

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A humán faggyúmirigy-biológia új aspektusainak vizsgálata: fókuszban a nem-pszichotróp fitokannabinoidok és a nikotinsav**

Markovics Arnold

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás



DEBRECENI EGYETEM  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
Debrecen, 2020

**A humán faggyúmirigy-biológia új aspektusainak vizsgálata: fókuszban a nem-pszichotróp fitokannabinoidok és a nikotinsav**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Markovics Arnold okleveles molekuláris biológus

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

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

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus

tagok: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora

Dr. Szűts Viktória, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet  
2018. április 25. 11.00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, az MTA doktora

Dr. Juhász Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus

tagok: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora

Dr. Szűts Viktória, PhD

Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, az MTA doktora

Dr. Juhász Tamás, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet A épület  
tanterme, 2020. március 13. 13 óra.

## Bevezetés és irodalmi áttekintés

Laboratóriumunk hosszú ideje foglalkozik az emberi bőr különböző betegségeivel és azok molekuláris hátterével. Ezek közül a pattanásosság (akne) az egyik leggyakoribb emberi bőrbetegség. Noha nem közvetlenül életveszélyes, az akne súlyos formái nagymértékben ronthatják a betegek életminőségét, és másodlagos pszichés zavarokhoz vezethetnek. Tekintettel arra, hogy a jelenleg rendelkezésre álló terápiás készítmények (bár valóban hatékonyan enyhítik a betegség tüneteit) súlyos mellékhatásokat válthatnak ki, érthető, hogy nagy szükség van a faggyúmirigyek (FM) biológiájának mélyebb megértésére, valamint új, kedvező mellékhatásprofilú terápiás megoldások azonosítására.

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az endokannabinoid rendszer (ECS) és tágabb értelemben a komplex kannabinoid jelátvitel összetett módon szabályozza a FM-ek biológiai folyamatait. Az endokannabinoidok (eCB) lebontásának gátlása, valamint a direkt eCB kezelés fokozzák a faggyúlipid-szintézist. A neurológiai klinikai gyakorlatban már alkalmazott, nem-pszichotróp fitokannabinoid (pCB), a (-)-kannabidiol (CBD) alkalmazása ugyanakkor komplex anti-akne hatások (a faggyúlipid-termelés kvantitatív és kvalitatív normalizálása, anti-proliferatív és gyulladásgátló hatás) kialakulásához vezet *in vitro* (sejtenyészetben) és *ex vivo* (teljes vastagságú humán bőr szervkultúrában) is, amelyek a legújabb klinikai vizsgálatok eredményei alapján topikális alkalmazást követően *in vivo* is kialakulnak.

Tekintettel arra, hogy a CBD-n kívül más pCB-ok sebocitákra gyakorolt hatásairól nem voltak adatok az irodalomban, a jelen dolgozatban bemutatandó vizsgálat keretein belül több nem-pszichotróp pCB ((-)-kannabikromén [CBC], (-)-kannabidivarin [CBDV], (-)-kannabigerol [CBG], (-)-kannabigerovarin [CBGV] és (-)- $\Delta^9$ -tetrahidrokannabivarin [THCV]) biológiai hatásait elemeztük humán sebocitákon.

A nikotinsav (niacin; NA) és a nikotinamid a B3 vitaminkomplex tagjai, amelyek hiánya a hasmenéssel, elbutulással, bőrgyulladással és egy speciális FM rendellenességgel („dyssebacia”) jellemezhető pellagra kialakulásához vezet. A NA emellett farmakológiai dózisban alkalmazva (a „hydroxycarboxylic acid receptor 2” [HCA<sub>2</sub>] aktiválása révén) hatékony egyes diszlipidémiák kezelésében. Tekintettel arra, hogy a farmakológiai dózisban alkalmazott NA mellékhatásai között szerepel a bőrszárazság, míg a NA hiánya FM-rendellenesség kialakulásához vezethet, kísérleteink második felében azt vizsgáltuk meg, hogy a NA miként befolyásolja a szebociták biológiai folyamatait.

## Célkitűzés

A fentebb leírtak tükrében a jelen dolgozatban bemutatandó vizsgálatok keretein belül a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. A CBD-hez hasonlóan más nem-pszichotróp pCB-ok, nevezetesen a CBC, a CBDV, a CBG, a CBGV és a THCV is befolyásolják-e a humán szebociták biológiai folyamatait?
2. A NA befolyásolja-e a bazális (homeosztatikus), illetve az aknéra jellemző kórosan fokozott faggyúlipid-termelést, a sejtek proliferációját, esetleg a szebociták immunprofilját, és ha igen, a hatásait a HCA<sub>2</sub> receptoron keresztül fejti-e ki?

## **Anyagok és módszerek**

### **A humán immortalizált SZ95 szebociták tenyésztése és kezelése**

Az SZ95 szebocitákat Sebomed™ Basal Medium-ban tenyésztettük, amelyet 10 (V/V)% hővel inaktivált magzati szarvasmarha szérummal, 1 mM CaCl<sub>2</sub>-dal, 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktoral, valamint MycoZap™ Plus-CL-lel egészítettük ki. A tápoldatot kétnaponta lecseréltük, és - annak érdekében, hogy megelőzzük a tenyészetek konfluencia-indukált differenciálódását - a sejteket a 60-70%-os konfluenciaszint elérésekor passzáltuk. Tenyészeink esetleges *Mycoplasma* kontaminációját időről-időre teszteltük MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit segítségével, és minden esetben negatív eredményt kaptunk. A tenyésztést 5% CO<sub>2</sub> tartalmú, párasított légtérben, 37°C-on végeztük. Az esetleges nem-specifikus oldószerhatásokat kizárandó (a közvetlenül a tápoldatban oldott NA kivételével) minden anyagból ezerszeres töménységű törzsoldatot készítettünk, amiket a gyártó javaslata alapján -20°C-on vagy 4°C-on tároltunk. A törzsoldatokból közvetlenül a kezelés előtt készítettük el a szükséges munkaoldatokat a sejtek tápoldatában ezerszeres hígítást alkalmazva, és ügyelve arra, hogy az összehasonlítható kezelések mindig azonos „oldószerhátteren” valósuljanak meg. Kontrollként az anyagok oldószerével kezelt sejteket használtunk.

### **A szebociták intracelluláris lipidtartalmának meghatározása**

A lipidtermelés szemikvantitatív vizsgálatához fluoreszcens Nile Red jelölést alkalmaztunk. A sejteket speciális, fluoreszcens mérésekhez használatos 96 lyukú lemezre szélesztettük (20.000 sejt/lyuk; 24 és 48 órás kezelések), majd elvégeztük a megfelelő kezeléseket. A felülúszó eltávolítása után 100 µl PBS-ben oldott Nile Red oldatot (végkoncentráció: 1 µg/ml) mértünk a sejtekre, majd 30 percen keresztül 37°C-on inkubáltuk őket. Az egyes lyukak fluoreszcencia intenzitását FlexStation™ II<sup>384</sup> vagy FlexStation 3 készülék segítségével detektáltuk (excitáció: 485 nm; emisszió: 565 nm).

### **Az életképesség vizsgálata (MTT-assay)**

A sejteket 96 lyukú lemezekre szélesztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban, majd a megfelelő anyagok különböző koncentrációival kezeltük őket. A felülúszó eltávolítása után minden lyukba 100 µl PBS-ben oldott MTT oldatot (végkoncentráció: 0,5 mg/ml) pipettáztunk, és 37°C-on 2-3 órán át inkubáltuk a sejteket. Ezután az MTT oldatot eltávolítottuk, minden lyukhoz 100 µl „MTT szolubilizáló oldatot” adtunk, és feloldottuk sejtekben keletkező formazán kristályokat, amelyek mennyiségét 565 nm-en mérve kolorimetriás úton határoztuk meg a korábban már említett FlexStation 3 készülék segítségével.

### **Az apoptózis és nekrozis vizsgálata**

Kísérleteink során az apoptotikus folyamatok vizsgálatára a mitokondriális membránpotenciál fluoreszcens mérését végeztük el MitoProbe™ DilC<sub>1</sub>(5) Assay Kit segítségével. Az apoptózis mellett ugyanazon mintákban az esetleges nekrotikus folyamatok felléptét is megvizsgáltuk a DilC<sub>1</sub>(5) festés mellett szimultán alkalmazott fluoreszcens SYTOX Green jelöléssel, ami a membránok nekrozisra jellemző dezintegrálódásakor tud a sejtmagi DNS-hez kötödni. A szebocitákat 20.000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük 96 lyukú lemezekre, majd a jelzett módokon kezeltük őket. A felülúszó eltávolítása után a sejteket 30 percig inkubáltuk 37°C-on PBS-ben hígított DilC<sub>1</sub>(5) (1:200) és SYTOX Green (1 µM) reagensekkel (50 µl/lyuk). Az inkubáció végeztével 100 µl/lyuk PBS-sel kétszer mostuk a sejteket, és FlexStation 3 készülék segítségével lemértük a fluoreszcencia intenzitást (DilC<sub>1</sub>(5) excitáció/emisszió: 630/670 nm; SYTOX Green excitáció/emisszió: 490/520 nm). Az apoptózis és a nekrozis pozitív kontrolljaként rendre CCCP (1:200; 37°C 30 perc), illetve lízis puffer kezelést (1:100; 37°C 30 perc) alkalmaztunk.

### **A proliferáció meghatározása (CyQUANT proliferációs assay)**

A sejteket 96 lyukú lemezekre szélesztettük 2.000 sejt/lyuk denzitásban, és a jelzett módokon kezeltük őket. Ezt követően a felülúszót eltávolítottuk, majd a

lemezeket a mérésig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on helyeztük el, ami permeabilizálta a sejteket. Ezután a gyártó protokollja szerint hígított „CyQUANT GR stock solution” munkaoldatból  $200\ \mu\text{l}$ -t mértünk minden wellbe, majd öt percig szobahőn fénytől védve inkubáltuk a lemezeket. A fluoreszcencia intenzitást FlexStation 3 készülék segítségével detektáltuk (excitáció:  $480\ \text{nm}$ ; emisszió:  $520\ \text{nm}$ ).

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

A reverz transzkripciót követő, kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakciót Roche LightCycler 480 System segítségével, 5' nukleáz assay használatával végeztük. A teljes RNS-t TRIzol felhasználásával izoláltuk, majd DNáz kezelést végeztünk. Ezt követően az RNS  $1\ \mu\text{g}$ -jából kiindulva állítottunk elő cDNS-t. A Q-PCR reakciót TaqMan assay-kkel végeztük. Belső kontrollként a 18S RNS vagy a GAPDH expresszióját határoztuk meg.

### **Immunfluoreszcens jelölés (IF)**

A sejteket PBS-ben hígított 4%-os paraformaldehid segítségével fixáltuk nedveskamrában, szobahőmérsékleten (5 perc). Az aspecifikus kötőhelyek blokkolását PBS-sel történő mosás után  $30\ \text{mg/ml}$  BSA-t (szarvasmarha szérum albumint) tartalmazó PBS oldattal végeztük (30 perc szobahőn, nedveskamrában). A sejteket 4 órán át inkubáltuk  $37^{\circ}\text{C}$ -on nyúlban termeltetett humán HCA<sub>2</sub> elleni elsődleges antitesttel. Ezután a fedőlemezeket háromszor mostuk PBS-ben, majd 60 percen keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-cal konjugált, nyúl immunglobulin Fc-szakasza elleni másodlagos antitesttel és a magfestőként alkalmazott 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) tartalmazó Vectashield fedőmédiummal. Végül ismét háromszori PBS-es mosást követően, a sejtekről egy Olympus IX81 típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk (excitáció/emisszió:  $488/519\ \text{nm}$  [Alexa Fluor<sup>®</sup> 488] és  $360/460\ \text{nm}$  [DAPI]). Negatív kontrollként az elsődleges antitest kihagyásával megfestett fedőlemezeinket használtuk. A képek átlagos szürke értékét (a zöld

csatornában detektálva, ugyanolyan beállításokat használva minden kép expozíciója során) *Fiji szoftver* segítségével határoztuk meg, majd kvantifikáláskor a háttérre (azaz a sejtmentes terület átlagos szürke értékére) normáltuk.

### **A citokin-felszabadulás vizsgálata (IL-6 és IL-8 ELISA)**

A citokin-felszabadulás vizsgálata során a standardizált módon (500.000 sejt 1,5 ml tápoldatban, 35 mm átmérőjű Petri-csészékben) szélesztett sejteket a jelzettek szerint kezeltük 3, illetve 24 órán keresztül. Ezt követően a felülúszókat begyűjtöttük, lecentrifugáltuk (500 g; 10 perc), és a törmelékmentes felülúszót -80°C-on tároltuk, majd OptEIA kitek segítségével, a gyártó protokollját követve meghatároztuk a felszabadult IL-6 és IL-8 mennyiségét.

### **Szelektív géncsendesítés (siRNS transzfekció)**

Az SZ95 szebocitákat Petri-csészékbe, 96 lyukú lemezekre vagy 6 lyukú tenyésztőedényekbe helyezett steril fedőlemezekre szélesztettük, majd másnap, 50-70%-os konfluenciaszinten a tápoldatot szérummentes OptiMem médiumra cseréltük, és a sejteket HCA<sub>2</sub>-re specifikus, duplaszálú, kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal transzfektáltuk Lipofectamine<sup>®</sup> RNA<sub>i</sub> MAX transzfekciós reagens segítségével. Kontrollként a sejteket Stealth RNA<sub>i</sub> Negative Control „medium” duplaszálú siRNS-sel transzfektáltuk, ami semmilyen ismert mRNS szekvenciájával sem mutat homológiát. A géncsendesítés hatékonyságát a transzfekciót követően 2. és 3. napon ellenőriztük mRNS (Q-PCR), illetve a fehérje szinten (immunfluoreszcens jelölés).

### **Fluoreszcens Ca<sup>2+</sup>-mérés**

A NA Ca<sup>2+</sup>-homeosztázisra gyakorolt hatásainak vizsgálatához Fluo-4 AM jelölést használtunk. A szebocitákat 96 lyukú lemezekre szélesztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban. A mérés során a felülúszó eltávolítása után egyszer mostuk a sejteket 100 µl/lyuk Hank oldattal, melyet BSA-val és a nem-specifikus transzporterek által mediált Fluo-4 „szivárgás” elkerülésére probeneciddel

egészítettünk ki. A mosást követően Fluo-4 AM-et tartalmazó Hank oldattal (100  $\mu$ l/lyuk; végkoncentráció: 1  $\mu$ M) töltöttük fel a sejteket (30 perc, 37°C), majd újabb három mosási lépés következett (100  $\mu$ l/lyuk Hank oldat vagy névlegesen  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes Hank oldat, amibe  $\text{CaCl}_2$  helyett ekvimoláris glükóz került). Végül a sejtekre 150  $\mu$ l/lyuk Hank oldatot vagy névlegesen  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes Hank oldatot mértünk, és újabb 30 percig inkubáltuk őket 37°C-on. Ezt követően FlexStation 3 készülék segítségével szobahőmérsékleten (20-22°C), „Flex” módban végeztük el a mérést (excitáció: 490 nm; emisszió: 520 nm).

### **Statisztikai analízis**

Az adatokat az IBM SPSS Statistics 19, illetve Origin Pro Plus 6.0 szoftver segítségével, Student-féle kétoldalú, kétmintás *t*-próbával (páros összehasonlítások) vagy egyutas ANOVA-t követő Bonferroni *post hoc* tesztekkel (többszörös összehasonlítás) vizsgáltuk, és a  $p < 0,05$  értékeket tekintettük szignifikáns különbségnek. A grafikonokat Origin Pro Plus 6.0 szoftver segítségével ábrázoltuk.

## Eredmények

### A pCB-ok dóziszfüggő-módon befolyásolják a szebociták életképességét

Korábbi eredményeink alapján fény derült arra, hogy a humán FM-ek funkcionálisan aktív ECS-rel rendelkeznek, amely szerepet játszik a szebociták differenciációjának és ezen keresztül lipidtermelésének szabályozásában. Kimutattuk továbbá, hogy a nem-pszichotróp pCB CBD alacsony mikromoláris koncentrációban történő alkalmazása komplex anti-akne hatások kialakulásához vezet. Ennek megfelelően kísérleteink kezdetén arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az általunk választott öt pCB hasonló hatásokat produkál-e az SZ95 szebocitákon, mint a CBD. Mint minden hatóanyag-vizsgálat kezdetén, itt is meg kívántuk határozni azt a még hatásos dózistartományt, amely szignifikánsan nem hat a sejtek életképességére, ezért először MTT-assay-t végeztünk. Az öt kiválasztott pCB a 0,1-10  $\mu\text{M}$ -os koncentrációtartományban még 48 óra elteltével sem csökkentette érdemben a sejtek életképességét a kontrollhoz képest. Ezzel szemben magasabb (50-100  $\mu\text{M}$ -os) koncentrációban alkalmazva már 24 órás kezeléseket követően is szignifikáns csökkenést okoztak az MTT-jel intenzitásában. A magasabb koncentrációtartományban végzett MTT-assay eredményei alapján felmerült, hogy a pCB-ok alkalmazása akár az alacsonyabb,  $\leq 10$   $\mu\text{M}$ -os koncentrációkban is elindíthat az MTT-assay-n még változást nem okozó, korai sejthalál folyamatokat. Ennek a kérdésnek az eldöntésére kombinált DilC<sub>1</sub>(5)-SYTOX Green jelölést végeztünk. Megállapítottuk, hogy 10  $\mu\text{M}$ -ig a választott pCB-ok egyike sem növelte biológiailag releváns mértékben a nekrotikus vagy apoptotikus sejtek arányát. A pCB-ok magasabb (50-100  $\mu\text{M}$ ) koncentrációi ugyanakkor apoptózis-domináns sejthalált okoztak, hiszen kivétel nélkül jelentősen csökkentették a mitokondriális membránpotenciál mértékét jelző DilC<sub>1</sub>(5), és nem (CBG, CBGV, CBC és CBDV) vagy csak kis mértékben (THCV) fokozták a SYTOX Green jelintenzitását.

## **A pCB-ok eltérően befolyásolják a humán sebociták faggyúlipid-termelését**

Ezután megvizsgáltuk a pCB-ok hatását a sebociták egyik legjellemzőbb biológiai funkciójára, a homeosztatis faggyúlipid-termelésre. Nem meglepő módon a pCB-ok citotoxikus ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ) koncentrációi jellemzően jelentősen csökkentették a bazális faggyúlipid-szintézist. Ezzel szemben a nem citotoxikus ( $\leq 10 \mu\text{M}$ ) koncentrációban alkalmazott pCB-ok érdekes módon eltérően befolyásolták, ami alapján az öt anyagot három funkcionálisan eltérő hatású („eCB-szerű”, lipogén; „CBD-szerű”, neutrális; illetve liposztatis) csoportba sorolhattuk. Eredményeink szerint az „eCB-szerűen” viselkedő CBG és a CBGV kis, de szignifikáns mértékben fokozta a faggyúlipid-termelést. Ezzel szemben a „CBD-szerű” hatást kiváltó CBDV esetében a változás nem volt szignifikáns, míg a CBC és a THCV szignifikánsan csökkentette azt. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a CBC és a THCV szeborrea, illetve akne, míg a CBG és a CBGV a bőrszárazsággal járó kórképekben rendelkezhet terápiás potenciállal, ezért kísérleteinket is ilyen irányokban folytattuk tovább.

## **A CBG és a CBGV csökkenti az AEA lipogén hatását**

Elsőként a CBG és a CBGV meglepő, „eCB-szerű” lipogén hatását vettük górcső alá, és megvizsgáltuk, hogy az eCB AEA-dal együtt alkalmazva milyen hatást váltanak ki. Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy a CBG és a CBGV nem fokozta az AEA lipogén hatását, sőt, 20 (CBGV), illetve 10-20  $\mu\text{M}$ -ban (CBG) szignifikánsan csökkentették azt. Ennek alapján felvetődik annak a lehetősége, hogy a CBG és a CBGV az AEA lipogén útvonalának gyenge, parciális aktivátorai lehetnek.

## **A CBC, a CBDV és a THCV csökkenti az AA által indukált, aknét modellező, kórosan fokozott lipogenezist**

Mint már említettük, az akne patogenezisének fontos lépése a faggyútermelés fokozódása és jellegzetes minőségi változása, ezért ennek a

normalizálása a betegség kezelésének egyik fontos célja. Ennek megfelelően a következőkben megvizsgáltuk, hogy a THCv, a CBC és a CBDV miként befolyásolja az AA által indukált, „akne-szerű”, kórosan fokozott lipidszintézist. Megállapítottuk, hogy mind a CBC, mind a CBDV csökkentette az AA által indukált lipidszintézist, azonban hatékonyságukat messze meghaladta a THCv-é, amely a CBD-hez hasonlóan gyakorlatilag teljes mértékben normalizálta a faggyúlipid-termelést. Tekintettel arra, hogy ezen eredmények alapján a THCv bizonyult a három pCB közül a leghatékonyabbnak, következő kísérleteink során a THCv nem citotoxikus koncentrációinak lehetséges anti-akne hatásait vizsgáltuk meg.

### **A THCv nem citotoxikus koncentrációban univerzális liposztikus hatást fejt ki**

A következőkben kísérleteket végeztünk annak megállapítására, hogy a THCv ezen figyelemre méltó liposztikus hatása kizárólag az AA által indukált, döntően protein kináz C  $\delta$  által mediált lipidtermelés kivédésére korlátozódik, vagy egy univerzális liposztikus útvonal aktiválása révén alakult ki. Ennek során két, az AA-tól eltérő lipogén útvonalon ható eCB-ot, az AEA-ot és a 2-AG-t alkalmazva végeztük el a Nile Red jelölést. Azt tapasztaltuk, hogy a CBD-hez hasonlóan a THCv is képes mindkét eCB lipogén hatásának normalizálására, azaz univerzális liposztikus hatást mutat.

### **A THCv nem citotoxikus koncentrációi anti-proliferatív hatásúak humán szebocitákon**

Az aknéhoz vezető szeborrea kialakulásában (a holokrin szekréciós mechanizmus miatt) az individuális szebociták fokozott lipidtermelésén túl a sejtek proliferációja is meghatározó jelentőségű. A proliferáció csökkentése ilyen módon önmagában is nagy hatékonysággal lehet képes mérsékelni *in vivo* a faggyútermelést, ezért kísérleteink következő lépéseként megvizsgáltuk a THCv sejtszámra gyakorolt hatásait. CyQUANT proliferációs assay alkalmazásával

kimutattuk, hogy a THCv dózisfüggő módon csökkentette a szebociták proliferációját az 1-10  $\mu\text{M}$ -os koncentrációtartományban.

### **A THCv erőteljes gyulladásgátló hatást mutat**

A kórosan megnövekedett lipogenezis és proliferáció mellett az akne harmadik fontos szebocita-specifikus lépése a gyulladás, ezért a fenti adatok alapján megvizsgáltuk a THCv szebociták immunprofiljára gyakorolt hatásait. A gyulladást a TLR4 aktivátor lipopoliszacharid (LPS; 5  $\mu\text{g/ml}$ ) alkalmazásával váltottuk ki. Azt tapasztaltuk, hogy a THCv képes volt visszazorítani a vizsgált „akne-releváns” gyulladást okozó citokinek (jelesül az interleukin [IL]-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 és tumornekrózis faktor [TNF]- $\alpha$ ) LPS indukálta up-regulációját (Q-PCR; *IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-8*, *TNF- $\alpha$* ) és felszabadulását (ELISA; IL-6, IL-8) is. Mindezek alapján tehát elmondható, hogy (legalábbis *in vitro*) a THCv kedvezően befolyásolja az akne patogenezisének valamennyi szebocita-specifikus aspektusát.

### **Előzetes eredményeink alapján valamennyi vizsgált pCB gyulladásgátló hatású humán szebocitákon**

A pCB-ok hatásait feltáró kísérleteink zárásaként megvizsgáltuk, hogy a CBC, a CBDV, a CBG és a CBGV miként befolyásolja a szebociták immunológiai viselkedését. A THCv esetén már bemutatott gyulladásmodell alkalmazva megállapítottuk, hogy valamennyi pCB jelentősen csökkentette az LPS hatását a fenti, „akne-releváns” citokinek mRNS szintű kifejeződésére.

### **A NA 100 $\mu\text{M}$ -os koncentrációig nem csökkenti az életképességet**

Kísérleteink második felében a klinikai gyakorlatban lipidcsökkentő szerként már évtizedek óta alkalmazott NA humán szebocitákra gyakorolt biológiai hatásainak vizsgálatát végeztük el. MTT-assay segítségével megállapítottuk, hogy a NA 100  $\mu\text{M}$ -os koncentrációig nem csökkentette a szebociták életképességét 24, 48 és 72 órás kezelést követően sem.

Annak érdekében, hogy kizárjuk a korai sejthalál-folyamatok kialakulásának lehetőségét, kombinált fluoreszcens DilC<sub>1</sub>(5)-SYTOX Green jelöléssel tovább vizsgáltuk a NA hatásait. Megállapítottuk, hogy az MTT-assay-vel nyert adatainkkal összhangban a NA nem fokozta az apoptotikus vagy nekrotikus sejtek arányát, megerősítve, hogy ebben az idő- (24-48 h) és koncentrációtartományban (1-100 µM) valóban a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható.

### **A NA nem befolyásolja a homeosztatisz faggyúlipid-termelést, de normalizálja a különféle lipogén ágensekkel indukált, aknét utánzó lipogenezist**

Ezt követően fluoreszcens Nile Red jelölés segítségével megvizsgáltuk a NA hatásait a sebociták legjellemzőbb biológiai funkciójára, azaz a bazális, homeosztatisz faggyúlipid-termelésre. Megállapítottuk, hogy ha a fentiekben meghatározott nem citotoxikus koncentrációban alkalmazzuk a NA-at, akkor az még 48 órás kezelése során sem befolyásolja a faggyúlipid-termelést.

Tekintettel arra, hogy (amint arról már a fentiekben is szó esett) az akne patogenezisének egyik kulcslépése a kórosan fokozott faggyútermelés, a következőkben megvizsgáltuk, hogy a NA képes-e visszaszorítani az AA által indukált, aknét utánzó lipidszintézist. Megállapítottuk, hogy a NA előzőekben azonosított, nem-citotoxikus koncentrációi jelentősen csökkentették az AA-val indukált, „akne-szerű”, kórosan fokozott lipidszintézist.

### **A NA univerzális liposztatikus hatást fejt ki**

Ahogy az az előző, pCB-okkal folytatott kísérletsorozatban is tettük, itt is kíváncsiak voltunk arra, hogy a NA ezen figyelemre méltó liposztatikus hatása kizárólag az AA-val indukált, döntően a PKC $\delta$  által közvetített lipogenezis normalizálására korlátozódik, vagy egy univerzális liposztatikus út aktiválása révén alakult ki. A kérdés eldöntésére olyan lipogén ágenseket (a már említett AEA, valamint a linolsav [LA] és a tesztoszteron [T] kombinációja) alkalmazzunk, amelyek irodalmi adatok alapján más (AEA: CB<sub>2</sub>; LA+T: PPAR-

ok) jelátviteli útvonalakat aktiválva fokozzák a faggyúlipid-termelést. Megállapítottuk, hogy mind az AEA, mind a LA+T kombináció jelentősen fokozta a faggyúlipid-termelést, a NA pedig mindkét esetben képes volt ezt a hatást kivédeni. Mindezek fényében elmondható, hogy a NA minden valószínűség szerint univerzális liposztatikus hatást fejt ki.

### **A NA csökkenti a humán szebociták proliferációját**

Az előzőekben leírt hatásokat látva arra a következtetésekre jutottunk, hogy a NA hatásos lehet a faggyúmirigy-túlműködéssel járó kórképek (pl. szepborrea vagy akne) kezelésében. Tekintettel arra, hogy a faggyútermelés holokrin mechanizmusa miatt a faggyú tényleges mennyisége nemcsak az egyedi sejtek lipidtermelésétől, hanem azok számától is alapvetően függ, így egy szepborrea ellenes szer hatékonyságát nagyban növeli, ha nemcsak liposztatikus, hanem anti-proliferatív hatású is. Ezen logikát követve a NA sejtszámra gyakorolt hatásait CyQUANT proliferációs assay alkalmazásával vizsgáltuk, és kimutattuk, hogy kis de szignifikáns mértékben csökkentette a szebociták proliferációját a 10-100  $\mu\text{M}$ -os koncentrációtartományban. Figyelemre méltó továbbá, hogy az életképesség adatokkal összhangban a sejtszám nem csökkent a 24 órás kontroll szintje alá, megerősítve ezzel, hogy valóban nem citotoxikus, hanem „tisztán” anti-proliferatív hatással állunk szemben.

### **A NA nem védi ki a szebociták LPS-sel indukált gyulladási választ**

Ahogy arról már korábban szó esett, a kórosan fokozott faggyúlipid-termelés mellett az akne kialakulásának másik fontos tényezője a gyulladás. Ezt szem előtt tartva fenomenológiai kísérleteink zárásaként megvizsgáltuk, hogy a NA miként befolyásolja a szebociták immunprofilját.

A gyulladási válaszreakciót a korábban ismertetett protokollunkat követve jelen esetben is 5  $\mu\text{g/ml}$  LPS-sel váltottuk ki, majd expressziós (*IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-8* és *TNF- $\alpha$* ; Q-PCR; 3 órás kezelések) és szekréción (IL-6 és IL-8; ELISA;

3 és 24 órás kezelések) szinten vizsgáltuk a gyulladásos citokinek termelődésének változásait.

Megállapítottuk, hogy a 100  $\mu\text{M}$ -ban alkalmazott NA nem csökkentette a fenti citokinek LPS-indukálta fokozott termelődését, és önmagában történő alkalmazás esetén sem fejtett ki érdemi hatást a génexpresszióra. Megvizsgáltuk azt is, hogy a NA miként befolyásolja két kulcsfontosságú citokin, az IL-6 és IL-8 felszabadulását, amelyek révén újabb adatok alapján a szebociták részt vesznek a  $\text{Th}_{17}$  sejtek aktivitásának szabályozásában. Az mRNS-szintű adatokkal összhangban sem rövid (3 órás), sem pedig hosszabb távú (24 órás) kezelések során nem tapasztaltunk semmilyen NA-függő hatást a citokinek felszabadulására, tehát eredményeink alapján a NA nem befolyásolja közvetlenül a humán szebociták gyulladásos és immunológiai folyamatait.

### **A NA liposztatikus hatása $\text{Ca}^{2+}$ -függő módon alakul ki**

A jelenség leírását követően kísérleteinket a lehetséges mechanizmus vizsgálatával folytattuk. Tekintettel arra, hogy saját, illetve irodalmi adatok alapján az  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$  emelkedése gyakran a fentiekben ismertetetthez nagyon hasonló univerzális liposztatikus hatásokhoz vezet, a NA pedig bizonyos sejtípusokban bizonyítottan képes megemelni az intracelluláris kalcium szintet, felmerült a kérdés, hogy az  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$  változásai szerepet játszanak-e a NA liposztatikus hatásainak közvetítésében. A kérdés megválaszolására elsőként megismételtük a lipidszintézis vizsgálatát egy sejtekbe bejutni képes  $\text{Ca}^{2+}$ -kelátor, a BAPTA AM jelenlétében. Megállapítottuk, hogy a NA liposztatikus hatása 10  $\mu\text{M}$  BAPTA AM jelenlétében nem alakult ki, így feltételezhető, hogy a hatás kialakításában  $\text{Ca}^{2+}$ -kapcsolt jelpályák (is) szerepet játszhatnak.

### **A NA $\text{Ca}^{2+}$ -jelet vált ki humán szebocitákon, amelynek a forrása döntően az extracelluláris tér, de nem TRP csatorna-mediált**

Mivel az előzőekben ismertetett eredmények alapján valószínűnek tűnt, hogy a NA alkalmazása  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet válthat ki a szebocitákon, következő lépésként

Fluo-4 AM jelölést alkalmaztunk. Azt tapasztaltuk, hogy a NA hatékony liposztatikus koncentrációi dóziszfüggő módon fokozták az  $[Ca^{2+}]_{IC-t}$ .

Következő kérdésünk az előző kísérletben tapasztalt  $Ca^{2+}$  jel eredetének azonosítására irányult. A kísérletet névlegesen  $Ca^{2+}$ -mentes közegben elvégezve azt tapasztaltuk, hogy az  $[Ca^{2+}]_{EC}$  csökkentése szinte teljes mértékben kivédte a  $Ca^{2+}$  jelet, ami arra utalt, hogy a NA közvetve vagy közvetlenül sejtfelszíni  $Ca^{2+}$  csatornákat aktivál humán szebocitákon. A NA-ról ismert, hogy képes aktiválni bizonyos, a vanilloid alcsaládba tartozó, főként  $Ca^{2+}$ -ra permeábilis tranziens receptorpotenciálú (TRP) csatornákat, és hogy ezen csatornák közül több (TRPV1, TRPV3 és TRPV4) is hatékonyan csökkenti a faggyúlipid-termelést.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk ezen csatornák esetleges részvételét a folyamatban, kísérleteinket az általános TRP csatorna gátlószer ruténium vörös (RR) jelenlétében is elvégeztük. Megállapítottuk, hogy a RR nem befolyásolta a NA által indukált kalciumjeleket, ami arra utal, hogy azokért valószínűleg eddig nem azonosított, nem-TRPV sejtfelszíni  $Ca^{2+}$  csatornák lehetnek felelősek.

### **A szebociták kifejezik a NA elsődleges receptorát, a HCA<sub>2</sub>-t**

Mivel a fentiekben bemutatott adataink fényében valószínűtlennek tűnt a TRPV-csatornák részvétele a NA liposztatikus hatásainak közvetítésében, így a következőkben a NA elsődleges receptoraként számon tartott HCA<sub>2</sub> lehetséges szerepét vizsgáltuk meg. Q-PCR és immunfluoreszcens jelölés segítségével megállapítottuk, hogy a HCA<sub>2</sub> mind mRNS, mind fehérje szinten jelen van a humán szebocitákon.

### **A HCA<sub>2</sub> szelektív géncsendesítése kivédi a NA liposztatikus és $[Ca^{2+}]_{IC-t}$ növelő hatását**

Tekintettel arra, hogy a HCA<sub>2</sub> receptor ellen nem állnak rendelkezésre hatékony és szelektív antagonisták, siRNS transzfekció-mediált szelektív „géncsendesítés”-t alkalmaztunk, ami szignifikáns csökkenést eredményezett a HCA<sub>2</sub> kifejeződésében mRNS és fehérje szinten is. A géncsendesítés

sikerességének ellenőrzése után SCR-transzfektált, valamint HCA<sub>2</sub> géncsendesített szebocitákat vizsgálva megállapítottuk, hogy a NA celluláris hatásai valóban HCA<sub>2</sub>-mediáltak volt, hiszen a receptor kifejeződésének csökkentésekor a NA liposztatikus hatása, valamint az általa kiváltott Ca<sup>2+</sup>-jel is szignifikánsan csökkent.

### **Sem a NA, sem az AA nem befolyásolja a HCA<sub>2</sub> receptor expresszióját**

Ezen eredményeink alapján a HCA<sub>2</sub> a humán faggyúlipid-termelés egy új, eddig ismeretlen regulátora, ami alapján felmerül, hogy kifejeződésének és aktivitásának változásai szerepet játszhatnak olyan lipogén ágensek hatásainak a közvetítésében, mint az AA. Ennek eldöntésére jelen kísérleteink lezárásaként azt vizsgáltuk, hogy az AA-val, illetve a NA-val történő kezelések miként befolyásolják a HCA<sub>2</sub> expressziót humán szebocitákon. Megállapítottuk, hogy egyik kezelés sem gyakorolt érdemi hatást a receptor fehérje szintű kifejeződésére.

## Diszkusszió

Az akne az egyik leggyakoribb emberi bőrbetegség, amely, bár az életet közvetlenül nem veszélyeztető kórállapot, mégis jelentős mértékben képes rontani a betegek életminőségét. Tekintettel arra, hogy a jelenleg rendelkezésre álló leghatékonyabb kezelési módok (pl. az orális izotretinoin) alkalmazása adott esetben súlyos mellékhatások kialakulásához vezethet, érthető, hogy világszerte jelentős erőfeszítések történnek biztonságos, de mégis hatékony, az eddigiektől eltérő hatásmechanizmussal működő, új anti-akne szerek kifejlesztésére.

### A kiválasztott nem-pszichotróp pCB-ok hatásainak áttekintése

Az ECS összetett módon befolyásolja a humán sebociták biológiai folyamatait: az eCB kezelés, illetve az eCB tónus fokozása növeli a faggyúlipid-termelést, míg az ionotróp kannabinoid receptorok közé tartozó TRPV1, TRPV3 és TRPV4 aktiválása csökkenti azt. Kimutattuk azt is, hogy a leginkább tanulmányozott és a neurológiai klinikai gyakorlatban már évek óta biztonságosan alkalmazott nem-pszichotróp pCB, a CBD alkalmazása komplex celluláris anti-akne hatások kialakulásához vezet, amelyek az eddig elérhető klinikai vizsgálati adatok fényében *in vivo* is nagy valószínűséggel kialakulnak. Mindezek figyelembevételével a jelen dolgozat alapjául szolgáló kísérletek első felében azt vizsgáltuk, hogy a CBD-n kívül más növényi eredetű, nem-pszichotróp pCB-oknak is lehetnek-e anti-akne hatásai. Elsőként megállapítottuk, hogy 50-100  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban mind az öt vizsgált pCB apoptózis-domináns sejthalált okoz,  $\leq 10$   $\mu\text{M}$ -ban azonban a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazhatóak. Kimutattuk azt is, hogy ezekben a nem-citotoxikus koncentrációkban a pCB-ok eltérően befolyásolták a lipidszintézist. A CBG és a CBGV „eCB-szerű” módon viselkedve kis, de szignifikáns mértékben növelte a lipogenezist; a „CBD-szerű”-nek mutatózó CBDV-nek nem volt szignifikáns hatása, míg a liposztatikus CBC és a THCV csökkentette a bazális faggyúlipid-szintézist. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a CBG és a CBGV kedvező hatással lehetnek a bőrszárazsággal

járó kórképekben, míg a CBC-nek és különösen a THCV-nek anti-akne hatásai lehetnek. Megállapítottuk, hogy a nem-citotoxikus koncentrációban alkalmazott CBC, CBDV és THCV egyaránt szignifikánsan csökkentette az AA lipogén hatását. A három pCB közül a leghatékonyabbnak bizonyuló THCV hatásait tovább vizsgálva kimutattuk, hogy minden valószínűség szerint (a CBD-hez hasonlóan) egy univerzális liposztikus jelpályát aktivál, hiszen nemcsak az AA, hanem az ettől részben független jelátviteli útvonalat aktiváló eCB AEA és 2-AG hatását is normalizálta. Tekintettel arra, hogy a THCV nem-citotoxikus, hatékony liposztikus koncentrációi dózisfüggő módon anti-proliferatív hatást váltottak ki, adataink arra utaltak, hogy a THCV akár *in vivo* is hatékonyan csökkentheti a faggyútermelést. Kísérleteink következő szakaszában kimutattuk, hogy a THCV nagy hatékonysággal csökkenti a szebociták LPS-sel indukált gyulladásos válaszát nemcsak mRNS, de fehérje szinten is. Összességében tehát eredményeink azt mutatták, hogy a THCV a CBD-vel összemérhető hatékonysággal az akne összes szebocita-specifikus aspektusát kedvezően befolyásolta.

Amint arról fentebb már szó esett, kutatásaink érdekes funkcionális heterogenitást tártak fel a pCB-ok között. Szemben a másik három anyaggal, a CBG és a CBGV ugyanis „eCB-szerűen” viselkedett, és kis, de szignifikáns mértékben fokozta a szebociták faggyúlipid-szintézisét. Tekintettel arra, hogy mRNS-szinten nyert adataink szerint a CBG és a CBGV (valamint a CBC és a CBDV is) hatékonyan csökkenti a szebociták LPS-sel kiváltott gyulladásos válaszát, eredményeink alapján felmerül, hogy ezek a vegyületek alkalmasak lehetnek egyes bőrszárazsággal és gyulladással kísért kórképek (pl. atópiás dermatitisz) kiegészítő kezelésére.

Eredményeink klinikai transzlálhatóságával kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy a pCB-ok még orális alkalmazás esetén is jól tolerálhatók, a humán vizsgálatokban topikálisan alkalmazott CBD pedig kiemelkedően

biztonságosnak bizonyult. Tekintettel arra, hogy valamennyi pCB erősen lipofil vegyület, ezért helyi alkalmazás esetén valószínűleg a transzfollikuláris úton jutnak a bőrbe, és jó eséllyel felhalmozódnak a lipidekben gazdag FM-ekben. Ezen fizikokémiai tulajdonságaik a pCB-okat ideális, szelektíven a FM-eket megcélzó gyógyszerjelöltekké teszik, ami minimalizálhatja a szisztémás mellékhatások felléptének kockázatát.

### **A NA humán szebocitákra gyakorolt hatásainak áttekintése**

Kísérleteink második felében a NA biológiai hatásainak vizsgálata állt az érdeklődésünk középpontjában. Kimutattuk, hogy a NA  $\leq 100 \mu\text{M}$ -os koncentrációig nem befolyásolja a szebociták életképességét; nem indukál korai sejthalál folyamatokat; nem befolyásolja a bazális, homeosztatisz faggyúlipid-termelést; ugyanakkor normalizálja az AA-val indukált, aknét modellező, kórosan fokozott lipidszintézist. A NA nem-citotoxikus koncentrációinak liposztatisz hatása ráadásul univerzálisnak bizonyult, hiszen nemcsak az AA, hanem az ettől részben független jelpályákat aktiváló AEA (CB<sub>2</sub>), illetve LA+T kombináció (PPAR-ok) hatását is kivédte. Végezetül kimutattuk azt is, hogy a NA fenti, nem-citotoxikus koncentrációi dózisfüggő módon csökkentették a szebociták proliferációját, ami alapján felmerül, hogy *in vivo* is hatékony lehet a kórosan fokozott faggyútermelés normalizálásában.

A látott kedvező hatások mechanizmusát kutatva elsőként a NA Ca<sup>2+</sup>-homeosztázisra gyakorolt hatásait vizsgáltuk meg, hiszen a mi munkacsoportunk és mások korábbi eredményei alapján az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>IC</sub> emelkedése a most látottakhoz nagyon hasonló liposztatisz hatások kialakulásához vezethet. Megállapítottuk, hogy a NA lipidszintézist csökkentő hatása valóban Ca<sup>2+</sup>-függő módon alakult ki, hiszen a Ca<sup>2+</sup>-kelátor BAPTA AM-mel történő együttes kezelés esetén a hatás nem jelentkezett. Kimutattuk azt is, hogy a NA liposztatisz koncentrációi dózisfüggő módon fokozzák a humán szebociták [Ca<sup>2+</sup>]<sub>IC</sub>-ját, a Ca<sup>2+</sup>-jel forrása pedig az extracelluláris tér, hiszen a Ca<sup>2+</sup>-jel szinte teljesen megszűnt névlegesen

Ca<sup>2+</sup>-mentes oldat alkalmazásakor. Ismert, hogy a NA képes közvetlenül aktiválni számos döntően Ca<sup>2+</sup>-ra permeábilis TRPV csatornát, amelyek a NA esetében látotthoz hasonló liposztatikus hatást fejthetnek ki, ezért a következőkben azt vizsgáltuk meg, hogy ezek a csatornák részt vehetnek-e a NA hatásainak kialakításában. Tekintettel arra, hogy a NA által kiváltott Ca<sup>2+</sup>-jelet a TRPV csatornák általános gátlószere, a RR nem csökkentette, eredményeink arra utaltak, hogy a hatás hátterében egy eddig ismeretlen, TRPV csatorna-független mechanizmus állhat.

A lehetséges mechanizmust tovább vizsgálva megállapítottuk a farmakológiai dózisban alkalmazott NA elsődleges receptora, a HCA<sub>2</sub> mind mRNS (Q-PCR), mind fehérje szinten (IF) kifejeződik a szebocitákon. A receptor siRNS-transzfekcióval történő szelektív „gécensendesítése” pedig kivédte mind a liposztatikus hatást, mind pedig a Ca<sup>2+</sup>-jel kialakulását. Jelen adataink tehát nemcsak felvetik a klinikumban már évtizedek óta biztonságosan használt NA esetleges bőrgyógyászati (topikális) alkalmazásának a lehetőségét akne és szeborrea esetén, hanem rávilágítanak egy eleddig ismeretlen szabályozó, a HCA<sub>2</sub> receptor szerepére is, ami egy teljesen új terápiás célpont lehet a fenti betegségek esetén.

Az eredményeinkben rejlő terápiás potenciál felderítése természetesen megfelelően tervezett, placebo-kontrollált, kettősvak klinikai vizsgálatokban lesz lehetséges. Habár munkacsoportunknak nincs tudomása ilyen vizsgálatokról, a fent bemutatott adatokon túlmenően számos bizonyíték támasztja alá azt az elképzelést, hogy a NA kedvező hatású lehet aknéban és szeborreában. Ezek közé a bizonyítékok közé sorolható először is az a tény, hogy pellagrában (azaz a NA hiánybetegségben) gyakran észlelhető „dyssebacia”, azaz a szebociták hiperpláziája, megváltozott faggyútermelése és a FM-ek következményes megnagyobbodása. Másodszor, a farmakológiai dózisban alkalmazott NA kezelés mellékhatásai között szerepel a bőrszárazság. Harmadszor, egyes (nem placebo

kontrollós) „pilot” klinikai vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy az orálisan alkalmazott NA hatékonyan csökkentheti a pattanásosságot.

Azt is érdemes megjegyezni, hogy a B3 vitaminkomplex másik tagja, a nikotinamid topikális alkalmazást követően egy kettős vak, placebo-kontrollált klinikai vizsgálatban hatékonyan csökkentette a faggyútermelést, és összességében egyre több bizonyíték utal arra, hogy hatékony lehet az akne, illetve más bőrbetegségek kezelésében. Jóllehet a nikotinamid akne ellenes hatásának mechanizmusa még csak részben ismert, az bizonyos, hogy nem aktiválja a HCA<sub>2</sub> receptort, tehát nem az általunk a NA-val összefüggésben a fentiekben leírt liposztatikus jelátviteli utat aktiválja. Tekintettel azonban arra, hogy a NA *in vivo* átalakulhat nikotinamiddá, a helyileg alkalmazott NA klinikai hatékonysága akár meg is haladhatja a nikotinamidét, hiszen elméletileg mind HCA<sub>2</sub>-függő direkt, mind pedig nikotinamiddá történő átalakulásból fakadó, HCA<sub>2</sub>-független, közvetett akne ellenes hatásokat kialakíthat.

Érdekes módon liposztatikus és anti-proliferatív hatékonysága ellenére a NA nem volt képes megakadályozni a szebociták LPS-indukálta gyulladásos válaszát. Érdemes ugyanakkor megjegyezni, hogy a CBD vizsgálatok kapott korábbi adataink alapján nem teljesen váratlan, hogy a NA nem bizonyult gyulladásgátló hatásúnak. Eredményeink szerint a CBD liposztatikus és anti-proliferatív hatásaiért a TRPV4 ioncsatornák aktiválása és a következményesen kialakuló Ca<sup>2+</sup>-jel a felelős, gyulladáscsökkentő hatását azonban egy ettől független jelpálya (adenozin A<sub>2A</sub> receptor → cAMP↑ → TRIB3↑ → a p65 NF-κB útvonal gátlása) közvetítette. Nemrégiben ráadásul azt is kimutattuk, hogy egy másik Ca<sup>2+</sup>-permeábilis ioncsatorna, nevezetesen a TRPV3 aktiválása (amellett, hogy a TRPV1-hez és a TRPV4-hez hasonlóan csökkentette az aknéra jellemző, kórosan fokozott faggyúlipid-termelést) fokozta számos gyulladásos citokin expresszióját és felszabadulását humán szebociták és epidermális keratinociták esetén is. Mindezek fényében nem meglepő, hogy a NA a HCA<sub>2</sub> aktiválásán és az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>IC</sub>

következményes emelésén keresztül hatékonyan normalizálta az faggyúlipid-szintézist, de nem tudta kivédeni az LPS gyulladási választ kiváltó hatását.

Bár eredményeink alapján a HCA<sub>2</sub> a FM-ek biológiájának egy újonnan megismert szabályozója, kísérleteink végén egy fontos kérdés nyitva maradt, jelesül, hogy a HCA<sub>2</sub> receptor aktiválása pontosan hogyan vezethet az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>IC</sub> növekedéshez a humán sebociták esetében. Noha a HCA<sub>2</sub> egy G<sub>i</sub> kapcsolt receptor, az irodalomban nem példanélküli, hogy aktiválását Ca<sup>2+</sup> beáramlás követi. A jelenleg még nem ismert Ca<sup>2+</sup>-permeabilis csatorna azonosítása már csak azért is fontos lenne, mert közvetlen farmakológiai aktiválásával egy új terápiás célponttal gazdagodna az akne és szeporrea elleni terápiás repertoárunk. Kiemelendő továbbá, hogy szemben pl. a TRPV3-mal, ahol az ioncsatorna aktivációja a liposztikus hatás mellett gyulladási válasz kialakulásához is vezet, ez az ismeretlen Ca<sup>2+</sup>-csatorna eredményeink szerint olyan módon befolyásolja a sebociták Ca<sup>2+</sup>-háztartását, ami nem vált ki gyulladási választ.

### **Záró gondolatok – A jelen tanulmány korlátai**

Bár a fentiekben ígéretes kísérletes adatok kerültek ismertetésre, vizsgálatunk transzlációs értékét korlátozza, hogy megállapításaink a megfelelő állatmodellek sajnálatos hiánya, valamint a primer sebocita tenyészetek fenntartásának objektív nehézségei miatt egyetlen sejtvonalon alapulnak. Minthogy azonban az általunk használt sejtmódel az eddigi adatok alapján a CBD esetében megbízhatóan jelezte előre a klinikai hatékonyságot, kijelenthető, hogy mind a pCB-ok, mind a NA megfelelően tervezett, randomizált, kettősvak, placebo-kontrollált klinikai vizsgálatokban történő további tanulmányozása feltétlenül indokolt, és új, az eddigiektől gyökeresen eltérő mechanizmussal ható gyógyszerek kifejlesztésének a reményével kecsegtet.

## Összefoglalás

Kísérleteink első felében azt tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk egyes nem-pszichotróp pCB-ok biológiai hatásait humán SZ95 szebocitákon. Kimutattuk, hogy a pCB-ok 10  $\mu$ M-os koncentrációig a sejtek életképességének csökkentése nélkül eltérő módon befolyásolják a szebociták legjellemzőbb biológiai funkcióját, azaz a bazális faggyúlipid-szintézist. A CBG és a CBGV az eCB-okra jellemző módon növelte a lipogenezist, a CBDV-nek nem volt szignifikáns hatása, míg a CBC és a THCV csökkentette a bazális faggyúlipid-szintézist. Mivel valamennyi pCB hatékonyan csökkentette a szebociták LPS-sel indukált gyulladásos válaszát, ezek az eredmények azt sugallják, hogy a CBG és a CBGV kedvező hatással lehet a bőrszárazsággal járó, gyulladással kísért kórképekben.

Kísérleteink folytatásában azt találtuk, hogy a CBC, a CBDV és a THCV képes szignifikánsan csökkenteni az AA-indukálta lipogenezist. A fentiek közül leghatékonyabbnak bizonyult THCV-t tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy „univerzális” liposztatikumként viselkedik (azaz képes az AA-tól eltérő jelátviteli útvonalakon ható lipogének hatásának kivédésére is), anti-proliferatív hatású, és (amint arról már szó esett) szinte teljesen normalizálja a gyulladásos citokinek LPS-sel indukált expresszióját a felszabadulását.

Kísérleteink második felében megállapítottuk, hogy a NA az életképesség és a homeosztatis faggyúlipid-termelés befolyásolása nélkül hatékonyan csökkenti a szebociták proliferációját, valamint a különféle lipogén ágensekkel kiváltott, aknét modellező, kórosan fokozott faggyúlipid-szintézist. Kimutattuk azt is, hogy a NA hatásait a HCA<sub>2</sub> receptor aktivációja és a következményes Ca<sup>2+</sup>-beáramlás közvetíti.

Eredményeinket összefoglalva elmondható tehát, hogy a NA és a pCB-ok is komplex módon befolyásolják a humán szebociták biológiai folyamatait, és ígéretes, új eszközök lehetnek a különféle FM-diszfunkcióval jellemezhető kórképek (bőrszárazság, akne, szeborrea stb.) kezelésében.

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik bármilyen módon hozzájárultak az értekezés létrejöttéhez. Mindenekelőtt köszönetet mondok a DE ÁOK Élettani Intézet igazgatójának **Prof. Dr. Csernoch László** professzor úrnak, aki biztosította a munkámhoz szükséges feltételeket. Köszönöm témavezetőmnek **Prof. Dr. Bíró Tamásnak** és **Dr. Oláh Attilának** az évek során nyújtott szakmai és emberi segítségüket, a belém vetett bizalmukat, és azt, hogy számomra mind szakmai, mind emberi szempontból fontos példát adtak, és sokat tanulhattam tőlük.

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

Hálásan köszönöm témavezetőmet, **Dr. Magi József** munkáját, akinek a személyében egy nagyon tehetséges, szorgalmas, a tudomány iránt elkötelezett TDK hallgatót ismerhettem meg. Mindig nagy örömmel gondolok a közös munkára.

Köszönöm kollaborációs partnereink (**Dr. Colin Stott, Prof. Dr. Christos C. Zouboulis, Prof. Dr. Benyó Zoltán, Dr. Gyöngyösi Adrienn, Szendi-Szatmári Tímea** és még sokan mások) felbecsülhetetlen értékű segítségét.

Végezetül köszönök mindent szüleimnek és barátaimnak is. Nagyon hálás vagyok nekik, hiszen nélkülük nem jutottam volna el eddig.

*A kutatás az Emberi Erőforrások Minisztériuma megbízásából az Emberi Erőforrás Támogatáskezelő által kiírt „Nemzeti Tehetség program” (NTP-NFTÖ-16-0463), valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 jelű projekt támogatásával, a Magyar Tudományos Akadémia „Lendület” kiválósági programja keretében (LP2011-003/2015) valósult meg.*

# Függelék - Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/379/2019.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Markovics Arnold  
Neptun kód: GGHZGV  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Markovics, A.**, Tóth, K. F., Sós, K., Magi, J., Gyöngyösi, A., Benyó, Z., Zouboulis, C. C., Bíró, T., Oláh, A.: Nicotinic acid suppresses sebaceous lipogenesis of human sebocytes via activating hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCA2).  
*J. Cell. Mol. Med.* 23 (9), 6203-6214, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.14505>  
IF: 4.658 (2018)
2. Oláh, A.\*, **Markovics, A.\***, Papp, J., Szabó, P., Stott, C., Zouboulis, C. C., Bíró, T.: Differential effectiveness of selected non-psychotropic phytocannabinoids on human sebocyte functions implicates their introduction in dry/seborrheic skin and acne treatment.  
*Exp. Dermatol.* 25 (9), 701-707, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.13042>  
\*These authors contributed equally to this work.  
IF: 2.532

## További közlemények

3. Bíró, A., **Markovics, A.**, Homoki, J., Szöllösi, E., Hegedűs, C., Tarapcsák, S., Lukács, J., Stündl, L., Gálné Remenyik, J.: Anthocyanin-Rich Sour Cherry Extract Attenuates the Lipopolysaccharide-Induced Endothelial Inflammatory Response.  
*Molecules.* 24 (19), 3427-3441, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24193427>  
IF: 3.06 (2018)
4. Zákány, N., Oláh, A., **Markovics, A.**, Takács, E., Aranyász, A., Nicolussi, S., Piscitelli, F., Allarà, M., Pór, Á., Kovács, I., Zouboulis, C. C., Gertsch, J., Di Marzo, V., Bíró, T., Szabó, T.: Endocannabinoid tone regulates human sebocyte biology.  
*J. Invest. Dermatol.* 138 (8), 1699-1706, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2018.02.022>  
IF: 6.29





5. Paholcsek, M., Leiter, É., **Markovics, A.**, Biró, S.: Novel and sensitive qPCR assays for the detection and identification of aspergillosis causing species.  
*Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 61 (3), 273-284, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.3.3>  
IF: 0.778

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,318**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
7,19**

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, 2019.11.22.

