘Hidradenitis suppurativa: the role of immune dysregulation’, *Int. J. Dermatol.*, vol. 53, no. 10, pp. 1186–1196, Oct. 2014, doi: 10.1111/ijd.12550.
- [105] C. Hotz *et al.*, ‘Intrinsic Defect in Keratinocyte Function Leads to Inflammation in Hidradenitis Suppurativa’, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 136, no. 9, pp. 1768–1780, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.jid.2016.04.036.
- [106] G. Kelly *et al.*, ‘Inflammatory Mechanisms in Hidradenitis Suppurativa’, *Dermatol. Clin.*, vol. 34, no. 1, pp. 51–58, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.det.2015.08.004.
- [107] K. Gáspár *et al.*, ‘The pathophysiology of hidradenitis suppurativa’, *Bőrgyógyászati és*

- Venerológiai Szle.*, vol. 92, no. 5, pp. 215–219, Oct. 2016, doi: 10.7188/bvsz.2016.92.5.2.
- [108] G. Mócsai *et al.*, ‘Investigation of Skin Barrier Functions and Allergic Sensitization in Patients with Hyper-IgE Syndrome’, *J. Clin. Immunol.*, vol. 35, no. 7, pp. 681–688, 2015, doi: 10.1007/s10875-015-0200-2.
- [109] V. Sharma *et al.*, ‘Panorama public: A public repository for quantitative data sets processed in skyline’, *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 17, no. 6, pp. 1239–1244, 2018, doi: 10.1074/mcp.RA117.000543.
- [110] C. Schlapbach *et al.*, ‘Expression of the IL-23/Th17 pathway in lesions of hidradenitis suppurativa’, *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 65, no. 4, pp. 790–798, 2011, doi: 10.1016/j.jaad.2010.07.010.
- [111] K. Wolk *et al.*, ‘Deficiency of IL-22 Contributes to a Chronic Inflammatory Disease: Pathogenetic Mechanisms in Acne Inversa’, *J. Immunol.*, vol. 186, no. 2, pp. 1228–1239, 2011, doi: 10.4049/jimmunol.0903907.
- [112] H. H. Van Der Zee *et al.*, ‘Adalimumab (antitumour necrosis factor- α) treatment of hidradenitis suppurativa ameliorates skin inflammation: An in situ and ex vivo study’, *Br. J. Dermatol.*, vol. 166, no. 2, pp. 298–305, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10698.x.
- [113] R. E. Hunger *et al.*, ‘Toll-like receptor 2 is highly expressed in lesions of acne inversa and colocalizes with C-type lectin receptor’, *Br. J. Dermatol.*, vol. 158, no. 4, pp. 691–697, 2008, doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08425.x.
- [114] C. Hotz *et al.*, ‘Intrinsic Defect in Keratinocyte Function Leads to Inflammation in Hidradenitis Suppurativa’, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 136, no. 9, pp. 1768–1780, 2016, doi: 10.1016/j.jid.2016.04.036.
- [115] B. Dréno *et al.*, ‘Hidradenitis suppurativa: The role of deficient cutaneous innate immunity’, *Arch. Dermatol.*, vol. 148, no. 2, pp. 182–186, 2012, doi: 10.1001/archdermatol.2011.315.
- [116] H. H. Van Der Zee *et al.*, ‘Elevated levels of tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-10 in hidradenitis suppurativa skin: A rationale for targeting TNF- α and IL-1 β ’, *Br. J. Dermatol.*, vol. 164, no. 6, pp. 1292–1298, 2011, doi: 10.1111/j.1365-

2133.2011.10254.x.

- [117] E. Mozeika *et al.*, 'Tumour necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-2 are expressed strongly in hidradenitis suppurativa', *Acta Derm. Venereol.*, vol. 93, no. 3, pp. 301–304, 2013, doi: 10.2340/00015555-1492.
- [118] V. U. Emelianov *et al.*, 'Immunohistological pointers to a possible role for excessive cathelicidin (LL-37) expression by apocrine sweat glands in the pathogenesis of hidradenitis suppurativa/acne inversa', *Br. J. Dermatol.*, vol. 166, no. 5, pp. 1023–1034, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10765.x.
- [119] R. Thomi *et al.*, 'Interleukin-32 is highly expressed in lesions of hidradenitis suppurativa', *Br. J. Dermatol.*, vol. 177, no. 5, pp. 1358–1366, 2017, doi: 10.1111/bjd.15458.
- [120] B. Moran *et al.*, 'Hidradenitis Suppurativa Is Characterized by Dysregulation of the Th17:Treg Cell Axis, Which Is Corrected by Anti-TNF Therapy', *J. Invest. Dermatol.*, vol. 137, no. 11, pp. 2389–2395, 2017, doi: 10.1016/j.jid.2017.05.033.
- [121] C. Schlapbach *et al.*, 'Human β -defensin-2 and psoriasin are overexpressed in lesions of acne inversa', *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 61, no. 1, pp. 58–65, 2009, doi: 10.1016/j.jaad.2008.12.033.
- [122] A. L. Lima *et al.*, 'Keratinocytes and neutrophils are important sources of proinflammatory molecules in hidradenitis suppurativa', *Br. J. Dermatol.*, vol. 174, no. 3, pp. 514–521, 2016, doi: 10.1111/bjd.14214.
- [123] K. Wolk *et al.*, 'Lipocalin-2 is expressed by activated granulocytes and keratinocytes in affected skin and reflects disease activity in acne inversa/hidradenitis suppurativa', *Br. J. Dermatol.*, vol. 177, no. 5, pp. 1385–1393, 2017, doi: 10.1111/bjd.15424.
- [124] I. Kurokawa *et al.*, 'Immunohistochemical study of cytokeratins in hidradenitis suppurativa, (Acne Inversa)', *J. Int. Med. Res.*, vol. 30, no. 2, pp. 131–136, 2002, doi: 10.1177/147323000203000205.
- [125] H. Kurzen *et al.*, 'Forms of epithelial differentiation of draining sinus in acne inversa (hidradenitis suppurativa)', *Br. J. Dermatol.*, vol. 141, no. 2, pp. 231–239, 1999, doi: 10.1046/j.1365-2133.1999.02970.x.
- [126] K. Yamasaki *et al.*, 'Antimicrobial peptides in human skin disease', *Eur. J. Dermatology*,

- vol. 18, no. 1, pp. 11–21, 2008, doi: 10.1684/ejd.2008.0304.
- [127] M. Steinhoff *et al.*, ‘New insights into rosacea pathophysiology: A review of recent findings’, *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 69, no. 6 SUPPL.1, pp. 15–26, 2013, doi: 10.1016/j.jaad.2013.04.045.
- [128] K. J. Maloy *et al.*, ‘Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease’, *Nature*, vol. 474, no. 7351, pp. 298–306, 2011, doi: 10.1038/nature10208.
- [129] H. H. van der Zee *et al.*, ‘The Association between Hidradenitis Suppurativa and Crohn’s Disease: in Search of the Missing Pathogenic Link’, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 136, no. 9, pp. 1747–1748, 2016, doi: 10.1016/j.jid.2016.05.102.
- [130] H. C. Ring *et al.*, ‘The follicular skin microbiome in patients with hidradenitis suppurativa and healthy controls’, *JAMA Dermatology*, vol. 153, no. 9, pp. 897–905, 2017, doi: 10.1001/jamadermatol.2017.0904.
- [131] E. A. Grice *et al.*, ‘The skin microbiome’, *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, no. 4, pp. 244–253, Apr. 2011, doi: 10.1038/nrmicro2537.
- [132] H. L. T. Nguyen *et al.*, ‘Role of Antimicrobial Peptides in Skin Barrier Repair in Individuals with Atopic Dermatitis’, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 20, p. 7607, 2020, doi: 10.3390/ijms21207607.
- [133] E. Guttman-Yassky *et al.*, ‘Use of Tape Strips to Detect Immune and Barrier Abnormalities in the Skin of Children with Early-Onset Atopic Dermatitis’, *JAMA Dermatology*, vol. 155, no. 12, pp. 1358–1370, 2019, doi: 10.1001/jamadermatol.2019.2983.
- [134] L. Hulshof *et al.*, ‘A minimally invasive tool to study immune response and skin barrier in children with atopic dermatitis’, *Br. J. Dermatol.*, vol. 180, no. 3, pp. 621–630, 2019, doi: 10.1111/bjd.16994.
- [135] M. L. Clausen *et al.*, ‘Tape Stripping Technique for Stratum Corneum Protein Analysis’, *Sci. Rep.*, vol. 6, no. Table 2, pp. 1–8, 2016, doi: 10.1038/srep19918.
- [136] A. Bourmaud *et al.*, ‘Parallel reaction monitoring using quadrupole-Orbitrap mass spectrometer: Principle and applications’, *Proteomics*, vol. 16, no. 15–16, pp. 2146–2159, 2016, doi: 10.1002/pmic.201500543.

- [137] A. C. Peterson *et al.*, ‘Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics’, *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 11, no. 11, pp. 1475–1488, 2012, doi: 10.1074/mcp.O112.020131.
- [138] M. Mattii *et al.*, ‘Sebocytes contribute to skin inflammation by promoting the differentiation of T helper 17 cells’, *Br. J. Dermatol.*, vol. 178, no. 3, pp. 722–730, 2018, doi: 10.1111/bjd.15879.

Tárgyszavak

Apokrin mirigyekben gazdag bőr, stratum corneum, barrier funkció, antimikrobiális peptid, T-sejt, dendritikus sejt, sejtfelszíni markerek, hidradenitisz szuppurativa.

Key words

Apocrine glands rich skin, stratum corneum, barrier function, antimicrobial peptide, T cell, dendritic cell, cell surface marker, hidradenitis suppurativa.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Kapitány Anikónak, aki PhD képzésem alatt segítette munkámat értékes tanácsaival, valamint szakmai fejlődésemet minden körülmények között támogatta.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Szegedi Andreának, kutatócsoportunk, a DE ÁOK Bőrgyógyászati és Allergológiai Nem Önálló Tanszék és a DE ÁOK Bőrgyógyászati Tanszék vezetőjének, valamint a Tanszék korábbi vezetőjének Dr. Paraghné Prof. Dr. Remenyik Évának, hogy lehetővé tették számomra a tudományos munka elvégzését.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Csősz Évának, a DE ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Proteomika Szolgáltató Laboratórium vezetőjének szakmai és emberi támogatásáért, a lehetőségért, hogy kutatómunkám második részét elvégezhettem irányítása alatt.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Méhes Gábornak, a DE ÁOK Pathológiai Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított a minták digitalizálására, valamint Dr. Hendrik Zoltánnak, aki a szakmai segítségnyújtása mellett mindig szánt időt támogató beszélgetésekre is.

Köszönettel tartozom kutatócsoportunk tagjainak és közvetlen munkatársaimnak, Dr. Dajnoki Zsoltnak, Dr. Béke Gabriellának, Dr. Gáspár Krisztiánnak, Medgyesi Barbarának, Csapóné Sandra Ildikó és Kertész Józsefné a mindennapokban nyújtott szakmai és gyakorlati segítségükért.

Őszinte hálámmal tartozom a Proteomikai Szolgáltató Laboratórium tagjainak Dr. Kalló Gergőnek, Kökényesiné Csáki Juliannának, Csatári-Kovács Renátának és Guba Andreának, akik a nehéz időszakokban nem csak szakmai, hanem baráti támogatást is adtak nekem.

Köszönetet mondok továbbá a Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium munkatársainak.

Hálával tartozom gyerekeimnek, páromnak és családomnak, akik mellettem álltak, támogattak és biztattak, hogy céljaimat elérjem.

Függelék

1. táblázat. A vizsgálataim során felhasznált SC minták listája.

Minta kód	Donor kód	Kor	Nem	Státusz	Mintavétel helye	Gyűjtött korongok száma	Presszió ideje (mp)	Analízis típusa
S1	D1	41	nő	H	homlok	5	10	Mintagyűjtés optimalizálása
S2	D1	41	nő	H	homlok	10	10	Mintagyűjtés optimalizálása
S3	D1	41	nő	H	orca	5	10	Mintagyűjtés optimalizálása
S4	D1	41	nő	H	orca	10	10	Mintagyűjtés optimalizálása
S5	D2	34	férfi	H	homlok	5	10	Mintagyűjtés optimalizálása
S6	D2	34	férfi	H	homlok	10	10	Mintagyűjtés optimalizálása
S7	D2	34	férfi	H	orca	5	10	Mintagyűjtés optimalizálása
S8	D2	34	férfi	H	orca	10	10	Mintagyűjtés optimalizálása
S9	D3	44	nő	HS (súlyos)	hónalj	5	10	PRM alapú MS módszer tervezése, optimalizálása
S10	D4	30	férfi	Ps (középsúlyos)	lábszár	5	10	PRM alapú MS módszer tervezése, optimalizálása
S11	D5	40	nő	PPR (súlyos)	orca	5	10	PRM alapú MS módszer tervezése, optimalizálása
S12	D6	44	férfi	AD (középsúlyos)	comb	5	10	PRM alapú MS módszer tervezése, optimalizálása
S13	D7	34	férfi	H	homlok	5	10	PRM alapú MS módszer tervezése, optimalizálása
S14	D8	30	férfi	H	homlok	15	10	Fehérje elúció optimalizálása
S15	D8	30	férfi	H	homlok	15	10	Fehérje elúció optimalizálása
S16	D9	43	nő	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S17	D9	43	nő	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S18	D9	43	nő	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S19	D10	35	férfi	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S20	D10	35	férfi	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S21	D10	35	férfi	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S22	D11	41	nő	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S23	D11	41	nő	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S24	D11	41	nő	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise

S25	D12	42	férfi	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S26	D12	42	férfi	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S27	D12	42	férfi	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S28	D13	28	nő	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S29	D13	28	nő	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S30	D13	28	nő	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S31	D14	28	nő	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S32	D14	28	nő	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S33	D14	28	nő	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S34	D15	46	nő	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S35	D15	46	nő	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S36	D15	46	nő	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S37	D16	44	nő	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S38	D16	44	nő	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S39	D16	44	nő	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S40	D17	27	nő	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S41	D17	27	nő	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S42	D17	27	nő	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S43	D18	27	nő	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S44	D18	27	nő	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S45	D18	27	nő	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S46	D19	30	férfi	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise

S47	D19	30	férfi	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S48	D19	30	férfi	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S49	D20	26	nő	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S50	D20	26	nő	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S51	D20	26	nő	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S52	D21	49	férfi	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S53	D21	49	férfi	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S54	D21	49	férfi	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S55	D22	18	nő	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S56	D22	18	nő	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S57	D22	18	nő	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S58	D23	21	férfi	H	alkar	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S59	D23	21	férfi	H	homlok	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise
S60	D23	21	férfi	H	hónalj	5	10	Egészséges bőrrégiók AMP szintjének összehasonlító analízise

S – minta (sample); D – donor; H – egészséges (healthy)

Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/445/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Jenei Adrienn

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10055221

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Jenei, A.**, Kalló, G., Dajnoki, Z., Gáspár, K., Szegedi, A., Kapitány, A., Csósz, É.: Detection of Antimicrobial Peptides in Stratum Corneum by Mass Spectrometry.
Int. J. Mol. Sci. 22, 1-15, 2021.
IF: 5.923 (2020)
2. **Jenei, A.**, Dajnoki, Z., Medgyesi, B., Gáspár, K., Béke, G., Kinyó, Á., Méhes, G., Hendrik, Z., Dinya, T., Tőröcsik, D., Zouboulis, C. C., Prens, E. P., Bíró, T., Szegedi, A., Kapitány, A.: Apocrine Gland-Rich Skin Has a Non-Inflammatory IL-17-Related Immune Milieu, that Turns to Inflammatory IL-17-Mediated Disease in Hidradenitis Suppurativa.
J. Invest. Dermatol. 139 (4), 964-968, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2018.10.020>
IF: 7.143

További közlemények

3. Géczy, D., Nagy, B., Szilágyi, M., Penyige, A., Klekner, Á., **Jenei, A.**, Virga, J., Hádáné Birkó, Z.: Analysis of Circulating miRNA Profile in Plasma Samples of Glioblastoma Patients.
Int. J. Mol. Sci. 22 (10), 1-20, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22105058>
IF: 5.923 (2020)
4. Bukva, M., Dobra, G., Gomez-Perez, J., Koós, K., Harmati, M., Gyukity-Sebestyén, E., Bíró, T., **Jenei, A.**, Kormondi, S., Horváth, P., Kónya, Z., Klekner, Á., Buzás, K.: Raman Spectral Signatures of Serum-Derived Extracellular Vesicle-Enriched Isolates May Support the Diagnosis of CNS Tumors.
Cancers (Basel). 13 (6), 1407-1426, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13061407>
IF: 6.639 (2020)





5. Kapitány, A., Medgyesi, B., **Jenei, A.**, Somogyi, O., Szabó, L., Gáspár, K., Méhes, G., Hendrik, Z., Dócs, K., Szűcs, P., Dajnoki, Z., Szegedi, A.: Regional Differences in the Permeability Barrier of the Skin: implications in Acantholytic Skin Diseases.
Int. J. Mol. Sci. 22 (19), 1-15, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms221910428>
IF: 5.923 (2020)
6. Szivos, L., Virga, J., Hortobágyi, T., Zahuczky, G., Uray, I. P., **Jenei, A.**, Bognár, L., Árkosy, P., Klekner, Á.: Az inváziós spektrum prognosztikai jelentősége glioblastomában.
Ideggyogy. Szle. 73 (9-10), 317-325, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18071/ISZ.73.0317>
IF: 0.427
7. Gáspár, K., **Jenei, A.**, Khasawneh, A., Medgyesi, B., Dajnoki, Z., Janka, E. A., Szabó, I. L., Hendrik, Z., Méhes, G., Szegedi, A., Kapitány, A.: Comparison of Immune and Barrier Characteristics in Scalp and Skin Psoriasis.
Acta Derm.-Venereol. 100 (14), 1-7, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.2340/00015555-3553>
IF: 4.437
8. Dobra, G., Bukva, M., Szabó, Z., Bruszel, B., Harmati, M., Gyukity-Sebestyén, E., **Jenei, A.**, Szűcs, M., Horváth, P., Bíró, T., Klekner, Á., Buzás, K.: Small Extracellular Vesicles Isolated from Serum May Serve as Signal-Enhancers for the Monitoring of CNS Tumors.
Int. J. Mol. Sci. 21 (15), 1-20, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21155359>
IF: 5.923
9. Khasawneh, A., Baráth, S., Medgyesi, B., Béke, G., Dajnoki, Z., Gáspár, K., **Jenei, A.**, Pogácsás, L., Pázmándi, K. L., Gaál, J., Bácsi, A., Szegedi, A., Kapitány, A.: Myeloid but not plasmacytoid blood DCs possess Th1 polarizing and Th1/Th17 recruiting capacity in psoriasis.
Immunol. Lett. 189, 109-113, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.04.005>
IF: 2.436





10. Radócz, L., Tarcali, G., **Jenei, A.**: In Vitro Susceptibility of Different Oak Species to the Blight Fungus (*Cryphonectria parasitica*).
Acta Hortic. 866, 455-458, 2010.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 44,774

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
13,066**

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, 2021.09.29.



Függelék – Saját közlemények jegyzéke

Elsőszerzős közleményeim:

Jenei, A; Dajnoki, Zs; Megyesi, B; Gáspár, K; Béke, G; Kinyó, Á; Méhes, G; Hendrik, Z; Dinya, T; Törőcsik, D; Zouboulis, C.C.; Prens, E.P.; Bíró, T; Szegedi, A; Kapitány, A.

Apocrine gland-rich skin has a non-inflammatory IL-17 related immune milieu, which turns to inflammatory IL-17 mediated disease in hidradenitis suppurativa, *Journal of Investigative Dermatology*, 2019 Apr; 139(4): 964-968.
doi: 10.1016/j.jid.2018.10.020.

Jenei, A; Kalló, G; Dajnoki, Zs; Gáspár, K; Szegedi, A; Kapitány, A; Csósz, É.
Detection of antimicrobial peptides in stratum corneum by mass spectrometry. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22(8): 4233
doi: org/10.3390/ijms22084233