

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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.**

Tartalomjegyzék

1. Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés.....	6
3. Irodalmi áttekintés.....	7
3.1. A bőr.....	7
3.1.1. Az emberi bőr felépítése.....	7
3.1.2. Egy kiemelkedően fontos bőrfüggelék: a faggyúmirigy (FM).....	8
3.1.3. Az SZ95 humán, immortalizált szebocita sejtvonal	12
3.2. A(z endo)kannabinoid rendszer.....	13
3.2.1. A vadvender	13
3.2.2. A fitokannabinoidok (pCB).....	13
3.2.3. Az ECS általános felépítése.....	15
3.2.4. A bőr kannabinoid rendszere: fókuszban a FM-ek.....	17
3.3. A nikotinsav (NA) biológiai hatásai.....	20
3.3.1. Általános jellemzők	20
3.3.2. A NA hiánybetegsége, a pellagra	20
3.3.3. A farmakológiai dózisban adott NA fő celluláris célpontja: a „hydroxycarboxylic acid receptor 2” (HCA ₂).....	21
4. Célkitűzés	24
5. Anyagok és módszerek.....	25
5.1. A kísérletek során felhasznált kémiai ágensek áttekintése	25
5.2. A humán immortalizált SZ95 szebociták tenyésztése	25
5.3. A szebociták intracelluláris lipidtartalmának meghatározása	26
5.4. Az életképesség vizsgálata (MTT-assay)	27
5.5. Az apoptózis és nekrosis vizsgálata	27
5.6. A proliferáció vizsgálata (CyQUANT proliferációs assay)	30
5.7. Reverz transzkripciót követő, kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció (Q-PCR).....	31
5.8. Immunfluoreszcens jelölés (IF).....	32
5.9. A citokin-felszabadulás vizsgálata (IL-6 és IL-8 ELISA).....	33
5.10. Szelektív géncsendesítés (siRNS transzfekció).....	33
5.11. Fluoreszcens Ca ²⁺ -mérés	34
5.12. Statisztikai analízis	36
6. Eredmények.....	37
6.1. A kiválasztott, nem-pszichotróp pCB-ok eltérően befolyásolják az SZ95 szebociták biológiai folyamatait.....	37
6.1.1. A pCB-ok dóziszfüggő-módon befolyásolják a szebociták életképességét	37
6.1.2. A pCB-ok eltérően befolyásolják a humán szebociták faggyúlipid-termelését.....	40

6.1.3.	A CBG és a CBGV csökkenti az AEA lipogén hatását.....	42
6.1.4.	A CBC, a CBDV és a THCV csökkenti az AA által indukált, aknét modellező, kórosan fokozott lipogenezist	43
6.1.5.	A THCV nem citotoxikus koncentrációban univerzális liposztatikus hatást fejt ki	44
6.1.6.	A THCV nem citotoxikus koncentrációi anti-proliferatív hatásúak humán szebocitákon	45
6.1.7.	A THCV erőteljes gyulladásgátló hatást mutat	46
6.1.8.	Előzetes eredményeink alapján valamennyi vizsgált pCB gyulladásgátló hatású humán szebocitákon	47
6.2.	A NA a HCA ₂ receptor aktiválásával csökkenti a faggyúlipid-termelést.....	49
6.2.1.	A NA 100 µM-os koncentrációig nem csökkenti az életképességet	49
6.2.2.	A NA nem befolyásolja a homeosztatisz faggyúlipid-termelést, de normalizálja a különféle lipogén ágensekkel indukált, aknét utánzó lipogenezist.....	50
6.2.3.	A NA univerzális liposztatikus hatást fejt ki	52
6.2.4.	A NA csökkenti a humán szebociták proliferációját	53
6.2.5.	A NA nem védi ki a szebociták LPS-sel indukált gyulladási választ.....	53
6.2.6.	A NA liposztatikus hatása Ca ²⁺ -függő módon alakul ki.....	55
6.2.7.	A NA Ca ²⁺ -jelet vált ki humán szebocitákon, amelynek a forrása döntően az extracelluláris tér, de nem TRP csatorna-mediált	56
6.2.8.	A szebociták kifejezik a NA elsődleges receptorát, a HCA ₂ -t	58
6.2.9.	A HCA ₂ szelektív géncsendesítése kivédi a NA liposztatikus és [Ca ²⁺] _{IC} -t növelő hatását ..	59
6.2.10.	Sem a NA, sem az AA nem befolyásolja a HCA ₂ receptor expresszióját	59
7.	Diszkusszió.....	62
7.1.	A kiválasztott nem-pszichotróp pCB-ok hatásainak áttekintése	62
7.2.	A NA humán szebocitákra gyakorolt hatásainak áttekintése	66
7.3.	Záró gondolatok – A jelen tanulmány korlátai	71
8.	Összefoglalás.....	73
9.	Summary	74
10.	Irodalomjegyzék.....	75
11.	Tárgyszavak.....	84
12.	Key words.....	85
13.	Köszönetnyilvánítás	86
14.	Függelék – Saját közlemények jegyzéke.....	87

1. Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke

2-AG: 2-arachidonoil-glicerol	FM: faggyúmirigy
18S RNS: 18S riboszomális RNS	GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
AA: arachidonsav	HCA ₂ : „hydroxycarboxylic acid receptor 2”
AD: atópiás dermatitisz	IF: immunfluoreszcens jelölés
AEA: anandamid	IL: interleukin
BSA: szarvasmarha szérumalbumin	LA: linolsav
CB ₁ /CB ₂ : kannabinoid receptor 1 és 2	LPS: lipopoliszacharid
CBC: (-)-kannabikromén	MAGL: monoacilglicerol-lipáz
CBD: (-)-kannabidiol	MAPK: mitogén-aktiválta protein kináz
CBDV: (-)-kannabidivarin	MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid
CBG: (-)-kannabigerol	NA: nikotinsav
CBGV: (-)-kannabigerovarin	NAPE-PLD: N-acil-foszfatidil-etanolamin-specifikus foszfolipáz D
CBN: (-)-kannabinol	NF-κB: „nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells”
CCCP: karbonil-cianid m-klorofenil-hidrazon	NRIP1: „nuclear receptor interacting protein 1”
DAGL: diacilglicerol-lipáz	OEA: oleoil-etanolamin
DMSO: dimetil-szulfoxid	PBS: foszfát-pufferelt sóoldat
eCB: endokannabinoid	pCB: fitokannabinoid
ECS: endokannabinoid rendszer	PKC: protein kináz C
EMT: eCB membrántranszporter	PPAR: peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptor
ERK1/2: extracelluláris szignál–regulált kináz 1/2	
FAAH: zsírsavamid-hidroláz	
FBS: magzati szarvasmarha szérum	

RR: ruténium vörös

SCR: scrambled RNS

T: tesztoszteron

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

THCV: (-)- Δ^9 -tetrahidrokannabivarin

TLR: Toll-like receptor

TNF: tumornekrózis faktor

TRIB3: „tribbles homolog 3”

TRP: tranziens receptorpotenciálú ioncsatorna

TRPM: a tranziens receptorpotenciálú ioncsatornák „melasztatin” alcsaládja

TRPV: a tranziens receptorpotenciálú ioncsatornák „vanilloid” alcsaládja

2. Bevezetés

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, de különösen a 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, és új, kedvező mellékhatásprofilú terápiás megoldások azonosítására.

Munkacsoportunk a korábbiakban kimutatta, hogy a komplex kannabinoid jelátvitel összetett módon szabályozza a FM-ek biológiai folyamatait: az ún. endokannabinoidok (eCB) fokozzák a faggyúlipid-szintézist, míg egy, a klinikai gyakorlatban már alkalmazott, nem-pszichotróp fitokannabinoid (pCB), a (-)-kannabidiol (CBD) alkalmazása komplex anti-akne hatások kialakulásához vezet. Mindezek fényében a jelen dolgozatban bemutatandó vizsgálat keretein belül több nem-pszichotróp pCB ((-)-kannabikromén [CBC], (-)-kannabidivarin [CBDV], (-)-kannabigerol [CBG], (-)-kannabigerovarin [CBGV] és (-)- Δ^9 -tetrahydrokannabivarin [THCV]) biológiai hatásait teszteltük humán szebocitákon.

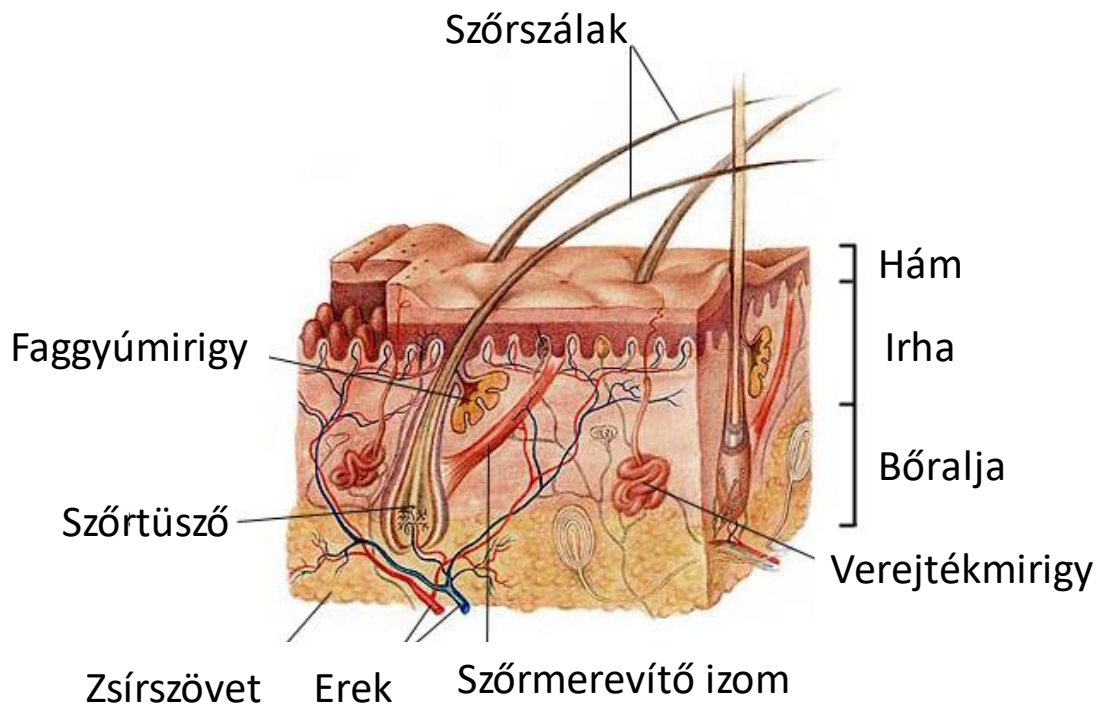
A nikotinsav (niacin; NA) és a nikotinamid a B3 vitaminkomplex tagjai, amelyek hiánya a hasmenéssel, demenciával, bőrgyulladással és egy speciális FM rendellenességgel („dyssebacia”) jellemezhető pellagra kialakulásához vezet. A NA emellett farmakológiai dózisban alkalmazva (a „hydroxycarboxylic acid receptor 2” [HCA₂] aktiválása révén) hatékony egyes diszlipidémiák kezelésében. Tekintettel arra, hogy a 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.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A bőr

3.1.1. Az emberi bőr felépítése

A bőr testünk legnagyobb szerve, fő feladatai közé tartozik fizikokémiai barriert állítani a külvilág és a szervezetünk közé. A bőr számos nélkülözhetetlen funkcióval bír: felelős a víz- és hőháztartásunk egyensúlyának fenntartásáért, védőgátként, és endokrin szervként is funkcionál, valamint immunológiai védelmet is biztosít (1). Három nagyobb rétegre oszthatjuk: epidermisz (hám), dermisz (irha), szubkutisz (bőralja) (1. ábra).



1. ábra A bőr felépítése sematikusan

Bőrünket szövettanilag három nagyobb rétegre oszthatjuk: epidermisz (hám), dermisz (irha), szubkutisz (bőralja). A kép forrása: <https://tudasbazis.sulinet.hu/hu/termesztudomanyok/biologia/biologia-8-efolyam/a-bor/a-bor-felepitese> (letöltve: 2019. december 12.).

Az epidermisz többrétegű, elszarusodó laphám. Fő feladata a mechanikai védelem biztosítása, óvja testünket az elektrolit- és vízvesztéstől, valamint számos külvilágból érkező jelet képes detektálni. Az epidermisz kulcsfontosságú a fizikokémiai, mikrobiológiai és az immunológiai barrierék kialakításában (2). Legelső rétege a stratum basale, mely a bazális

membránon ülő, gyorsan osztódó sejtréteg, ami a hámsejtek pótlásáért felel. A hámsejtek között szabad idegvégződések futnak át, valamint elszórtan megtalálhatóak melanociták és Merkel sejtek is; előbbieket a melanintermelésért, míg utóbbiak a tapintás érzékeléséért felelősek. A bazális réteg felett a stratum spinosum található, melyet akár tíz keratinocita réteg is alkothatja, köztük különböző immunsejtekkel (pl. Langerhans sejtek) (1). Ezt a réteget követi a stratum granulosum; maximum három rétegnyi differenciált keratinocita alkotja, amelyek a bőr mechanikai stabilitásának biztosításában fontos keratohialin-granulumokat tartalmaznak. A sejtekben lipidgazdag lamelláris testek (keratinoszómák) is fellelhetők, melyek lipidtartalmukat a legfelső régió intercelluláris terébe ürítik, ezzel az ottani lipidfilm nagy hányadát adva. A legkülső réteg a stratum corneum^{*}, melynek sejtjei a keratinocitákból képződő korneociták (1).

A dermisz egy erekben és kötőszövetben gazdag régió, melyet az epidermisztől a bazális membrán választ el. A dermisz két nagyobb egységre osztható: a papilláris dermiszre és a retikuláris dermiszre. Az előbbi egy hullámzó, venulákban, kapillárisokban, kollagén és elasztikus rostokban gazdag felsőbb réteg, míg utóbbi egy elasztikus rostokban szintén gazdag, kompakt kollagénhálózat számos sejtféleséggel (fibroblasztok, hízósejtek stb.) (1).

A legalsó réteg, a szubkutisz (hipodermisz) mezenchimális őssejtekben igen gazdag. Nagy hányadát lobulusokba rendezett zsírszövet alkotja, míg a lobulusok között fibrotikus elválasztó rétegekben futnak az erek és az idegek (1).

3.1.2. Egy kiemelkedően fontos bőrfüggelék: a faggyúmirigy (FM)

A FM-ek fő feladata a faggyú termelése. Testszerte szőrtüszőkhöz kapcsolódva („pilosebáceus egység”) helyezkednek el, kivéve a genitális nyálkahártya, az ajkak, a szájnálkahártya, valamint az emlőbimbók régióiban, ugyanis itt nincsenek szőrtüszők, így a

^{*} A talp és a tenyér bőrében emellett a stratum granulosum és a stratum corneum között megtalálható még egy réteg, a stratum lucidum (1,3).

FM-ek a szabad bőrfelszínre nyílnak, illetve teljesen hiányoznak a tenyereken és a talpakon. A FM-eket 12-14. naponként újíttják meg a bazális szebociták. Az érett szebociták az általuk megtermelt faggyúlipideket holokrin módon, vagyis a sejtek pusztulásával ürítik, amiben újabb eredmények szerint a DNáz-2-mediált DNS hasítás, illetve az autofágia is meghatározó szerepet játszik (4).

A termelt faggyú összetétele igen komplex: tartalmaz szabadzsírsavakat, triglicerideket, szkvalént, viaszésztereket, koleszterint és koleszterin-észtereket, E-vitamint, linolsavat, valamint antimikrobiális lipideket is, így antimikrobiális hatásokkal is bír. A mindenkori pontos összetételét egyebek mellett hormonális hatások szabályozzák; általánosságban az androgének fokozzák, az ösztrogének pedig csökkentik a faggyú termelését. A hormonrendszeren kívül a lipogenezist számos faktor (pl. a táplálkozás, az életkor, az időjárás vagy a bőr mikroflórája) képes csökkenteni vagy növelni (1,3,5–7). Ennek klinikai jelentősége igen nagy, hiszen a FM-ek alul- és túlműködése is nagy prevalenciájú bőrbetegségek kialakulásához vezethet, mint például a túlzott faggyútermeléssel jellemezhető akne vagy a bőrszárazsággal kísért atópiás dermatitisz (AD)[†].

A pattanásosság vagy akne, az egyik leggyakoribb emberi bőrbetegség (12) (**2. ábra**). Noha nem okoz közvetlenül életveszélyt, különösen súlyos formái nagymértékben ronthatják a betegek életminőségét, és másodlagos pszichés zavarok kialakulásához vezethetnek (13). Az elmúlt évtizedek kutatási erőfeszítései ellenére az akne patogenezisének részletei még mindig nem teljesen tisztázottak. Közismert, hogy az akne multifaktoriális betegség. A tünetek kialakulását és súlyosbodását pszichés stressz, illetve hormonális és táplálkozási zavarok is

[†] Az AD patogenezise természetesen ennél sokkal komplexebb, és elsődlegesen az epidermális barrier károsodásával, illetve T_H2-irányú, kóros immunfolyamatokkal hozható összefüggésbe (8,9). Az elmúlt évek kutatásai alapján azonban a tünetek súlyosbodásához a FM-ek diszfunkciója is hozzájárulhat, hiszen az AD-es léziókban megfigyelhető FM alulműködés, és ezzel a bőrfelszínre kerülő antimikrobiális hatású faggyú mennyiségének csökkenése elősegíti az AD patogenezisében kulcsszerepet játszó *S. aureus* kolonizációját. Ennek megfelelően a homeosztatisz faggyútermelés helyreállítása (a bőrszárazság szubjektív enyhítésén túl) támogathatja az AD oki terápiáját is (10,11).

kiválthatják (12,14–16). Tanulmányok igazolják, hogy a szénhidrátokban, tejtermékekben, valamint telített zsírokban gazdag „nyugati” étrend és az akne előfordulása között kapcsolat áll fenn (17).



2. ábra Az akne jellemző klinikai képe

Kép forrása: <http://www.bekesmmk.hu/akne-es-pattanások-kezelese/> (letöltve: 2019. december 11.)

Az akne patogenezisében négy egymással összefüggő kulcsfontosságú tényező szerepel: kórosan fokozott mennyiségű és megváltozott minőségű faggyútermelés, a FM kivezetőcsövének hiperkeratinizációja, a *Cutibacterium acnes* (korábban *Propionibacterium acnes*; egy aerotoleráns anaerob, Gram-pozitív baktérium) kolonizációja, valamint kóros gyulladási folyamatok elindulása (18–21). A *C. acnes* a normál bőrflóra része. Főként lipideket használ energiaforrásként, és metabolizmusa propionsavat termel. Több altípusba sorolható, jelenleg hat alcsoportját különítik el (IA1, IA2, IB, IC, II és III). Az akne kialakulásának egyik oka lehet a hat altípus diverzitásának csökkenése, és az IA1 filotípus túlsúlya (18–21).

Az akne kialakulása szempontjából fontos, hogy a *C. acnes* törzsek képesek egyebek mellett keratinociták, makrofágok és szebociták esetében is indukálni egyes gyulladási citokinek (pl. interleukin [IL]-1 β , IL-8 és IL-17) termelődését (18–21). Ismeretes továbbá, hogy egyes Toll-like receptorok (TLR) (köztük is elsősorban a TLR2), valamint a miR-146a mikroRNS expresszióját is fokozzák keratinocitákon, növelve ezzel a gyulladási választ

mértékét (19,22). Széles körben elfogadott tény, hogy a kórokozó elburjánzása és a faggyútermelés fokozása, illetve összetételének megváltoztatása összefüggnek egymással (12,14). Ezen változások, mint például a fokozott zsírsav-deszaturáció, a lipid-peroxidok jelenléte, valamint a faggyú E-vitamin tartalmának csökkenése elősegíti az infundibuláris hiperkeratinizációt, ami komedóképződést eredményez. A zárt komedókban a baktériumok elszaporodhatnak, ami végső soron gyulladásos folyamatokat indít el, amelyek viszont tovább növelik a faggyútermelést, ezzel bezárják a patogenezis ördögi körét, és kialakítják az akne jólismert klinikai képét (12,14,23) (**2. ábra**).

Az akne kezelése általában a tünetek súlyosságán alapul, és fokozatosan, egyénre szabott módon szerveződik (12,14), azonban még így is számolni kell nemkívánatos (esetenként igen súlyos) mellékhatások kialakulásának veszélyével. Az akne kezelésében az egyik leggyakrabban használt gyógyszer a topikálisan (illetve súlyosabb esetekben orálisan) alkalmazott izotretinoin (13-*cisz*-retinsav), mely tulajdonképpen az akne patogenezisének minden lényeges momentumát (fokozott faggyútermelés, hiperkeratinizáció, kóros gyulladás, *C. acnes* kolonizáció) kedvezően befolyásolja. Az izotretinoin használatát ugyanakkor számos mellékhatás kísérheti, mint pl. a vérlemezkeszám csökkenése, allergiás reakciók, bőrszárazság, fényérzékenység, májkárosodás, teratogenitás vagy pszichés problémák (14,24–27). Az izotretinoin mellett természetesen számos más készítmény (pl. azelainsav, benzoil-peroxid, különféle antibiotikumok, anti-androgének) is rendelkezésre áll (14,28). Habár az akne kezelése során a fentiek szerint számos független mechanizmussal ható gyógyszerrel kísérhetjük meg felvenni a harcot a betegséggel, továbbra is komoly igény mutatkozik hatékony, mégis biztonságos, kedvező mellékhatásprofilú terápiás eszközök azonosítására. Ezek alapján érthető, hogy a FM-ek biológiájának jobb megértése a kísérletes bőrgyógyászati kutatások egyik fontos célterülete.

3.1.3. Az SZ95 humán, immortalizált sebocita sejtvonala

A FM-ek vizsgálatát nehezítette, hogy sokáig nem állt rendelkezésre megfelelő modellrendszer. A primer sebociták tenyésztése laboratóriumi körülmények között nehézkes folyamat, hosszútávú fenntartásuk pedig (a sejtek gyors spontán differenciációja miatt) nem megoldható (29). A megfelelő állatmodell hiányát elsősorban az állatok faggyúösszetételének eltérése okozza. Habár léteznek aknét utánozó állatkísérletes körülmények, a betegség komplexitását nem képesek teljes mértékben leképezni; ezen felül az állati sebociták élettani és kóros működése is eltér az emberétől (12,30–32).

A sebociták *in vitro* vizsgálatában az áttörést Christos C. Zouboulis és munkatársai munkája hozta el, az SZ95 humán, immortalizált sebocita sejtvonala létrehozásával. Ennek során egy női páciens bőrmintájából sikerült sebocitákat izolálniuk, és azokat az SV40 vírus „T” antigénjével stabilan transzfektálva immortalizálniuk. Az így létrehozott SZ95 sejtvonala megőrizte a primer sebociták fenotípusos és funkcionális sajátosságait (olyannyira, hogy immunodeficiens egerekbe xenotranszplantálva képesnek bizonyult újra FM-szerű struktúrákká differenciálódni), hosszútávú fenntarthatósága pedig előre lendítette a humán FM-ek biológiájának kutatását (29,33).

Az SZ95 sebociták sikere után újabb immortalizált sebocita sejtvonala is születettek (a szintén SV-40 vírus „T” antigénjével immortalizált SEB1, valamint a Humán Papillómavírus E6 és E7 antigénjeivel transzfektált Seb-E6E7); a velük végzett kísérletes munkák eredményei szinte minden esetben egybeesnek az SZ95 sebociták használata során kapott adatokkal (12,27,29,32,34). Munkacsoportunk az elmúlt évek során számos alkalommal használta sikerrel az SZ95 sebocitákat (35–39), ezért a jelen dolgozat alapjául szolgáló kísérletek során is ezzel a sejtvonallal dolgoztunk.

3.2. A(z endo)kannabinoid rendszer

3.2.1. A vadkender

A *Cannabis* (*Cannabinaceae* család) egy valószínűleg az ázsiai kontinens nedves élőhelyein őshonos növényfaj. Felhasználhatóságának spektruma igen széles, kezdve a kötél és ruhakészítésben betöltött korai szerepével, a vallási szertartásokon kihasznált „tudattágító” hatásán keresztül az illegális rekreációs és legális gyógyszeripari felhasználásáig (40). A növények kis szőröcskéket („trichómák”) tartalmaznak, amelyek feltételezhetően a rovarok elleni védekezésben játszanak szerepet. A női ivarú növények trichómáiban különösen magas a (-)-*transz*- Δ^9 -tetrahidrokannabinol (THC) tartalom (lásd később). Ez a pszichotróp anyag teszi napjaink egyik legkedveltebb kábítószerévé, amelyet általában szívva, inhalálva vagy süteményekbe sütve fogyasztanak felhasználói (41). A kezdeti taxonómiai leírások során Linné (1753) egyetlen kenderfajt, a *Cannabis sativa*-t sorolta a nemzetségbe, míg a mai rendszertani besorolás szerint 3 faj (*C. sativa*, *C. indica* és *C. ruderalis*) tartozik ide (41).

3.2.2. A fitokannabinoidok (pCB)

Ősidők óta ismert, hogy az egyes *Cannabis* fajok különböző részeinek fogyasztása pszichotróp hatások kialakulásához vezethet. Hatásainak megismerését követően a tudomány kíváncsi volt a kialakulásuk mechanizmusára, illetve a növény biológiailag aktív hatóanyagaira. Ezen kutatások eredményeként derült fény a vadkender kémiai változatos, különleges biológiai aktivitást mutató másodlagos metabolitjaira, amelyeket növényi, azaz „fito-” kannabinoidoknak (pCB) neveztek el, és amelyekből napjainkra már több, mint száz különböző molekulát azonosítottak (42,43)[‡].

[‡] Érdekes módon a *Cannabis* nemzetség tagjain kívül más növényekről (pl. a *Radula perrottetii* mohafajról) is kimutatták már, hogy „kannabinoid-szerű” molekulákat (pl. (-)-*cis*-perrottetinene) tartalmaznak. Tekintettel arra, hogy a THC-hoz hasonlóan ez a molekula is aktiválja a CB₁ receptort (lásd később), nem meglepő, hogy a fenti mohafajból előállított készítmények egyre divatosabb (egyelőre még) legális „marihuána pótlékoknak” számítanak egyes országokban (44).

A (-)-kannabinol (CBN) volt az első pCB, amelyet a kannabisz olajából izoláltak, majd 1930-ban a szerkezetét is leírták, és ezzel új utakat nyitottak meg a kannabinoidkutatás világában (45,46). Érdemes megjegyezni, hogy a pCB vegyületek mellett kb. 140 különböző terpén (pl. β -kariofillén), több flavonoid, alkán, cukor, nem kannabinoid fenol, fenilpropanoid, szteroid, zsírsav és számos nitrogénvegyület is jelen van a növényben, így a pCB-okkal együtt eddig azonosított biológiailag aktív molekulák száma meghaladja az ötszázat (47,48).

A kannabisz és hatóanyagai felhasználhatóságában rejlő potenciált a gyógyszeripar is felismerte. Széleskörű hatásmechanizmusuk ígéretes gyógyszerhatóanyagokká teszi őket; ennek egyik példája, hogy az orvosi marihuána forgalmazása (elsősorban daganatos betegek tüneti kezelésére) már számos országban legális (49). Emellett a THC és a CBD külön-külön (pl. Marinol [THC analóg]; Epidiolex[®] [tisztá CBD]), illetve kombinációban is (Sativex[®]) számos országban törzskönyvezett módon alkalmazható daganatos betegek adjuváns kezelésére (Marinol), szklerózis multiplex tüneteinek enyhítésére (Sativex[®]), illetve különféle gyermekkori epilepsziaformák (Lennox-Gastaut-szindróma és Dravet-szindróma) kiegészítő kezelésére (50).

A pCB-ok hatásainak vizsgálata során kiderült, hogy az emberben (valamint gyakorlatilag minden ismert állatfajban) működik egy olyan endogén jelátviteli rendszer, amely képes a pCB-okkal reagálni. Ezt a rendszert leírói „endokannabinoid rendszer”-nek (ECS) nevezték el (50). Tekintettel arra, hogy a pCB-ok hatásainak megértése nem képzelhető el az ECS megismerése nélkül, a következőkben röviden áttekintjük az ECS legfontosabb, jelen dolgozat szempontjából releváns tagjait és biológiai hatásait.

3.2.3. Az ECS általános felépítése

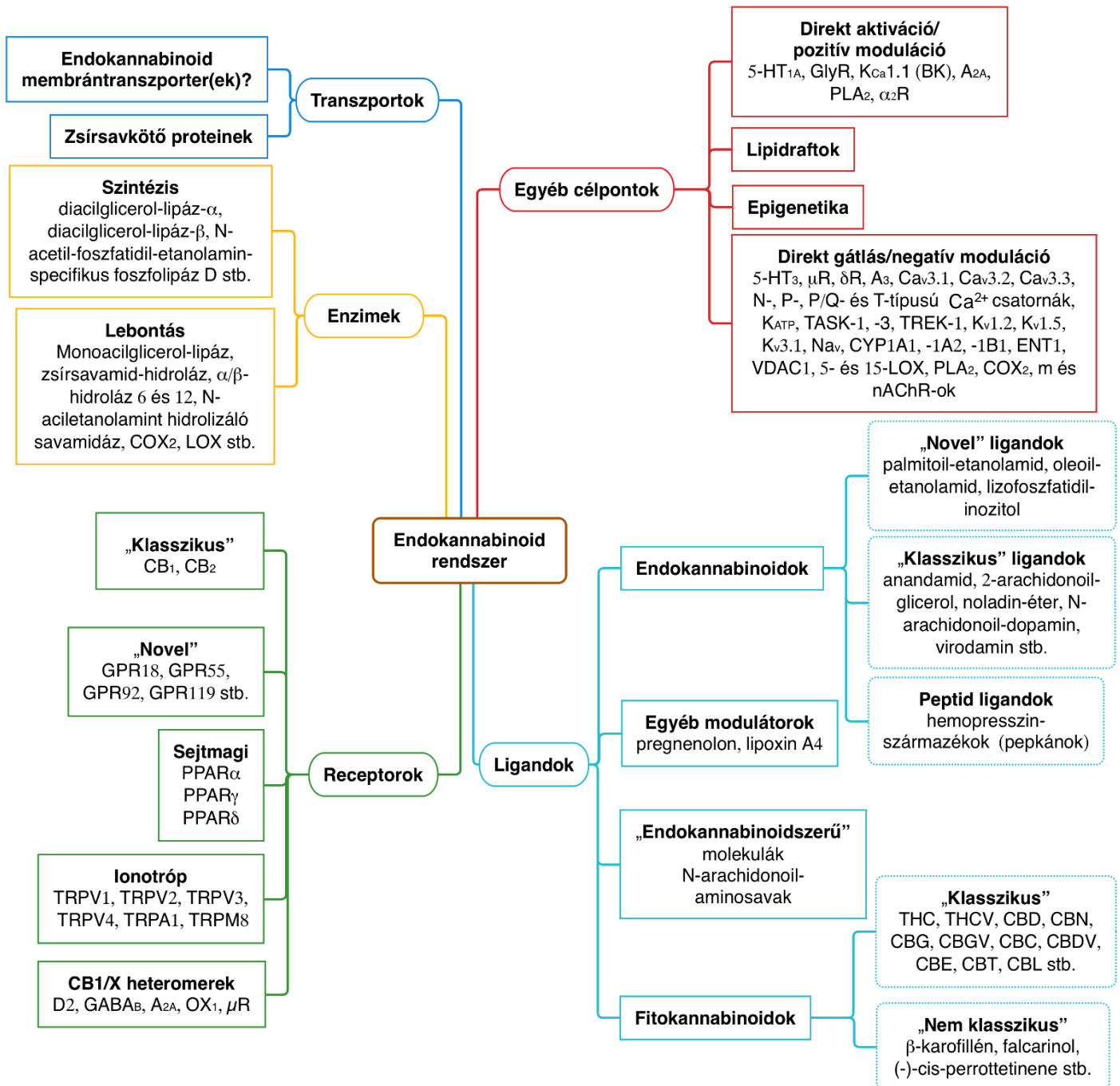
Ahogy az előzőekben arról már szó esett, az emberi szervezet képes reagálni a növényi eredetű kannabinoidokra. Az emberi test a pCB-okhoz funkcionálisan hasonló molekulákat, úgynevezett endokannabinoidokat (eCB) termel (51–55). Az ECS (**3. ábra**), mely nem túl régen került a tudomány fókuszába, egy központi jelentőségű, sokoldalú homeosztatisz szabályozó rendszer. Habár elsőként az idegrendszerre gyakorolt hatásait (az étvágy, a fájdalomérzet, a hangulat és a memória befolyásolása) azonosították, mára már ismert, hogy testszerte, minden szövetben jelen van, és számos élettani folyamatot képes befolyásolni (a teljesség igénye nélkül ilyenek például az immunfolyamatok, a kardiovaszkuláris szabályozás, a spermatogenezis, a csontképződés vagy a faggyútermelés) (51–55).

Az ECS tagjai a már az előbb említett eCB-ok (pl. arachidonoil-etanolamin vagy másnéven anandamid [AEA], 2-arachidonoil-glicerol [2-AG]), az ezeket érzékelő receptorok (pl. CB₁, CB₂), valamint a ligandumok metabolizmusában részt vevő komplex enzim- és transzporter rendszerek. Ez utóbbiak közé tartoznak a szintézisben (pl. N-acil-foszfatidil-etanolamin-specifikus foszfolipáz D [NAPE-PLD], diacilglicerol-lipáz [DAGL]- α és - β stb.), a molekulák sejtekbe történő felvételében vagy leadásában (eCB membrántranszporter[ek] [EMT][§]), az inter- és intracelluláris transzportban (pl. zsírsavkötő fehérjék), valamint a lebontásban (pl. zsírsavamid-hidroláz [FAAH], monoacilglicerol-lipáz [MAGL] stb.) részt vevő molekulák (**3. ábra**) (51–55).

Fontos kiemelni, hogy mind az eCB-ok, mind a pCB-ok esetében ismert, hogy a „klasszikus” CB₁ és CB₂ receptorokon kívül számos egyéb célpontjuk is létezik. A teljesség igénye nélkül ilyenek a peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptorok (PPAR), egyes tranzien receptorpotenciálú (TRP) ioncsatornák, több, korábban „árvareceptorként” számon tartott G-

[§] Megjegyzendő, hogy a rendelkezésre álló, meggyőző funkcionális adatok ellenére az eCB-ok membrántranszportját végző protein(ek) azonosítása még várat magára.

protein kapcsolt receptor (pl. GPR18, GPR55, GPR119 stb.), valamint számos enzim, transzporter stb. (3. ábra) (48,54,56).



3. ábra Az ECS és fontosabb kölcsönhatásai

Az ECS és legfontosabb interakciós partnereinek áttekintése a legfrissebb irodalmi adatok fényében (54,56). A máshol elő nem forduló rövidítések: α_2R : alfa-2 adrenoceptor; $\mu R/\delta R$: μ és δ opioid receptor; 5-HT: 5-hidroxi-triptamin (szerotonin); A_3 : adenozin receptor 3; Ca_v : feszültségfüggő Ca^{2+} -csatorna; CBE: kannabielzoin; CBL: kannabiciklol; CBT: kannabicitran; COX: ciklooxygenáz; CYP: citokróm P450; D2: dopamin receptor 2; ENT1: „equilibrative nucleoside transporter 1”; $GABA_B$: gamma-aminovajsav receptor B; GlyR: glicin receptor; K_{ATP} : ATP-függő kálium csatorna; K_{Ca} : Ca^{2+} -aktiválta kálium csatorna; K_v : feszültségfüggő K^+ -csatorna; LOX: lipoxigenáz; m és nAChR: muszkarinerg és nikotinerg acetyl-kolin receptor; Na_v : feszültségfüggő Na^+ -csatorna; OX_1 : orexin receptor 1; PLA_2 : foszfolipáz A2; TASK1 és -3: KCNK3 és -9 (2 pórusdoménes K^+ csatornák; TREK-1: KCNK2 (mechanoszenzitív 2 pórusdoménes K^+ csatorna); VDAC1: feszültségfüggő anioncsatorna-1.

Részben emiatt, valamint az egyre növekvő számú endogén ligand azonosítása okán világossá vált, hogy a „klasszikus” ECS koncepcióját bővíteni kell, így nemrégiben megszületett a korábbinál „inkluzívabb” „*endocannabinoidome*” elnevezés (53,54,57). A rendszer komplexitását ráadásul tovább fokozza, hogy számos metabotróp receptora ligandfüggő módon más és más másodlagos jelpályát részesít előnyben („elfogult” agonizmus), illetve más 7 transzmembrán doménnel rendelkező receptorokkal heteromereket formálhat, ami mindkét interakciós partner jelátvitelét alapjaiban módosíthatja (54).

3.2.4. *A bőr kannabinoid rendszere: fókuszban a FM-ek*

Az elmúlt két évtized kísérletes eredményei egyértelműen igazolták, hogy a kannabinoid jelátvitel jelentős mértékben hozzájárul a bőr homeosztázisának fenntartásához (54,58). Az ECS tagjainak jelenléte kimutatható a bőr számos különböző sejtípusán, ideértve egyebek mellett az epidermális keratinocitákat, a melanocitákat, a hízósejteket, a fibroblasztokat, a szebocitákat stb. (54,58). A téma teljes mélységű kifejtése messze meghaladná az értekezés kereteit (54,58), ezért a jelen dolgozatban csak a FM-ek szempontjából releváns adatok áttekintésére szorítkozunk.

Munkacsoportunk a korábbiakban kimutatta, hogy a humán FM-ekben megtalálhatóak a legfontosabb eCB-ok (pl. AEA, 2-AG), valamint kifejezik a CB₂ receptort, amely hozzájárul a homeosztatis faggyúlipid-termelés fenntartásához. Bebizonyosodott továbbá, hogy a szebociták eCB-kezelése a CB₂ → ERK1/2 MAPK → PPAR útvonalat aktiválva drámaian fokozza a lipogenezist (35). Kimutattuk azt is, hogy az eCB-ok szintéziséért (NAPE-PLD, DAGL α és β) és lebontásáért (MAGL és FAAH) felelős legfontosabb enzimek kifejeződnek a szebocitákon, a bizonyos EMT-inhibitorok (VDM11 és AM404) által kiváltott mérsékelt eCB-tónus emelkedés pedig - amellet, hogy kis, de szignifikáns mértékben fokozta a faggyúlipid-termelést – kivédte a TLR4-aktivátor lipopoliszacharid (LPS) által kiváltott

gyulladásos választ (39). Eredményeink szerint emellett a sebociták kifejezik a „novel” kannabinoid receptor GPR119-et^{**}, amelynek aktiválása a legfontosabb endogén ligandjával, az oleoil-etanolammal (OEA) jelentősen fokozza a sejtek gyulladásos választát, valamint differenciációját és ezen keresztül a lipidtermelését is (Markovics és mtsai., bírálati szakban lévő kézirat).

Az ECS funkcionális összetettségét remekül mutatja, hogy az eddig említett metabotróp receptorok mellett a sebociták több ionotróp kannabinoid receptorként is funkcionáló TRP csatornát (TRPV1, TRPV2, TRPV3 és TRPV4) is kifejeznek. Érdekes módon ezen receptorok aktivációja és a következményes Ca^{2+} -beáramlás a „klasszikus” eCB-ok hatásaival ellentétben jelentősen csökkentették a lipidszintézist (37,59,59). A TRP csatornák közül legrészletesebben tanulmányozott TRPV3 aktiválása ráadásul fokozta számos gyulladásos citokin expresszióját és felszabadulását is (37), ami azt jelzi, hogy a kannabinoid jelátvitel egyes „ágai” akár ellentétesen is befolyásolhatják a sebociták különböző biológiai folyamatait.

Természetesen az eCB-ok mellett megvizsgáltuk egy nem-pszichotróp pCB, a már korábban említett, a klinikai gyakorlatban gyógyszerként használt CBD biológiai hatásait is. Eredményeink szerint a CBD komplex anti-akne hatásokat vált ki *in vitro* és *ex vivo* humán sebocitákon (59). Megállapítottuk, hogy a CBD az életképesség és a bazális, „homeosztatis” faggyúlipid-termelés befolyásolása nélkül képes normalizálni több, egymástól részben független jelátviteli útvonalon keresztül ható „pro-akne” ágens (AEA → CB₂ (35); arachidonsav [AA] → protein kináz C [PKC]δ (36); linolsav+tesztoszteron kombináció [LA+T] → PPAR-ok (60) lipogén hatását. A CBD emellett jelentős anti-proliferatív és gyulladásgátló hatást is mutatott (59). Fontos, hogy a CBD liposztatis és anti-proliferatív hatásait a TRPV4 receptort

^{**} Ezen eredmények FM-eken túlmutató jelentőségét az adja, hogy a GPR119 klinikai vizsgálati fázisban lévő ígéretes terápiás célpont lehet kettes típusú cukorbetegség kezelésében (clinicaltrials.gov ID-k: NCT03774095, NCT01453842, NCT01043445), adataink fényében azonban elképzelhető, hogy a receptor farmakológiai aktiválása FM-ekhez kapcsolódó nemvárt hatások kialakulásához vezethet.

aktiválva az intracelluláris Ca^{2+} szint növelésével és az ERK1/2 MAPK útvonal gátlásával, valamint a „nuclear receptor interacting protein 1” (NRIP1, más néven RIP140; a zsírséjtek triglicerid-tárolásának fontos pozitív regulátora) (61) down-regulálásával érte el. A CBD gyulladásgátló hatását ezzel szemben az A_{2A} adozin receptor aktivitásán keresztül a cAMP szint növelésével, a „tribbles homolog 3” (TRIB3) aktiválásával és a p65 NF- κ B útvonal gátlásával váltotta ki (59). A CBD ráadásul nemcsak *in vitro* (SZ95 sebociták) és *ex vivo* (teljes vastagságú humán bőr szervkultúra) bizonyult hatékonynak (59), hanem topikális alkalmazást követően fázis Ib és II klinikai vizsgálatokban is potens és kiemelkedően biztonságos anti-akne ágensnek bizonyult (clinicaltrials.gov ID: NCT03573518; további részletek a CBD-vel kapcsolatos jelenleg futó és a közeljövőre tervezett klinikai vizsgálatokról^{††} a <https://www.botanixpharma.com/> honlapon érhetőek el) (54,62).

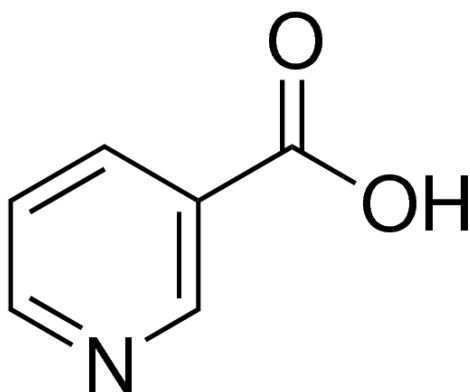
A fentiek szerint a CBD egy hatékony és biztonságos új szer lehet az akne kezelésében. A többi nem-pszichotróp pCB esetleges hatásairól azonban vizsgálatainkat megelőzően nem álltak rendelkezésre adatok, ezért jelen kísérleteink során öt ilyen, ezidáig kevésbé tanulmányozott, nem-pszichotróp pCB, a (-)-kannabikromén (CBC), a (-)-kannabidivarin (CBDV), a (-)-kannabigerol (CBG), a (-)-kannabigerovarin (CBGV) és a (-)- Δ^9 -tetrahidrokannabivarin (THCV) vizsgálatát végeztük el.

^{††} Megjegyzendő, hogy a disszertáció írásakor az akne mellett AD-ben (fázis II), pikkelysömörben (fázis Ib) és rosaceaban (fázis Ib) is vizsgálják a topikálisan alkalmazott CBD hatékonyságát.

3.3. A nikotinsav (NA) biológiai hatásai

3.3.1. Általános jellemzők

A nikotinsav (NA) vagy niacin (IUPAC: pyridine-3-carboxylic acid) egy, a B-vitamin családba tartozó, vízben oldódó vitamin, amely számos állati és növényi szövetben előfordul, és farmakológiai dózisban hatékony anti-hiperlipidémiás szer (63–70) (**4. ábra**).



4. ábra A nikotinsav szerkezeti képlete

Forrás:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/n4126?lang=hu®ion=HU> Letöltve: 2019. december 18.

A NA a nikotinamiddal együtt a B3 vitaminkomplex tagja, amely a nikotinamid-adenin-dinukleotidnak, vagyis a NAD-nak és foszfátjának, a NADP-nek a prekursora. Ezek a koenzimek fontos szerepet játszanak a sejtlégzésében, a glikogén-, lipid-, aminosav-, fehérje- és purinanyagcserében, és ezen keresztül a sejtek energia-háztartásában, illetve a DNS-lánc javításában (71,72).

3.3.2. A NA hiánybetegsége, a pellagra

A pellagra egy, a B3-vitamin hiánya által okozott komplex betegség (73). A megnevezés a „pelle agra” olasz kifejezésből származik, aminek jelentése „durva bőr”. Az ipari országokban a B3-vitamin szerepének felfedezése óta drasztikusan lecsökkent a prevalenciája, és inkább csak más betegségek és kórállapotok (pl. Crohn-betegség, alkoholizmus stb.) kísérőjelenségeként van jelen.

(a)



(b)



5. ábra A pellagra (a) és a dyssebacia (b) klinikai megjelenése

Forrás: Nogueira és mtsai., 2009 (74), illetve <https://www.semanticscholar.org/paper/Dyssebacia%3AAn-Early-Cutaneous-Marker-of-Niacin-Asifa-Shashikiran/503e38151fb154c8543b01125dbcc7f6cd8ab70e/figure/0>
Letöltve: 2019. december 18.

Hagyományosan a pellagra jellemző tüneteit „3+1 D”-ként (**d**ermatitisz [bőrgyulladás], **d**iarrhea [hasmenés], **d**emencia, illetve kezeletlenül „**d**eath”, azaz halál) szokás említeni (75), azonban fontos kihangsúlyozni, hogy gyakran egy ötödik „D”, a „**d**yssebacia” (5. ábra) is társulhat hozzá. Ez utóbbi egy főként az arcon jelentkező FM rendellenesség, ami abnormálisan besűrűsödött faggyú képződésével, szebocita hiperpláziával és következményes FM megnagyobbodással jár (76–78).

3.3.3. A farmakológiai dózisban adott NA fő celluláris célpontja: a „hydroxycarboxylic acid receptor 2” (HCA₂)

Amint arról fentebb már szó esett, a NA-at évtizedek óta széles körben alkalmazzák különféle diszlipidémiák kezelésében, miközben meglepő módon a nikotinamid (bár vitaminként a NA-val teljesen egyenértékű) nem rendelkezik azonos hatásokkal (79,80). A jelenség magyarázata az, hogy a NA képes aktiválni a „hydroxycarboxylic acid receptor 2”-t (HCA₂), míg a nikotinamid nem kötődik a receptorhoz (80–82).

A korábban „árva” receptorokként azonosított HCA receptorok G_i fehérjéhez kapcsoltan működnek, és jelenleg három altípusuk ismert: HCA₁ (korábban „GPR81” vagy „laktát receptor

1”), HCA₂ (korábban „GPR109A”, „HM74A”, „niacin receptor 1” vagy egérben „PUMA-G”) és HCA₃ (korábban „GPR109B” vagy „niacin receptor 2”)^{††}. Főként, de nem kizárólag adipocitákban és immunsejtekben expresszálódnak, és egyebek mellett a lipolízis, valamint az immunválasz szabályozásában vesznek részt (83).

A NA klinikai alkalmazását korlátozza egy ártalmatlan, ám elég kellemetlen és gyakran előforduló mellékhatás, a „niacin flush”, mely egy főleg az arcot és a felsőtestet érintő vazodilatáció miatt kialakuló bőrpír és a kapcsolódó viszketés és égő érzés (84). A reakció hátterében elsősorban az epidermális Langerhans sejtekből történő, döntően HCA₂-mediált prosztaglandin felszabadulás áll (85–88), azonban egyes adatok arra utalnak, hogy a TRPV1 NA általi (közvetlen vagy közvetett) aktivációja szintén szerepet játszik a folyamat kialakulásában (89). Újabb eredmények alapján a NA ráadásul nemcsak a TRPV1, hanem a TRPV2, TRPV3 és TRPV4 ioncsatornákat (89–91) és a G-protein kapcsolt ösztrogénreceptort (GPER; korábban „GPR30”) is képes aktiválni (80).

Tekintettel arra, hogy egy másik, a NA *per os* alkalmazása során fellépő lehetséges „bőr-releváns” mellékhatás a bőrszárazság (<https://www.drugs.com/pro/niacin.html>), a NA hiánya pedig FM megnagyobbodással járó dyssebaciához vezethet (5. ábra), felmerült, hogy a NA közvetlenül befolyásolhatja a humán sebociták biológiai folyamatait. Ezt a hipotézist ráadásul néhány kisebb klinikai vizsgálat eredményei is alátámasztani látszanak; ezekben ugyanis azt találták, hogy az orálisan alkalmazott NA jótékony hatású lehet aknéban (92–94).

Mindezek alapján feltételeztük, hogy a NA közvetlenül befolyásolhatja a FM-ek biológiai folyamatait, ezért jelen kísérleteink második felében a NA celluláris hatásait vettük górcső alá

^{††} Fontos megemlíteni, hogy – bár a NA alacsony (HCA₂), illetve magas (HCA₃) mikromoláris koncentrációban képes aktiválni a HCA₂ és HCA₃ receptorokat – valószínűtlen, hogy azok természetes endogén ligandja lenne (83).

humán szebocitákon, aminek keretében azt is megvizsgáltuk, hogy a HCA₂ receptor kifejeződik-e a sejteken, és ha igen, szerepet játszik-e a NA hatásainak közvetítésében.

4. 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 sebociták biológiai folyamatait?
2. A NA befolyásolja-e a bazális (homeosztatikus), illetve az aknéra jellemző kórosan fokozott faggyúlipid-termelést, a sejtek proliferációját, esetleg a sebociták immunprofilját, és ha igen, a hatásait a HCA₂ receptoron keresztül fejt-e ki?

5. Anyagok és módszerek

5.1. A kísérletek során felhasznált kémiai ágensek áttekintése

A kísérletek során alkalmazott arachidonoil-etanolamint (anandamid; AEA), 2-arachidonoil-glicerolt (2-AG) és arachidonsavat (AA) a Cayman Chemical Company-tól (Ann Arbor, MI, USA), a BAPTA AM-et pedig a Tocris-tól (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) vásároltuk. Az *Escherichia coli* 026:B6-ból származó, γ -besugárzott lipopoliszacharidot (LPS), a ruténium vöröst (RR), a tesztoszteront (T) és a NA-at a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) szereztük be, míg a vizsgált pCB-okat, azaz a CBC-t, a CBDV-t, a CBG-t, a CBGV-t és a THCV-t kollaborációs partnerünk, a GW Pharmaceuticals (Cambridge, Egyesült Királyság) bocsátotta rendelkezésünkre.

A NA-at közvetlenül a tápoldatban, az LPS-t szűrt desztillált vízben, az AEA-ot, AA-at és LA-at abszolút etanolban (VWR International Kft Radnor, Pennsylvania, USA), míg a BAPTA AM-et, a T-t és a RR-t dimetil-szulfoxidban (DMSO; VWR International Kft.) oldottuk. Annak érdekében, hogy kizárhassuk az esetleges nem-specifikus oldószerhatásokat, a 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. Ezzel összhangban vizsgálataink során kontrollként minden esetben az anyagok oldószerével megfelelő hígításban kezelt sejteket használtunk.

5.2. A humán immortalizált SZ95 sebociták tenyésztése

Kísérleteink során a humán FM-ekből származó immortalizált SZ95 sebocitákat (29) Sebomed™ Basal Medium-ban (Biochrom, Berlin, Németország) tenyésztettük, amelyet 10 (V/V)% hővel inaktivált magzati szarvasmarha szérummal (FBS; Life Technologies Carlsbad,

Kalifornia, USA), 1 mM CaCl₂-dal (VWR International Kft.), 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktorról (Sigma-Aldrich), valamint MycoZap™ Plus-CL-lel (1:500; Lonza, Bázél, Svájc) 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. Bár az alkalmazott speciális antibiotikumkeverék alkalmas a *Mycoplasma* fertőzés kivédésére, tenyészetünk esetleges *Mycoplasma* kontaminációját időről-időre teszteltük MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit segítségével (Lonza), és minden esetben negatív eredményt kaptunk. A tenyésztést 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú, párasított légtérben végeztük. A tenyésztést *Markovics Arnold, Magi József, Oláh Attila, Tóth Kinga Fanni, Sós Katalin Eszter, Szabó Pálma Tímea* és *Szabó-Papp Judit* végezte. Az SZ95 szobocitákat *Christos C. Zouboulis* biztosította.

5.3. A szobociták intracelluláris lipiddtartalmának meghatározása

A faggyúlipid-termelés szemikvantitatív vizsgálatához fluoreszcens Nile Red jelölést alkalmaztunk. A sejteket speciális, fluoreszcens mérésekhez optimalizált („black well/clear bottom”) 96 lyukú lemezre (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) szélesztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban, majd elvégeztük a megfelelő kezeléseket. A felülúszó eltávolítása után 100 µl PBS-ben oldott Nile Red oldatot (Sigma-Aldrich) mértünk a sejtekre (végkoncentráció: 1 µg/ml), majd 30 percen keresztül 37°C-on inkubáltuk őket. Az egyes lyukak fluoreszcencia intenzitását FlexStation™ II³⁸⁴ vagy FlexStation 3 készülék (Molecular Devices, San Francisco, CA, USA) segítségével mértük le (excitáció: 485 nm; emisszió: 565 nm). Minden kezelést legalább négy ismétléssel végeztünk; a kapott eredményeket a kontroll százalékában, átlag±SEM formában adtuk meg. A méréseket *Markovics Arnold, Magi József, Oláh Attila, Sós Katalin Eszter* és *Szabó Pálma Tímea* végezte.

5.4. Az életképesség vizsgálata (MTT-assay)

Az életképesség vizsgálatára MTT-assay-t alkalmaztunk. A módszer lényege, hogy az élő sejtek mitokondriumaiban megtalálható mitokondriális dehidrogenázok hatására a sárga színű 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid (MTT; Sigma-Aldrich) lila színű formazán kristállyá alakul át, mert az enzimek hasítják a kiindulási vegyületben található tetrazólium gyűrűt. A sejteket 96 lyukú lemezekre szélesztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban (24, 48 és 72 órás kezeléseket), majd az ábrákon jelzettek szerint kezeltük őket. Ezt követően a felülúszó eltávolítása után minden lyukba 100 µl PBS-ben oldott MTT oldatot (végkoncentráció: 0,5 mg/ml) pipettáztunk, és 37°C-on 2-3 órán át inkubáltuk a sejteket. Ezután az MTT oldatot eltávolítottuk, és minden lyukhoz 100 µl „MTT szolubilizáló oldatot” (81 [V/V]% 2-propanol, 9 [V/V]% 1 M HCl, 10 [V/V]% Triton X-100; [mind Sigma-Aldrich]) adtuk. Ezután a sejteket 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk közepesen intenzív rázatás mellett, amivel feloldottuk a sejtekben keletkező kristályokat. Végül a kristályok mennyiségét 565 nm-en mérve kolorimetriás úton határoztuk meg (FlexStation 3 készülék; Molecular Devices). Az ily módon mért abszorbancia jól korrelál az élő sejtek számával. Minden kezelést legalább négy ismétléssel végeztünk, az adatokat a kontroll százalékában, átlag±SEM formában adtuk meg. A méréseket *Markovics Arnold, Oláh Attila és Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.5. Az apoptózis és nekrosis vizsgálata

A mitokondriális membránpotenciál csökkenése az apoptotikus folyamatok egyik korai jele (95,96). Kísérleteink során ezért az esetleges apoptotikus folyamatok azonosítására a mitokondriális membránpotenciál fluoreszcens mérését végeztük el MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit (Life Technologies) segítségével. A kísérlet során alkalmazott festék (1,1',3,3',3',3'-hexametil-indodikarbocianin-jodid; a továbbiakban „DiIC₁(5)”), a mitokondriális membránpotenciál függvényében halmozódik fel a sejtek mitokondriumaiban, ennek megfelelően a korai apoptotikus jeleket mutató sejtekben csökkent fluoreszcencia intenzitást

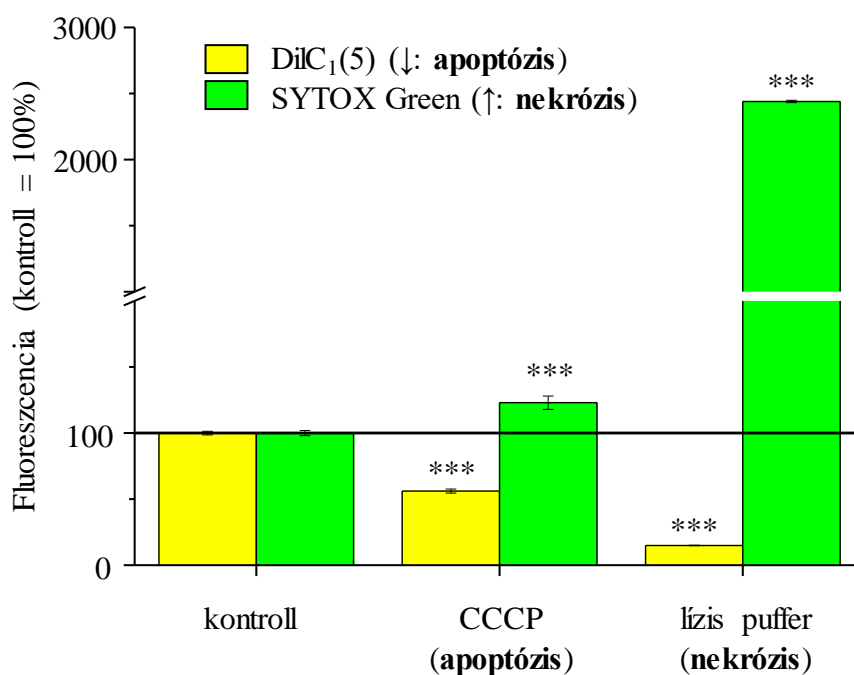
mérhetünk. A szebocitákat 20.000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük a már említett „black well/clear bottom” 96 lyukú lemezekre (Greiner Bio-One), majd a jelzett módokon kezeltük őket. A felülúszó eltávolítása után a sejteket 30 percig inkubáltuk 37°C-on DilC₁(5) munkareagenssel (50 µl/lyuk), ahol a festéket 1:200 arányban hígítottuk PBS-ben. Az inkubációt követően 100 µl/lyuk PBS-sel kétszer mostuk a sejteket, a fluoreszcencia intenzitást (excitáció: 630 nm; emisszió: 670 nm) FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével mértük le. Minden kezelést négy ismétléssel végeztünk, a relatív fluoreszcenciát a kontroll százalékában, átlag±SEM formában adtuk meg. Az apoptózis pozitív kontrolljaként egy mitokondriális szétkapcsoló molekulát, a karbonil-cianid m-klorofenil-hidrazont (CCCP; Life Technologies) alkalmaztunk a DilC₁(5) munkaoldatban 1:200 arányban hígítva (30 perc, 37°C; **6. ábra**). A méréseket *Markovics Arnold, Magi József, Oláh Attila és Tóth Kinga Fanni* végezte.

Az apoptotikus folyamatok mellett a nekrozis esetleges felléptére is kíváncsiak voltunk. A nekrotikus folyamatok vizsgálatát fluoreszcens SYTOX Green (Life Technologies) jelöléssel végeztük. A festék a nekrotizált szenvedett sejtek sérült, plazma-, illetve magmembránján keresztül a sejtmagba jutva a nukleáris duplaszálú DNS-hez kötődik, míg az ép plazmamembránnal rendelkező sejtek esetében a festék értelemszerűen a sejten kívül marad. Ennek megfelelően a nekrotikus sejtek esetében magas fluoreszcencia intenzitást mérhetünk, míg az ép membránnal rendelkező sejtek esetében ez az érték alacsony marad.

A sejteket 96 lyukú („black well/clear bottom”) lemezekre (Greiner Bio-One) szélesztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban, majd az ábrákon jelzettek szerint kezeltük őket. Ezután a felülúszót eltávolítottuk, a sejteket pedig PBS-ben hígított SYTOX Green (Life Technologies) reagenssel (végkoncentráció: 1 µM) inkubáltuk (30 perc; 37°C; 50 µl/lyuk). Az inkubáció letelte után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd FlexStation 3 készülék

(Molecular Devices) segítségével meghatároztuk az egyes wellek fluoreszcencia intenzitását (gerjesztés: 490 nm; detektálás: 520 nm).

A nekrosis pozitív kontrolljaként lízis pufferrel (1:100 arányban hígítva a SYTOX Green munkaoldatában 30 percig 37°C-on) kezeltük a sejteket (**6. ábra**). Minden kezelést négy ismétléssel végeztünk, a relatív fluoreszcencia intenzitást a kezeletlen kontroll (pCB-okkal végzett kísérletek) vagy a pozitív kontroll (NA-val végzett kísérletek) százalékában, átlag±SEM formában adtuk meg.



6. ábra Apoptotikus és nekrotikus sejthalál-folyamatokra jellemző eltérések *DilC₁(5)*-SYTOX Green kettős jelölés során humán szebocitákon

Tenyészeteinket 30 percig kezeltük az ábrán látható módon, majd fluoreszcens kombinált DilC₁(5)-SYTOX Green jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. ***p<0,001 a saját kontroll csoporthoz képest. **CCCP**: karbonil-cianid m-klorofenil-hidrazon (1:200; apoptózis pozitív kontroll); **lízis puffer**: 1:100 (nekrosis pozitív kontroll).

Az apoptózis (DiIC₁(5)), illetve nekrosis (SYTOX Green) vizsgálatára használt festékek eltérő excitációs és emissziós spektrumának, valamint a festési protokollok könnyű

harmonizálhatóságának köszönhetően a két festék egyidejű alkalmazásával lehetőségünk volt az apoptotikus és nekrotikus folyamatokat ugyanabban a mintában megvizsgálni, hiszen, amint az korábbi kísérleteink során már bebizonyosodott (36), a festékek szimultán használata nem okoz különbséget a csak egyetlen festéket tartalmazó munkaoldattal elvégzett mérésekhez képest.

A fentebb említett apoptózis, illetve nekrozis pozitív kontrollok hatására kialakuló tipikus apoptotikus (jelentős csökkenés a DiIC₁(5) és minimális vagy hiányzó növekedés a SYTOX Green jelben) és nekrotikus (jelentős növekedés a SYTOX Green jel intenzitásában) válaszokra a **6. ábrán** látható egy példa. A méréseket *Markovics Arnold, Magi József, Oláh Attila és Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.6. A proliferáció vizsgálata (CyQUANT proliferációs assay)

A szebociták proliferációjának vizsgálatát CyQUANT proliferációs assay segítségével végeztük. Az assay az egyes wellekben található DNS mennyiségének mérésével ad közvetlen információt a sejtszámról, azaz (az MTT-assay-vel ellentétben) valóban a proliferációt méri, hiszen a mitokondriális aktivitás esetleges sejtszámtól független változásai nem befolyásolják az eredményét. Ennek megfelelően a jelintenzitás csökkenése proliferációs blokk és/vagy élősejtszám-csökkenés felléptére utalhat, míg a kontrollhoz viszonyított emelkedése a sejtszám növekedését jelzi.

A szebocitákat a korábban már említett 96 lyukú „black well/clear bottom” lemezekre (Greiner Bio-One) szélesztettük 2.000 sejt/lyuk denzitásban, és az ábrákon jelölt módokon kezeltük őket. Ezután a felülúszókat eltávolítottuk, a lemezeket pedig a mérésig -80°C-on tároltuk, ami a tartósítás mellett permeabilizálta is a sejteket. A mérés elvégzésekor a kit részét képező, desztillált vízzel 20-szorosára hígított „20x lysis buffer stock solution”-ban „CyQUANT GR stock solution”-t hígítottunk (1:400). Az így elkészített munkaoldatokból 200

μ l-t mértünk minden wellbe, majd öt percig szobahőn fénytől védve inkubáltuk a lemezeket. A fluoreszcencia intenzitást FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével mértük le (gerjesztés: 480 nm; detekció: 520 nm), majd a 24 órás kontroll értékének százalékában, $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában adtuk meg. Minden kezelést négy ismétléssel végeztünk. A méréseket *Markovics Arnold, Sós Katalin Eszter, Szabó Pálma Tímea és Tóth Kinga Fanni* végezte.

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

A reverz transzkripciót követő, kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakciót Roche LightCycler 480 System (Roche, Basel, Switzerland) segítségével, 5' nukleáz assay-vel végeztük. A teljes RNS-t TRIzol (Life Technologies) felhasználásával izoláltuk, majd az esetleges genomi DNS szennyezés eliminálására a gyártó protokolljának megfelelően DNáz kezelést végeztünk. Ezután a teljes RNS 1 μ g-jából kiindulva a High-Capacity cDNA Kit (Life Technologies) segítségével állítottunk elő cDNS-t. A Q-PCR amplifikációs reakciót TaqMan assay-kkel végeztük (Life Technologies; az assay ID-k a következők voltak: Hs00174092_m1 [*IL-1 α*], Hs00174097_m1 [*IL-1 β*], Hs00985639_m1 [*IL-6*], Hs00174103_m1 [*IL-8*], Hs00174128_m1 [*tumornekrózis faktor [TNF]- α*]; Hs00271958_s1 [*HCA₂*]). Belső kontrollként a *18S riboszomális RNS (18S RNS)* vagy a *gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH)* expresszióját határoztuk meg (assay ID-k: Hs03928985_g1, illetve Hs99999901_s1). A reakciókat három technikai ismétléssel végeztük. A relatív expressziót a jelzett belső kontroll kifejeződésére vonatkoztatva a Δ CT módszert alkalmazva $\text{átlag} \pm \text{SD}$ alakban adtuk meg. Azokban az esetekben, amikor a génexpresszió kezelés hatására történő esetleges változásait vizsgáltuk, a $\Delta\Delta$ CT módszert alkalmaztuk. Ennek során a megfelelő belső kontrollra történő normálást követően a relatív expressziót a kezeltlen kontroll esetében tapasztalható relatív expresszióra is normáltuk. A méréseket *Markovics Arnold, Sós Katalin Eszter, Magi József, Szabó Pálma, Szabó-Papp Judit és Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.8. Immunfluoreszcens jelölés (IF)

A sejteket 6 lyukú tenyésztőedényekbe helyezett steril fedőlemezekre szélesztettük, és nagyjából 60%-os konfluencia szint eléréséig tenyésztettük. A sejteket PBS-ben hígított 4%-os paraformaldehid segítségével fixáltuk nedveskamrában, szobahőmérsékleten (5 perc). Az aspecifikus kötőhelyek blokkolását PBS-sel történő mosás után 30 mg/ml BSA-t (szarvasmarha szérum albumint) tartalmazó PBS oldattal (mindkettő a Sigma-Aldrich-tól) végeztük (30 perc szobahőn, nedveskamrában). A sejteket 4 órán át inkubáltuk 37°C-on nyúlban termeltetett humán HCA₂ elleni elsődleges antitesttel (1:50 arányban oldva 15 mg/ml BSA-t tartalmazó PBS-ben; Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA). Ezután a fedőlemezeket háromszor mostuk PBS-ben, majd 60 percen keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten Alexa Fluor[®] 488-cal konjugált, nyúl immunglobulin Fc-szakasza elleni másodlagos antitesttel (1:1000 arányban oldva 15 mg/ml BSA-t tartalmazó PBS-ben; Cell Signaling Technology, Leiden, Hollandia) és a magfestőként alkalmazott 4',6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI; 1:1000 arányban oldva 15 mg/ml BSA-t tartalmazó PBS-ben) tartalmazó Vectashield fedőmédiummal (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Végül ismét háromszori PBS-es mosást követően, a sejtekről egy Olympus IX81 típusú fluoreszcens mikroszkóp (Olympus, Sindzsú Ku, Tokió, Japán) segítségével felvételeket készítettünk (excitáció/emisszió: 488/519 nm [Alexa Fluor[®] 488] és 360/460 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* (97) segítségével határoztuk meg, majd a háttérre (azaz a sejtmentes terület átlagos szürke értékére) normáltuk. A méréseket *Markovics Arnold, Magi József, Gyöngyösi Adrienn és Tóth Kinga Fanni* végezte.

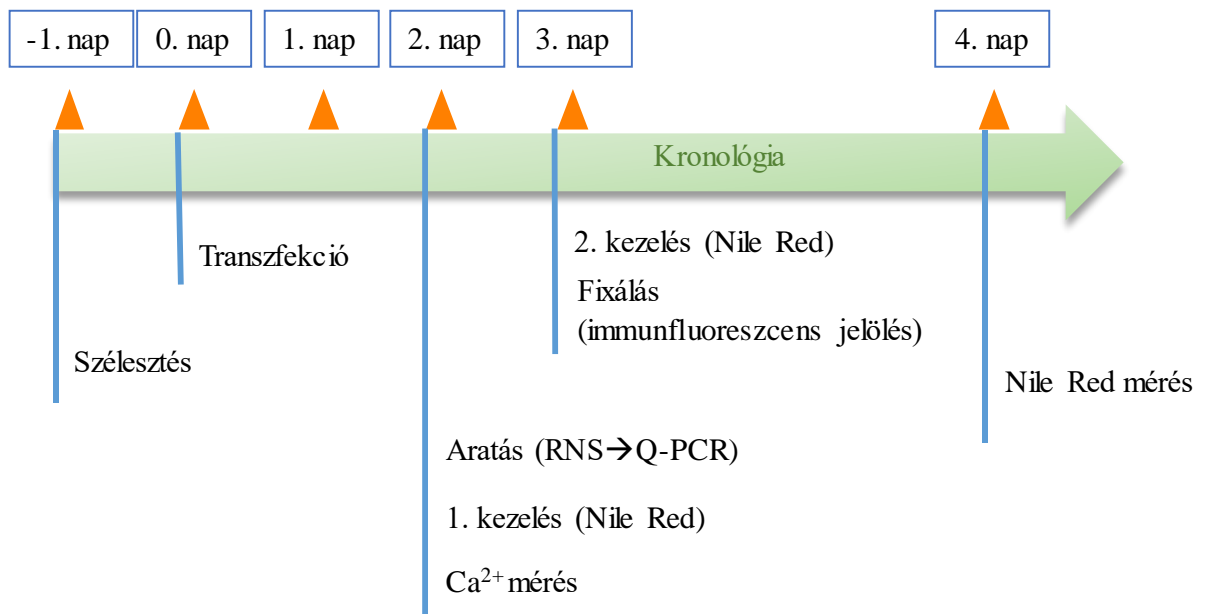
5.9. A citokin-felszabadulás vizsgálata (IL-6 és IL-8 ELISA)

A citokin-felszabadulás vizsgálata során a standardizált módon (500.000 sejt 1,5 ml tápoldatban, 35 mm átmérőjű Petri-csészékben) szélesztett sejteket az ábrákon jelzett módokon kezeltük 3, illetve 24 órán keresztül. A kezelések után a felülúszókat begyűjtöttük, lecentrifugáltuk (500 g; 10 perc), és a törmelékmentes felülúszót -80°C-on tároltuk. A felszabadult IL-6 és IL-8 mennyiségét OptEIA kitek segítségével, a gyártó protokollját követve határoztuk meg (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA). A méréseket *Markovics Arnold, Szabó-Papp Judit* és *Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.10. Szelektív géncsendesítés (siRNS transzfekció)

Az SZ95 szebocitákat Petri-csészékbe (d = 35 mm), 96 lyukú („black well/clear bottom”) lemezekre (Greiner Bio-One) vagy 6 lyukú tenyésztőedényekbe helyezett steril fedőlemezekre szélesztettük, majd másnap, 50-70%-os konfluenciaszinten a tápoldatot szérumentes OptiMem médiumra (Life Technologies) cseréltük, és a sejteket HCA₂-re specifikus (Stealth RNAi, ID: HSS155269; Life Technologies), duplaszálú, kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal transzfektáltuk Lipofectamine[®] RNAi MAX transzfekciós reagens (Life Technologies) segítségével. Kontrollként a sejteket Stealth RNAi Negative Control „medium” (Life Technologies) duplaszálú siRNS-sel transzfektáltuk, ami egyetlen ismert mRNS szekvenciájával sem mutat homológiát („scrambled” RNS, „SCR”).

A géncsendesítés hatékonyságát a transzfekciót követően 2. és 3. napon ellenőriztük mRNS (Q-PCR), illetve a fehérje szinten (immunfluoreszcens jelölés). A géncsendesítés, majd az azt követő funkcionális mérések időrendjét a **7. ábra** tekinti át. A kísérleteket *Markovics Arnold* végezte.



7. ábra A szelektív „géncsendesítés”, majd az azt követő mérések időrendjének áttekintése

A transzfekcióra a sejtek szélesztését követő napon (az ábrán „0. nap”-ként jelölve) került sor. A csendesítés hatékonyságát a 2. napon mRNS, a 3. napon fehérje szinten ellenőriztük. A transzfekciót követő 2. napon végeztük el a Ca^{2+} -mérést, illetve megkezdtük a faggyúlipid-termelésre gyakorolt hatások (2 napos) vizsgálatát. A transzfekciót követő 3. napon (a már említett immunfluoreszcens jelölésre történő mintagyűjtés mellett) elvégeztük a faggyúlipid-termelés vizsgálatához kapcsolódó második kezelést is, végül a 4. napon a Nile Red jelölés kivitelezésével zártuk a kísérletsorozatot.

5.11. Fluoreszcens Ca^{2+} -mérés

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

A sejteket a már említett 96 lyukú „black well/clear bottom” lemezekre (Greiner Bio-One) szélesztettük (20.000 sejt/lyuk). A mérés során a felülúszó eltávolítása után egyszer mostuk a sejteket Hank oldattal (100 μl /lyuk; 136,75 mM NaCl, 5,56 mM glükóz, 5,36 mM KCl, 4,17 mM NaHCO_3 , 1,26 mM CaCl_2 , 0,34 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,44 mM KH_2PO_4 , 0,81

mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mM HEPES; pH 7,2), melyet BSA-val (Sigma-Aldrich; végkoncentráció: 1 mg/ml) és a nem-specifikus transzporterek által mediált Fluo-4 „szivárgás” elkerülésére probeneciddel (Life Technologies; végkoncentráció: 2,5 mM) egészítettünk ki. Amikor névlegesen kalciummentes Hank oldatot készítettünk („alacsony $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ ”), a CaCl_2 -ot ekvimoláris mennyiségű glükózzal pótoltuk, de nem alkalmaztunk Ca^{2+} -kelátort, így az oldat elméletileg szennyezésként tartalmazhatott nyomnyi mennyiségben Ca^{2+} -ot.

A mosást követően 100 μl /lyuk, 1 μM Fluo-4 AM-et tartalmazó Hank oldattal töltöttük fel a sejteket (30 perc, 37°C). Ezután három újabb mosás következett (100 μl /lyuk Hank oldat vagy névlegesen Ca^{2+} -mentes Hank oldat), végül pedig a sejtekre Hank oldatot vagy névlegesen Ca^{2+} -mentes Hank oldatot mértünk (150 μl /lyuk), és újabb 30 percig inkubáltuk őket 37°C-on. Ezt követően FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével „Flex” módban végeztük el a méréseket (gerjesztés: 490 nm; detekció: 520 nm) szobahőmérsékleten (~20-22°C). Ennek során 3-5 percen keresztül követtük nyomon az egyes wellekben mérhető fluoreszcencia intenzitást. Az egyes mérésekre az adott érzékenységi paraméterek mellett beállítható a lehető legrövidebb (nagyjából 1,2 másodperces) időközökkel került sor. A mérések harmincötödik másodperce után a készülék 50 μl (a célkoncentrációhoz képest négyszeres töménységű) kezelőoldatot mért a sejtekre. Ennek megfelelően előbb egy minimum 35 másodperces (kezelés előtti) alapjelet rögzítettünk, aminek az átlagértékével (F_0) normáltuk a mért értékeket. Minden kezelést legalább 3 ismétléssel végeztünk, és a relatív fluoreszcencia intenzitást az adott wellben mért alapjellel korrigálva, F/F_0 alakban ábráztuk, ahol F_0 az átlagos kiindulási fluoreszcencia, míg F az aktuálisan mért fluoreszcencia. A sejtek reaktivitásának és életképességének tesztelésére a mérések végén pozitív kontrollként 0,2 mg/ml ATP-t adtunk a wellhez (az adatok nincsenek bemutatva). A méréseket *Markovics Arnold, Oláh Attila és Tóth Kinga Fanni* végezte.

5.12. Statisztikai analízis

Az adatokat az *IBM SPSS Statistics 19* (SPSS Inc., Armonk, NY, USA), illetve *Origin Pro Plus 6.0 szoftver* (Microcal, Northampton, MA, USA) segítségével, Student-féle kétoldalú, kétmintás t-próbával (páros összehasonlítások) vagy egyutas ANOVA-t követő Bonferroni *post hoc* tesztekkel (többszörös összehasonlítás) vizsgáltuk, és a $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikáns különbségnek. A grafikonokat *Origin Pro Plus 6.0 szoftver* (Microcal) segítségével ábrázoltuk. Az analízist *Markovics Arnold*, az ábraszerkesztést *Markovics Arnold* és *Oláh Attila* végezte.

6. Eredmények

6.1. A kiválasztott, nem-pszichotróp pCB-ok eltérően befolyásolják az SZ95 szebociták biológiai folyamatait

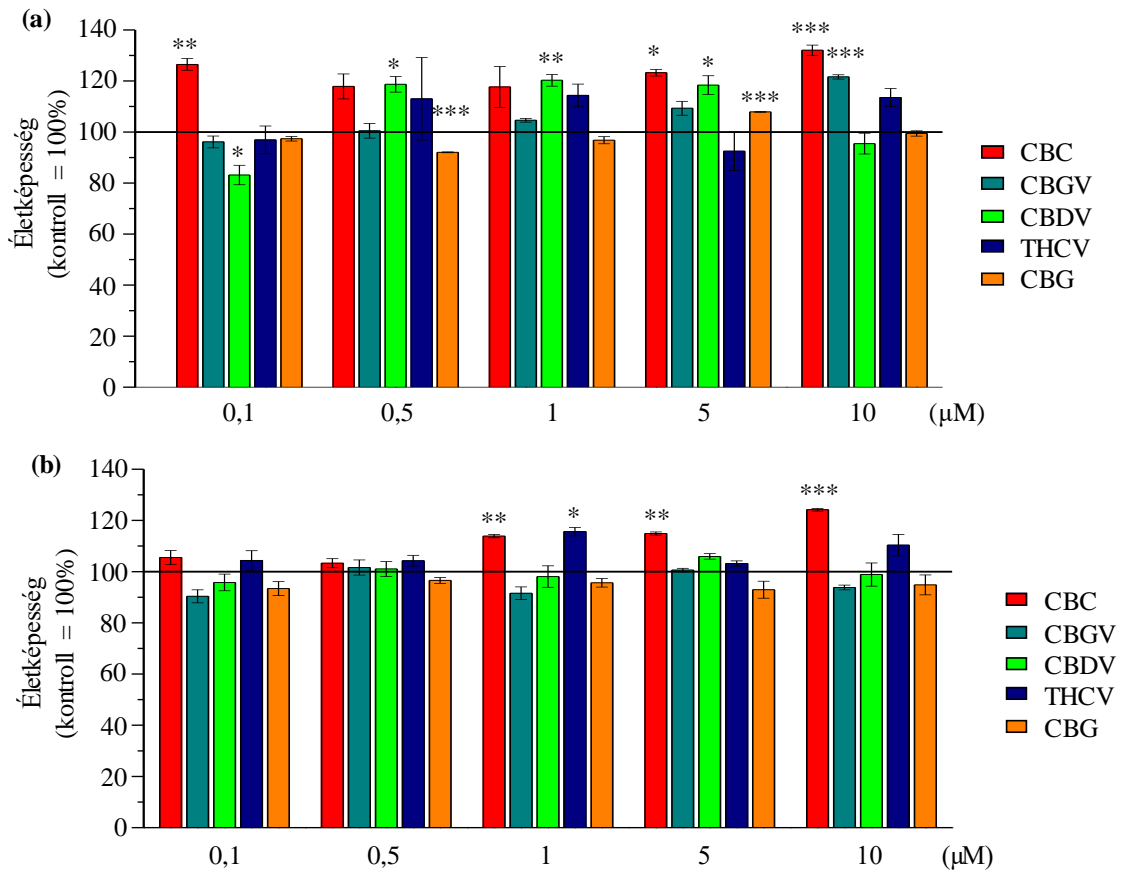
Kísérleteinket a *Bevezetésben*, az *Irodalmi áttekintésben* és a *Célkitűzésben* részletezetteknek megfelelően a választott pCB-ok humán szebocitákra gyakorolt hatásainak vizsgálatával kezdtük meg.

6.1.1. A pCB-ok dóziszfüggő-módon befolyásolják a szebociták életképességét

Amint arról az előzőekben már szó esett, 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 (35,39). Kimutattuk továbbá, hogy a nem-pszichotróp pCB CBD alacsony mikromoláris koncentrációban történő alkalmazása komplex anti-akne hatások kialakulásához vezet (59). 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.

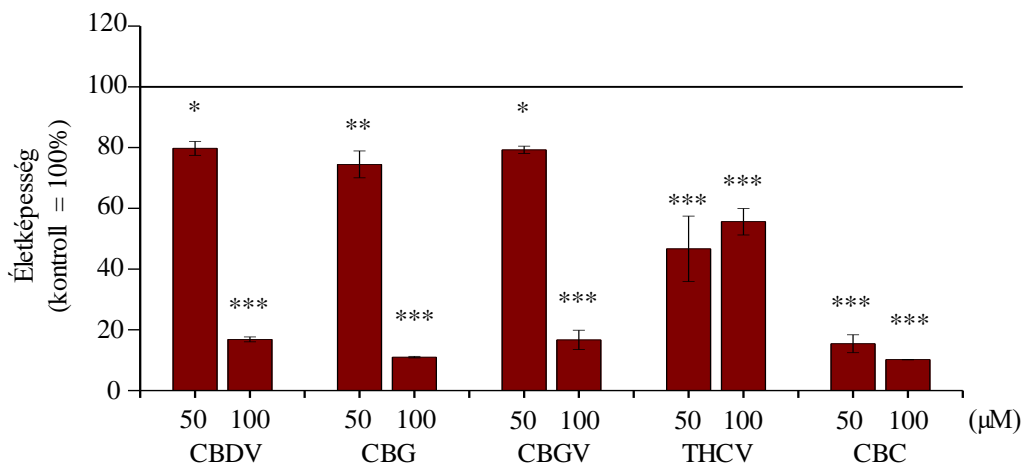
Mint minden hatóanyag-vizsgálat kezdetén, itt is meg kívántuk határozni azt a még hatásos dózistartományt, amely szignifikánsan nem hat a sejtek életképességére, ezért először MTT-assay-t végeztünk. Ahogy az az oszlopdiagramokon is látható, az öt kiválasztott pCB a 0,1-10 μM -os koncentrációtartományban még 48 óra elteltével sem csökkentette érdemben a sejtek életképességét^{§§} a folytonos vonallal jelölt kontrollhoz képest (**8/a-b ábra**). Ezzel szemben magasabb (50-100 μM -os) koncentrációban alkalmazva már 24 órás kezeléseket követően is szignifikáns csökkenést okoztak az MTT-jel intenzitásában (**9. ábra**).

^{§§} Jelen kísérletben a célunk csak a nem-citotoxikus koncentrációtartomány azonosítása volt, így figyelmünket elsősorban a jelintenzitás csökkenésére fordítottuk, azonban megjegyzendő, hogy néhány esetben meglepő módon növekedést tapasztaltunk. Tekintettel arra, hogy a megadott kiinduló sejtszám mellett a szebociták további proliferációja elenyésző mértékű, a CBC MTT-jelet fokozó hatásának legvalószínűbb magyarázata a mitokondriális aktivitás (jelenleg még ismeretlen mechanizmussal történő) növelése.



8. ábra 10 μM-os koncentrációig a pCB-ok a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazhatóak

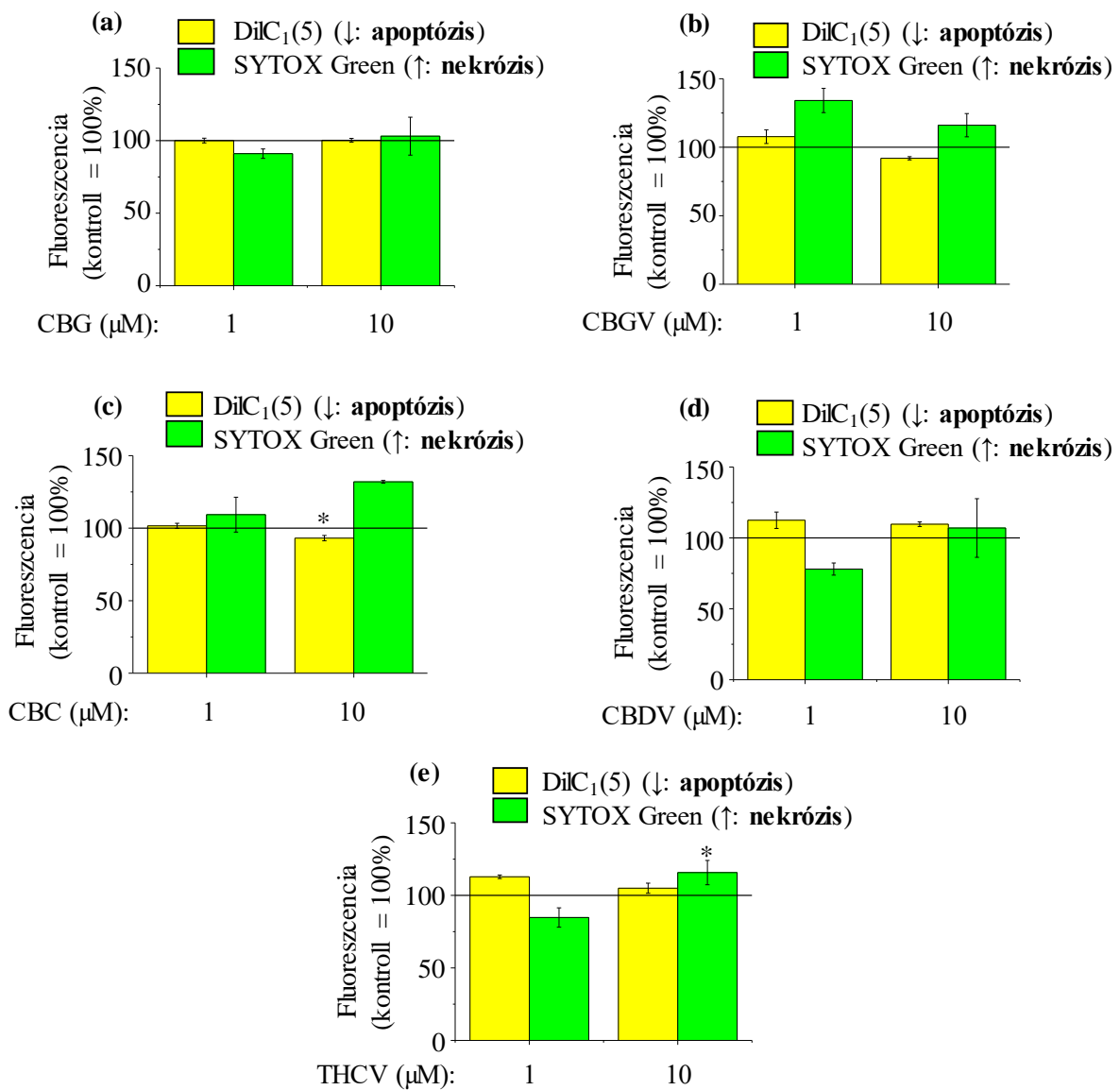
Tenyészeteinket 24 (a), illetve 48 (b) órán keresztül kezeltük az ábrán látható módon, majd MTT-assayt végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. *, **, ***p<0,05, 0,01, illetve 0,001 a kontroll csoporthoz képest. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.



9. ábra 50-100 μM-os koncentrációban alkalmazva a pCB-ok szignifikánsan csökkentik a szebociták életképességét

Tenyészeteinket 24 órán keresztül kezeltük az ábrán látható módon, majd MTT-assay-t végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. *, **, ***p<0,05, 0,01, illetve 0,001 a kontroll csoporthoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

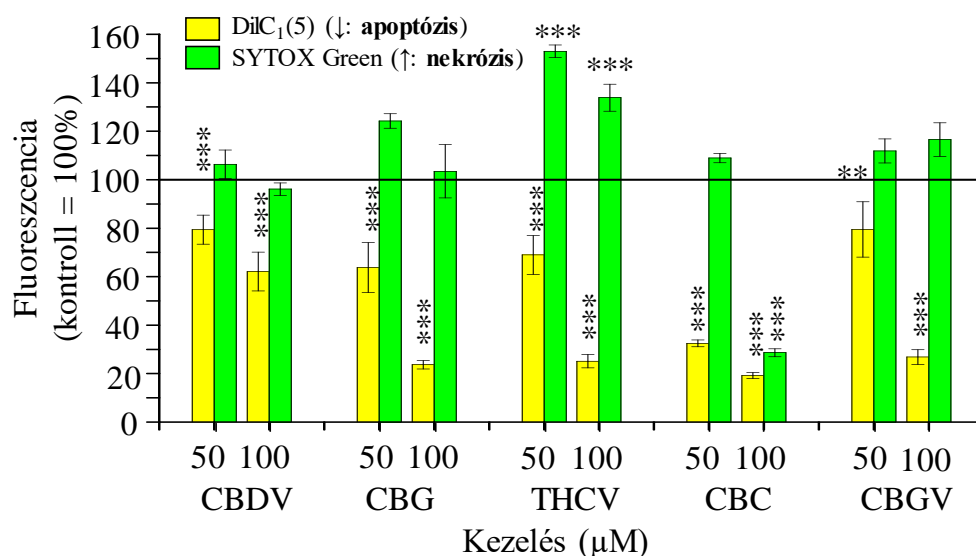
A magasabb koncentrációtartományban végzett MTT-assay eredményei alapján felmerült, hogy a pCB-ok alkalmazása akár az alacsonyabb, $\leq 10 \mu\text{M}$ -os koncentrációkban is elindíthat az MTT-assay-n még változást nem okozó, korai sejthalál folyamatokat. Ennek a kérdésnek az eldöntésére kombinált DiI_C₁(5)-SYTOX Green jelölést végeztünk (10. ábra).



10. ábra A vizsgált pCB-ok $\leq 10 \mu\text{M}$ -os koncentrációban nem indukálnak korai sejthalál folyamatokat

Tenyészeteinket 24 órán keresztül kezeltük az ábrán látható módon, majd fluoreszcens kombinált DiI_C₁(5)-SYTOX Green jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. * $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Megállapítottuk, hogy - a korábban bemutatott (8. ábra) MTT-assay eredményeivel összhangban - 10 μ M-ig a választott pCB-ok egyike sem növelte biológiailag releváns mértékben ^{***} a nekrotikus vagy apoptotikus sejtek arányát (10. ábra). A pCB-ok magasabb (50-100 μ M) koncentrációi ugyanakkor apoptózis-domináns sejthalált okoztak, hiszen kivétel nélkül jelentősen csökkentették a mitokondriális membránpotenciál mértékét jelző DilC₁(5), és nem (CBG, CBGV, CBC és CBDV) vagy csak kis mértékben (THCV) fokozták a SYTOX Green jelintenzitását (11. ábra).



11. ábra A vizsgált pCB-ok magas koncentrációban apoptózist indukálnak

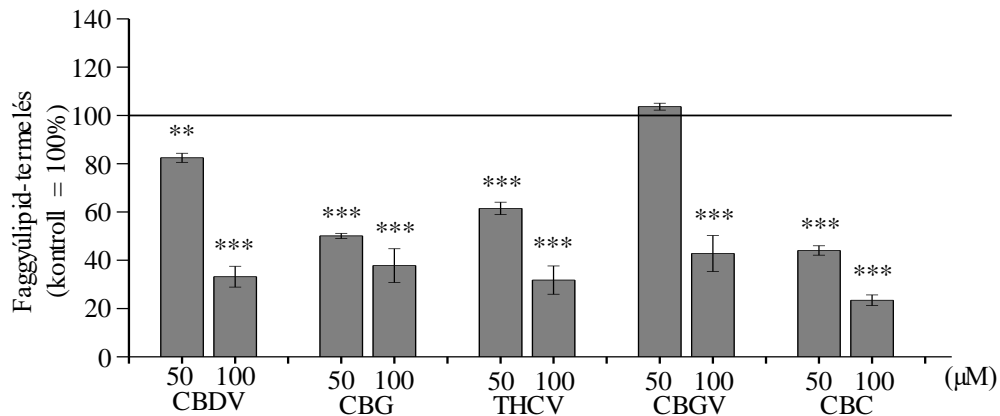
Tenyészeteinket 24 órán keresztül kezeltük az ábrán látható módon, majd fluoreszcens kombinált DilC₁(5)-SYTOX Green jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. **, *** p <0,01, illetve 0,001 kontroll csoporthoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. Megjegyzés: A 100 μ M CBC kezelés esetén tapasztalható SYTOX Green jelintenzitás-csökkenés nagy valószínűséggel késői nekrotikus folyamatok miatti mosási artefaktumnak felel meg.

6.1.2. A pCB-ok eltérően befolyásolják a humán szebociták faggyúlipid-termelését

Ezután megvizsgáltuk a pCB-ok hatását a szebociták egyik legjellemzőbb biológiai funkciójára, a homeosztatis faggyúlipid-termelésére. Nem meglepő módon a pCB-ok

^{***} Megjegyzés: Bár 10 μ M THCV kezelést követően a kapott SYTOX Green értékek matematikailag szignifikánsan magasabbnak adódtak a kontroll esetében detektáltáknál, ez a növekmény valójában biológiailag irreleváns. Apoptózis, illetve nekrozis esetén tapasztalható tipikus eltérésekre az *Anyagok és módszerek* fejezetben a 6. ábrán mutatunk példát, melyekkel összevetve az 10. ábrán látható változás elenyésző mértékű.

citotoxikus ($\geq 50 \mu\text{M}$) koncentrációi jellemzően jelentősen csökkentették a bazális faggyúlipid-szintézist (**12. ábra**; 24 órás kezelések).

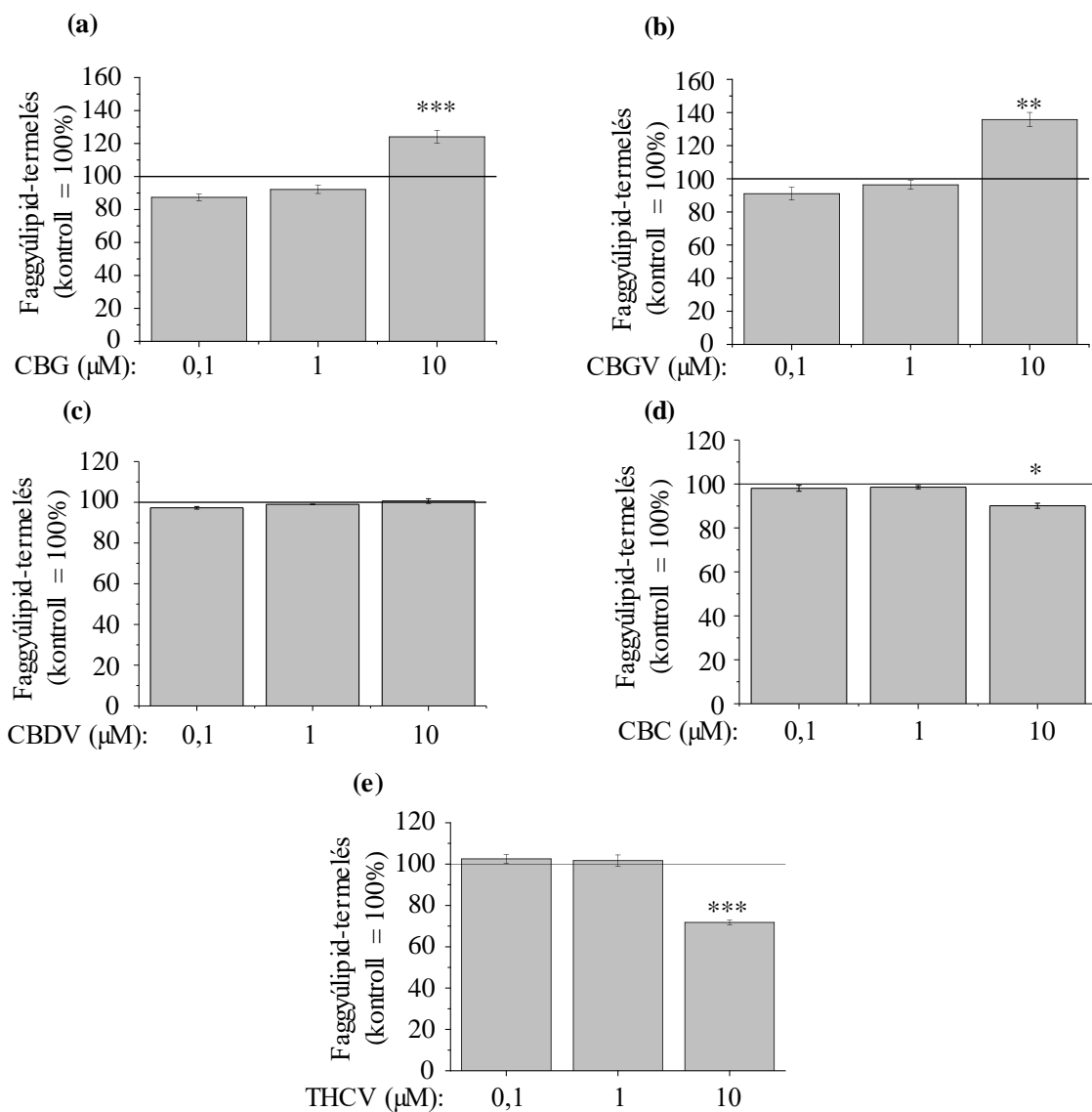


12. ábra A pCB-ok magas koncentrációi csökkentik a bazális faggyúlipid-termelést

Tenyészeteinket 24 órán keresztül kezeltük az ábrán látható módon, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. **,***p<0,01, illetve 0,001 a kontroll csoporthoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Ezzel szemben a nem citotoxikus ($\leq 10 \mu\text{M}$) koncentrációban alkalmazott pCB-ok érdekes módon eltérően befolyásolták a faggyúlipid-termelést, ami alapján az öt anyagot három funkcionálisan eltérő hatású („eCB-szerű”, lipogén; „CBD-szerű”, neutrális; illetve liposztatikus) csoportba sorolhattuk (**13. ábra**).

Eredményeink szerint az „eCB-szerűen” (35,39) viselkedő CBG és a CBGV kis (kb. 20-30%-os növekedés a kontrollhoz képest), de szignifikáns mértékben fokozta a faggyúlipid-termelést (**13/a-b ábra**). Ezzel szemben a „CBD-szerű” (59) hatást kiváltó CBDV esetében a változás nem volt szignifikáns (**13/c ábra**), míg a CBC és a THCV szignifikánsan csökkentette azt (**13/d-e ábra**). 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.



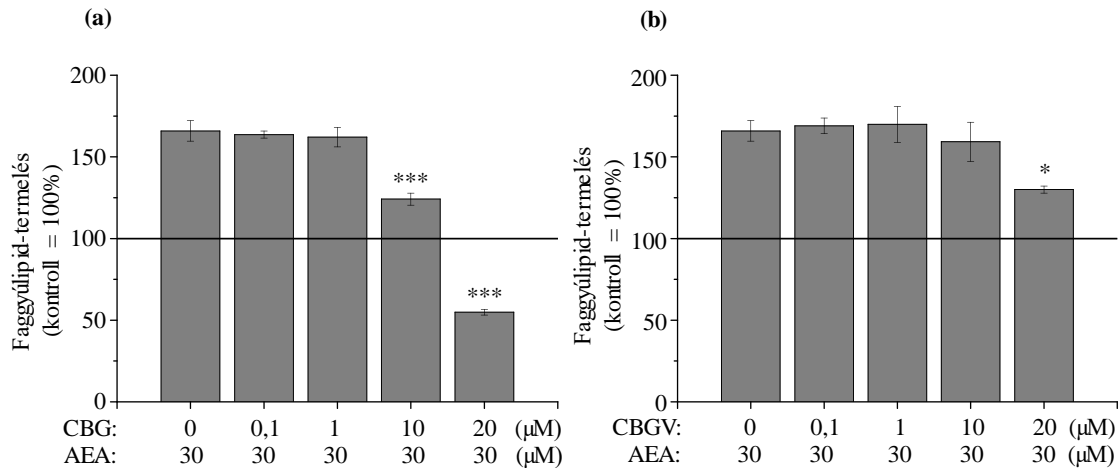
13. ábra A kiválasztott nem-pszichotróp pCB-ok eltérő módon befolyásolják a homeosztatisz faggyúlipid-termelést

Tenyészeteinket 48 órán keresztül kezeltük az ábrán látható módokon, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. *, **, ***p<0,05, 0,01, illetve 0,001 a kontroll csoporthoz képest. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

6.1.3. 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 μM-ban (CBG) szignifikánsan csökkentették azt (**14/a-b ábra**). Ennek

alapján felvetődik annak a lehetősége, hogy a CBG és a CBGV az AEA lipogén útvonalának gyenge, parciális aktivátorai lehetnek, amelyek az AEA-dal egyidejűleg alkalmazva gyengíthetik az eCB lipogén hatását.

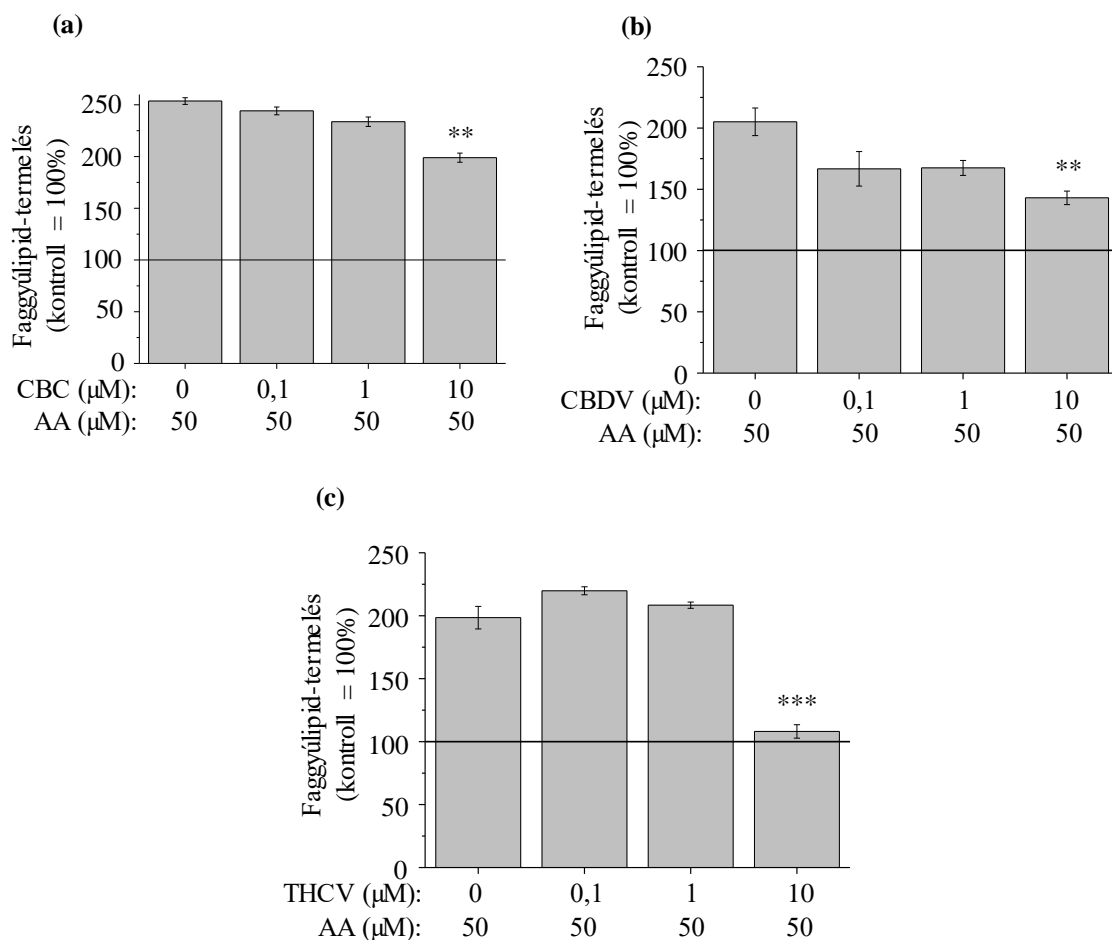


14. ábra A CBG és a CBGV csökkenti az AEA lipogén hatását

Tenyészeteinket 48 órán keresztül kezeltük az ábrán látható kombinációkban, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4-8), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. *,***p<0,05, illetve 0,001 a kizárólag lipogénnel kezelt csoporthoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

6.1.4. 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 (27). Ennek megfelelően a következőkben megvizsgáltuk, hogy a THCV, a CBC és a CBDV miként befolyásolja az AA által indukált, „akne-szerű” (27,59), kórosan fokozott lipidszintézist. Megállapítottuk, hogy mind a CBC, mind a CBDV képes volt csökkenteni az AA által indukált lipidszintézist (**15/a-b ábra**), azonban hatékonyságukat messze meghaladta a THCV-é, amely a CBD-hez hasonlóan (59) gyakorlatilag teljes mértékben normalizálta a faggyúlipid-termelést (**15/c ábra**). 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.



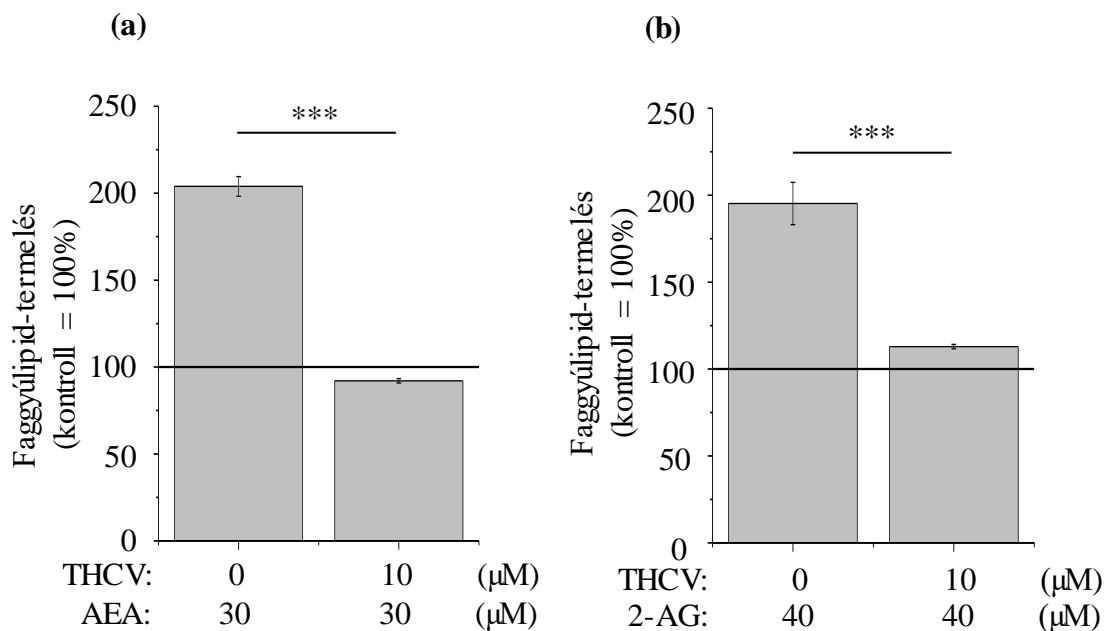
15. ábra A CBC, a CBDV és a THCV jelentősen csökkenti az AA-val indukált, aknét modellező, kórosan fokozott faggyúlipid-termelést

Tenyészeteinket 48 órán keresztül kezeltük az ábrán látható kombinációkban, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábráztuk. **,***p<0,01, illetve 0,001 a kizárólag lipogénnel kezelt csoporthoz képest. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

6.1.5. A THCV nem citotoxikus koncentrációban univerzális liposztatikus hatást fejt ki

A következőkben kísérleteket végeztünk annak megállapítására, hogy a THCV ezen figyelemre méltó liposztatikus hatása kizárólag az AA által indukált, döntően PKCδ által mediált (36) lipidtermelés kivédésére korlátozódik, vagy egy univerzális liposztatikus út aktiválása révén alakult ki. Ennek során két, a fentitől eltérő lipogén útvonalon ható eCB-ot, az AEA-ot és a 2-AG-t (35) alkalmazva végeztünk el a Nile Red jelölést. Azt tapasztaltuk, hogy a

CBD-hez hasonlóan (59) a 10 μM -ban alkalmazott THCV is képes mindkét eCB lipogén hatásának (16. ábra) normalizálására, azaz univerzális liposztatikus hatást mutat.

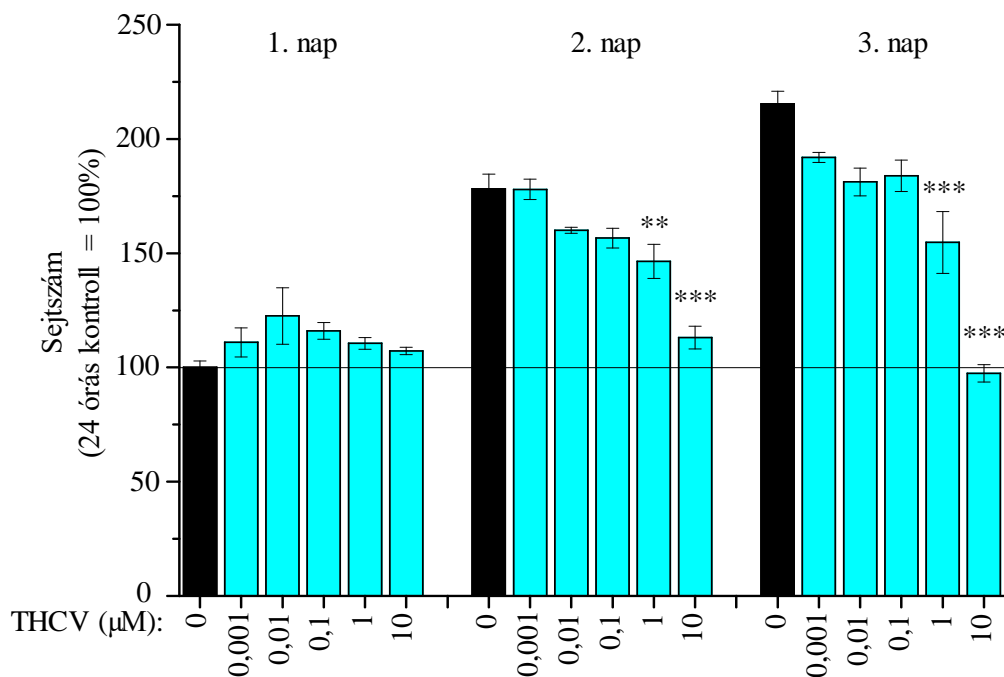


16. ábra A THCV univerzális liposztatikus hatást fejt ki

Tenyészeteinket 48 órán keresztül kezeltük az ábrán látható kombinációkban, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. *** $p < 0,001$ a jelölés szerint. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

6.1.6. A THCV nem citotoxikus koncentrációi anti-proliferatív hatásúak humán szebocitákon

Amint arról az *Irodalmi áttekintés*ben is szó esett, a faggyútermelés holokrin mechanizmusa miatt az aknéhoz vezető szeborrea kialakulásában az egyedi szebociták fokozott faggyúlipid-termelésén túl a sejtek száma is kiemelkedő jelentőségű. A proliferáció visszafogása és ezzel a sejtszám csökkentése ennek megfelelően már önmagában is nagy hatékonysággal mérsékelheti a faggyútermelést *in vivo* (14,98,99), ezért kísérleteink következő lépéseként megvizsgáltuk a THCV sejtszámra gyakorolt hatásait. CyQUANT proliferációs assay alkalmazásával kimutattuk, hogy a THCV dóziszfüggő módon csökkentette a szebociták proliferációját az 1-10 μM -os koncentrációtartományban (17. ábra).

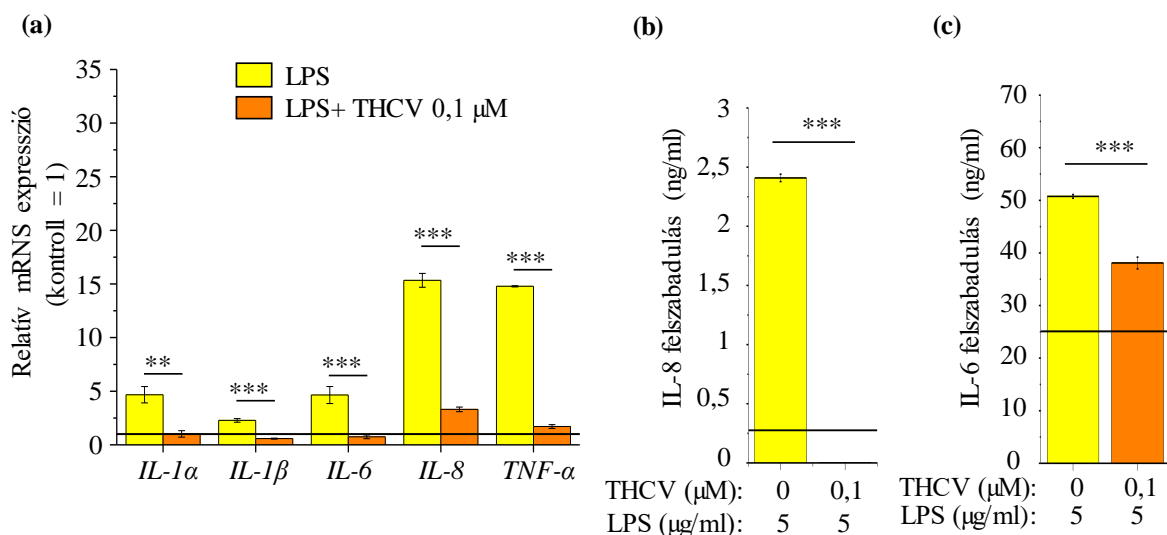


17. ábra A THC*V* nem-citotoxikus koncentrációi jelentős anti-proliferatív hatást váltanak ki humán szebocitákon

Tenyészeteinket 24, 48, illetve 72 órán keresztül kezeltük, majd CyQUANT proliferációs assay-t végeztünk. Az eredményeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt 24 órás kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. **,***p<0,01, illetve 0,001 az adott napi kontrollhoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

6.1.7. A THC*V* erőteljes gyulladásgátló hatást mutat

A kórosan megnövekedett lipogenezis és proliferáció mellett az akne harmadik fontos szebocita-specifikus lépése a gyulladás (27), ezért a fenti adatok alapján megvizsgáltuk a THC*V* szebociták immunprofiljára gyakorolt hatásait. A gyulladáshoz vezető választ a TLR4 aktivátor lipopoliszacharid (LPS; 5 μg/ml) alkalmazásával váltottuk ki.



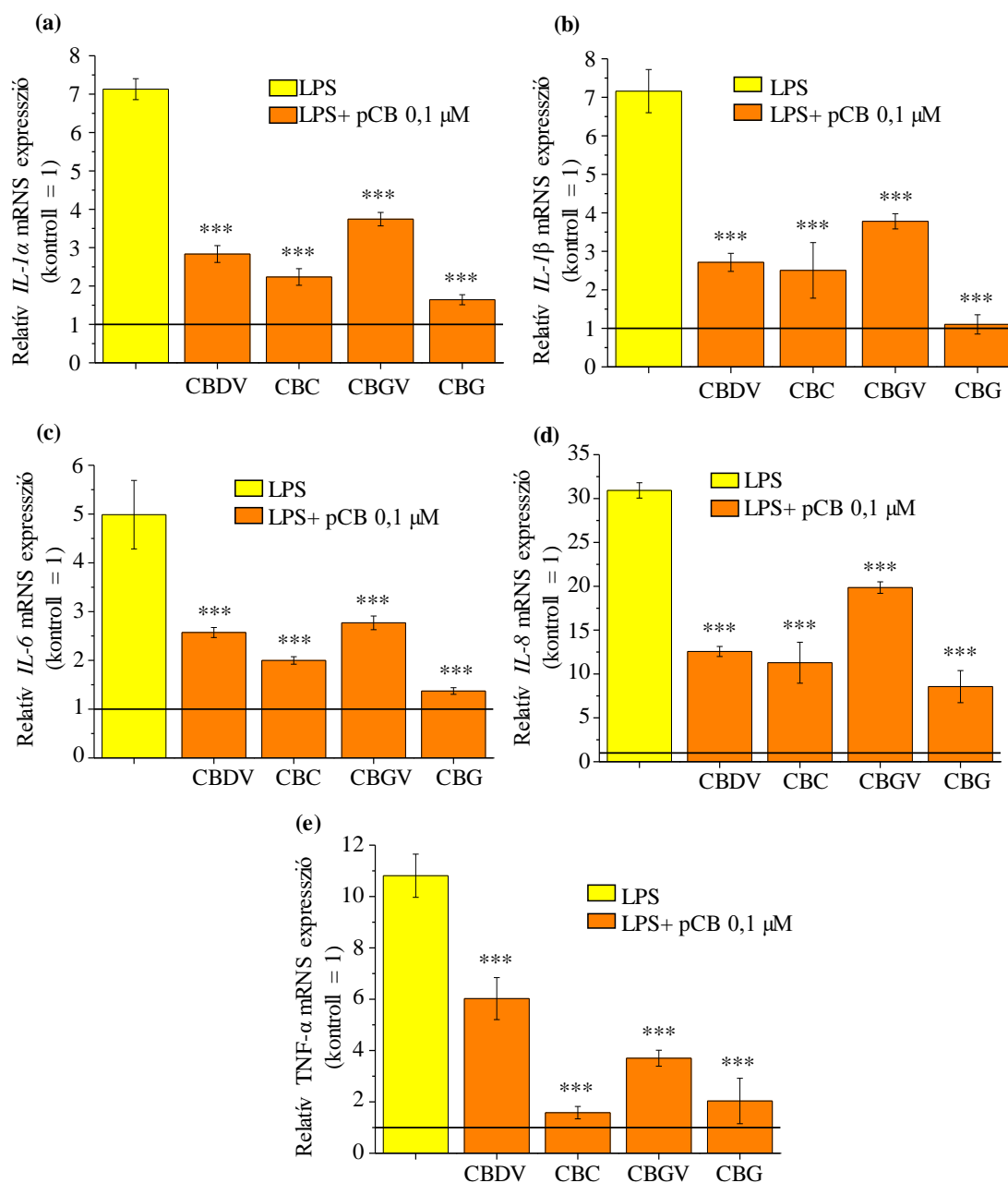
18. ábra A THCV gyulladásgátló hatást mutat humán szebocitákon

3 órás kezelést követően a Q-PCR vizsgálat során belső kontrollként a *18S RNS*-t alkalmaztuk. A relatív génexpressziók megállapításához az eredményeket a $\Delta\Delta$ CT módszert alkalmazva előbb a *18S RNS*, majd pedig az ábrán folytonos vonallal jelzett kontroll expressziós szintjére normalizáltuk, és átlag \pm SD alakban ábrázoltuk (N=2-3). ***p<0,001 a kizárólag LPS-sel kezelt csoporthoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. **IL**: interleukin; **TNF- α** : tumornekrózis faktor- α .

Azt tapasztaltuk, hogy a THCV képes volt visszaszorítani a vizsgált „akne-releváns” gyulladáscitokinek LPS indukálta up-regulációját (**18/a ábra**) és felszabadulását (**18/b-c ábra**) is (14,23,27,39). Mindezek alapján tehát elmondható hogy (legalábbis *in vitro*) a THCV kedvezően befolyásolja az akne patogenezisének valamennyi szebocita-specifikus aspektusát.

6.1.8. 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 gyulladásmoddelt alkalmazva megállapítottuk, hogy valamennyi pCB jelentősen csökkentette az LPS hatását a fenti, „akne-releváns” citokinek mRNS szintű kifejeződésére (**19. ábra**).



19. ábra Valamennyi általunk vizsgált pCB gyulladásgátló hatású humán szebocitákon

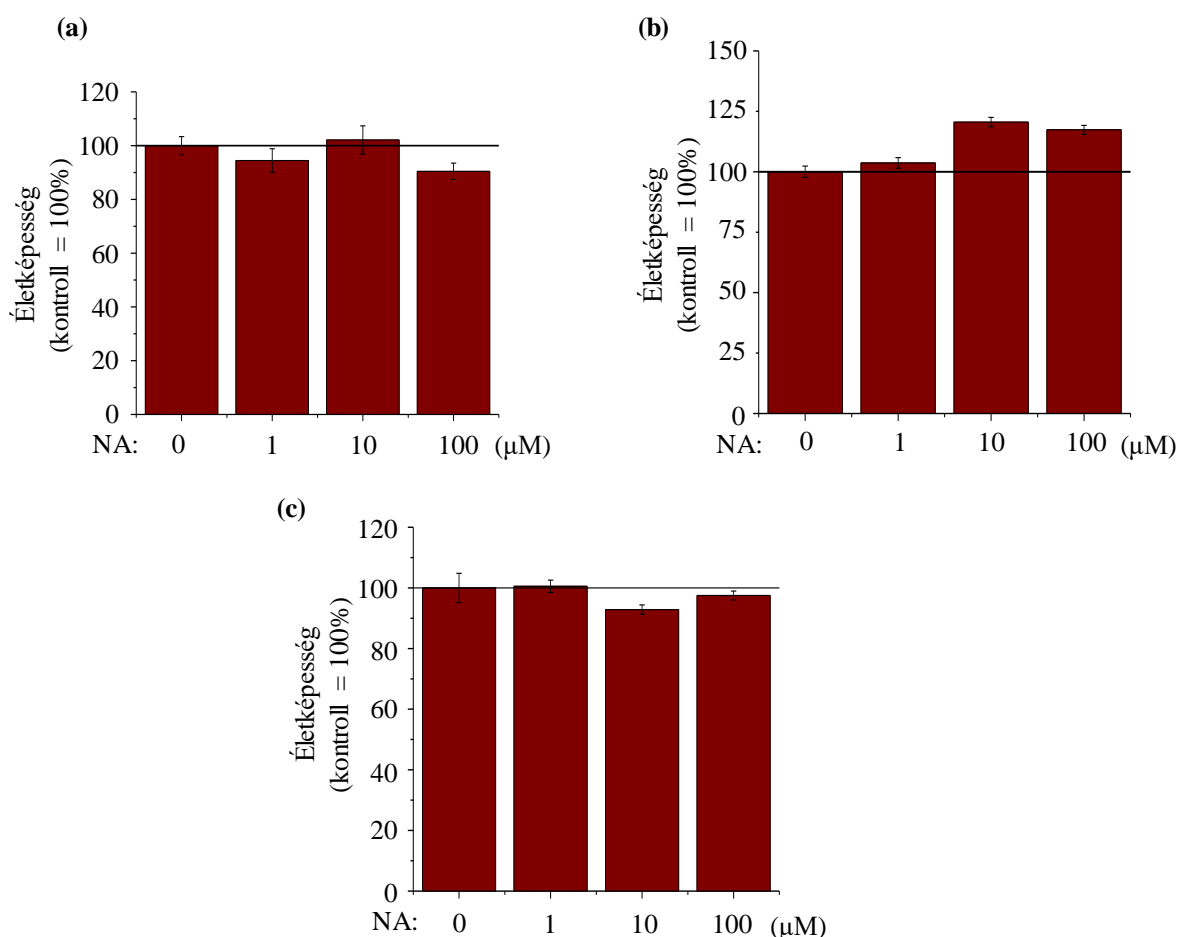
3 órás kezelést követően a Q-PCR vizsgálat során belső kontrollként a 18S RNS-t alkalmaztuk. A relatív génexpressziók megállapításához az eredményeket a $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmazva előbb a 18S RNS, majd pedig az ábrán folytonos vonallal jelzett kontroll expressziós szintjére normalizáltuk, és átlag \pm SD alakban ábráztoltuk (N=2-3). ***p<0,001 a kizárólag LPS-sel kezelt csoporthoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. **IL**: interleukin; **TNF- α** : tumornekrózis faktor- α .

6.2. A NA a HCA₂ receptor aktiválásával csökkenti a faggyúlipid-termelést

Kísérleteink második felében a *Bevezetésben*, az *Irodalmi áttekintésben* és a *Célkitűzésben* részletezetteknek megfelelően a klinikai gyakorlatban lipidcsökkentő szerként már évtizedek óta alkalmazott NA humán szebocitákra gyakorolt biológiai hatásainak vizsgálatát végeztük el.

6.2.1. A NA 100 μM -os koncentrációig nem csökkenti az életképességet

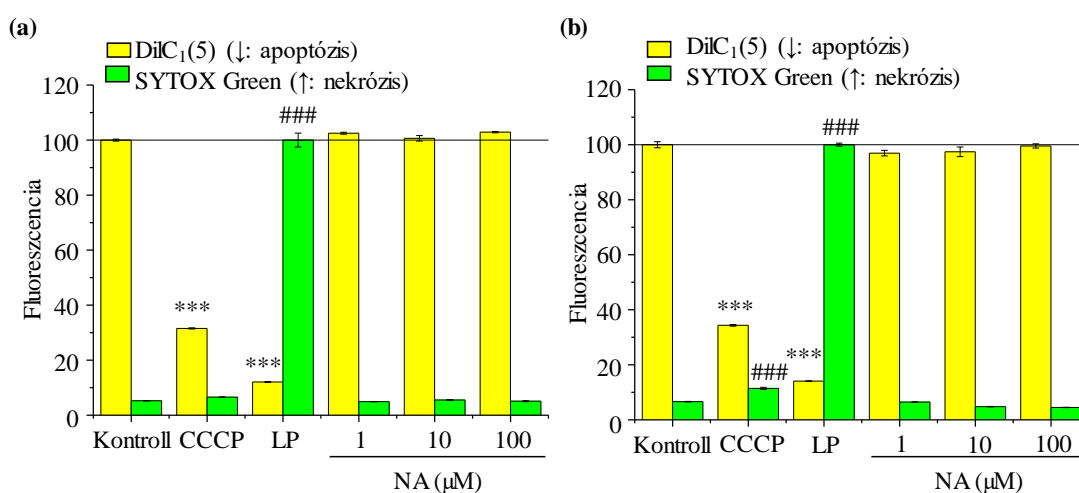
Kísérleteink kezdetén MTT-assay segítségével megállapítottuk, hogy a NA 100 μM -os koncentrációig nem csökkentette a szebociták életképességét 24, 48 és 72 órás kezelést követően sem (**20. ábra**).



20. ábra 100 μM -os koncentrációig a NA nem befolyásolja a humán szebociták életképességét

Tenyészeteinket 24 (a), 48 (b), illetve 72 (c) órán keresztül kezeltük az ábrán látható módon, majd MTT-assayt végeztünk. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábráztuk. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Annak érdekében, hogy kizárjuk olyan korai sejthalál-folyamatok kialakulásának lehetőségét, amelyek az MTT-assay-ben nem eredményeznek nyilvánvaló változásokat, kombinált fluoreszcens DiIC₁(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 ($\leq 100 \mu\text{M}$; 24 és 48 órás kezelése; **21. ábra**), megerősítve, hogy a NA ebben az idő- és koncentrációtartományban valóban a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható.

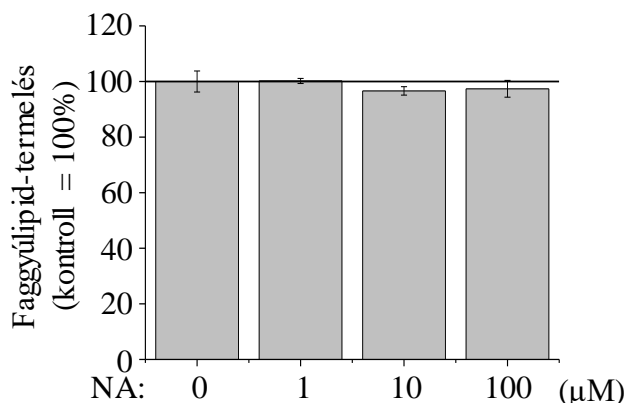


21. ábra 100 μM -os koncentrációig a NA a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható

Tenyészeteinket 24 **(a)** és 48 **(b)** órán keresztül kezeltük a NA különböző koncentrációival, majd kombinált DiIC₁(5)-SYTOX Green jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=4), a DiIC₁(5) esetén a kezeletlen kontroll, SYTOX Green esetén pedig a nekrozis pozitív kontrolljának (lízis puffér) százalékában ábrázoltuk. ***P<0,001 a releváns kezeletlen kontrollhoz képest. Még két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. **CCCP**: karbonil-cianid m-klorofenil-hidrazon (1:200; az apoptózis pozitív kontrollja); **LP**: lízis puffér (1:100; a nekrozis pozitív kontrollja); **NA**: nikotinsav.

6.2.2. A NA nem befolyásolja a homeosztatikus faggyúlipid-termelést, de normalizálja a különféle lipogén ágensekkel indukált, aknét utánzó lipogenezist

Ezt követően fluoreszcens Nile Red jelölés segítségével kívántuk megvizsgálni a NA hatásait a sebociták legjellemzőbb biológiai funkciójára, azaz a bazális, homeosztatikus 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 (**22. ábra**).



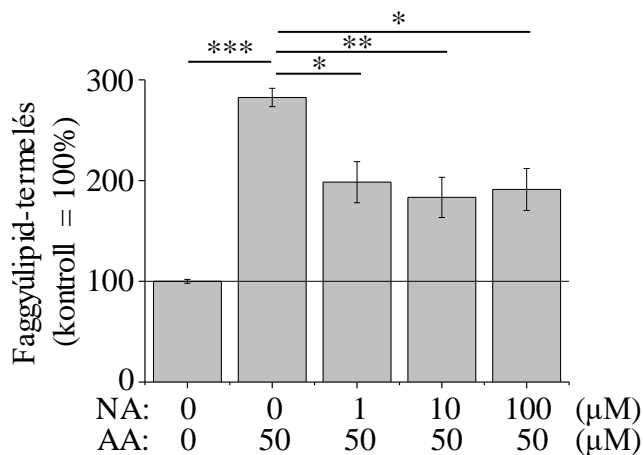
22. ábra A NA nem befolyásolja a bazális faggyúlipid-termelést

Tenyészeteinket 48 órán keresztül kezeltük NA-val, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

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 a AA által indukált, aknét utánzó lipidszintézist (27,59).

23. ábra A NA nem-citotoxikus koncentrációi hatékonyan csökkentik az AA-val indukált faggyúlipid-termelést

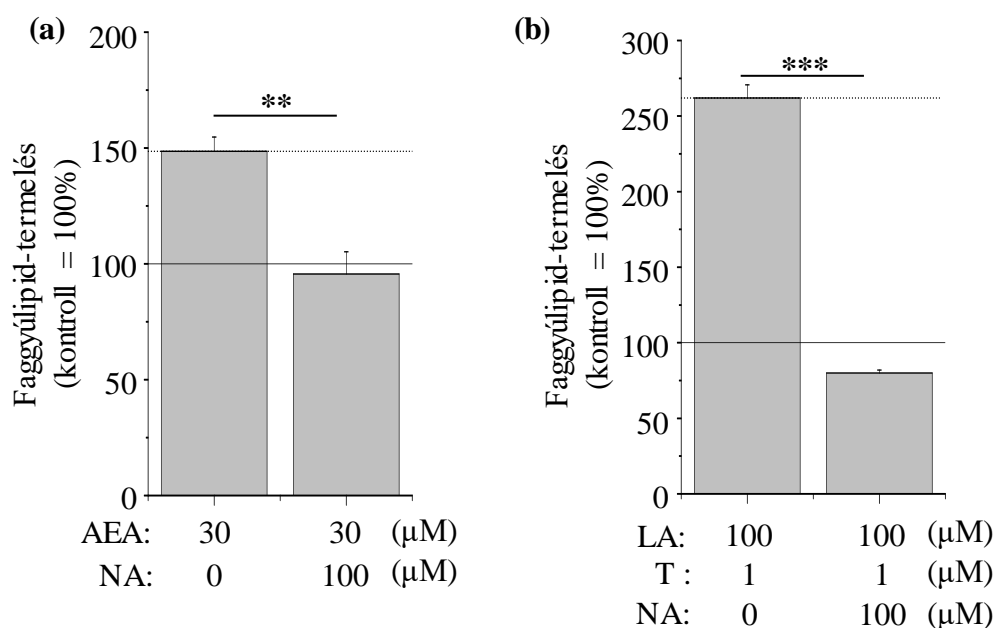
Tenyészeteinket 48 órán keresztül kezeltük az ábrán látható kombinációkban, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. *, **, ***p<0,05, 0,01, illetve 0,001 a jelölések szerint. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.



Megállapítottuk, hogy a NA előzőekben azonosított, nem-citotoxikus koncentrációi jelentősen csökkentették az AA-val indukált, „akne-szerű”, kórosan fokozott lipidszintézist (23. ábra).

6.2.3. A NA univerzális liposztikus hatást fejt ki

Ahogy az előző, pCB-okkal folytatott kísérletsorozatban is tettük, itt is kíváncsiak voltunk arra, hogy a NA ezen figyelemre méltó liposztikus hatása kizárólag az AA-val indukált, döntően a PKC δ által közvetített (36) lipogenezis normalizálására korlátozódik, vagy egy univerzális liposztikus út aktiválása révén alakult ki. A kérdés eldöntésére olyan lipogén ágenseket (a már említett AEA, valamint a linolsav [LA] és a tesztoszteron [T] kombinációja) alkalmaztunk, amelyek irodalmi adatok alapján más (AEA: CB₂; LA+T: PPAR-ok) jelátviteli útvonalakat aktiválva fokozzák a faggyúlipid-termelést (35,60). 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 (**24. ábra**). Mindezek fényében elmondható, hogy a NA minden valószínűség szerint univerzális liposztikus hatást fejt ki.

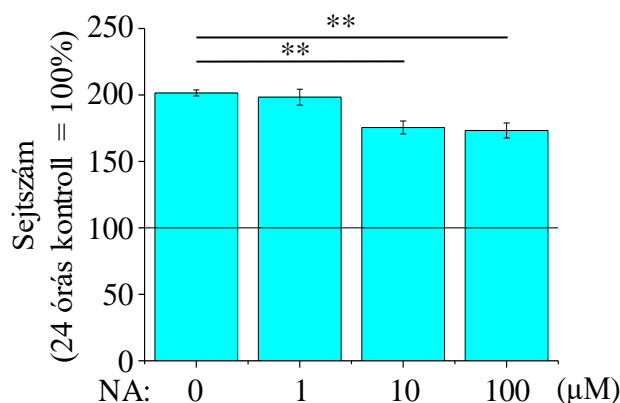


24. ábra A NA univerzális liposztikus hatást vált ki humán szebocitákon

Tenyészeteinket 48 órán keresztül kezeltük az ábrán látható kombinációkban, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábráztuk. * $p < 0,05$ a kizárólag lipogénnel (**a**: AEA; **b**: LA+T) kezelt csoporthoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. **AEA**: anandamid; **LA**: linolsav; **NA**: nikotinsav; **T**: tesztoszteron.

6.2.4. 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. szeborrea vagy akne) kezelésében.



25. ábra A NA nem-citotoxikus koncentrációi anti-proliferatív hatásúak humán szebocitákon

Tenyészeteinket 72 órán keresztül kezeltük, majd CyQUANT proliferációs assay-t végeztünk. Az eredményeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt 24 órás kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. **p<0,01 a jelzettek szerint a 72 órás kontrollhoz képest. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

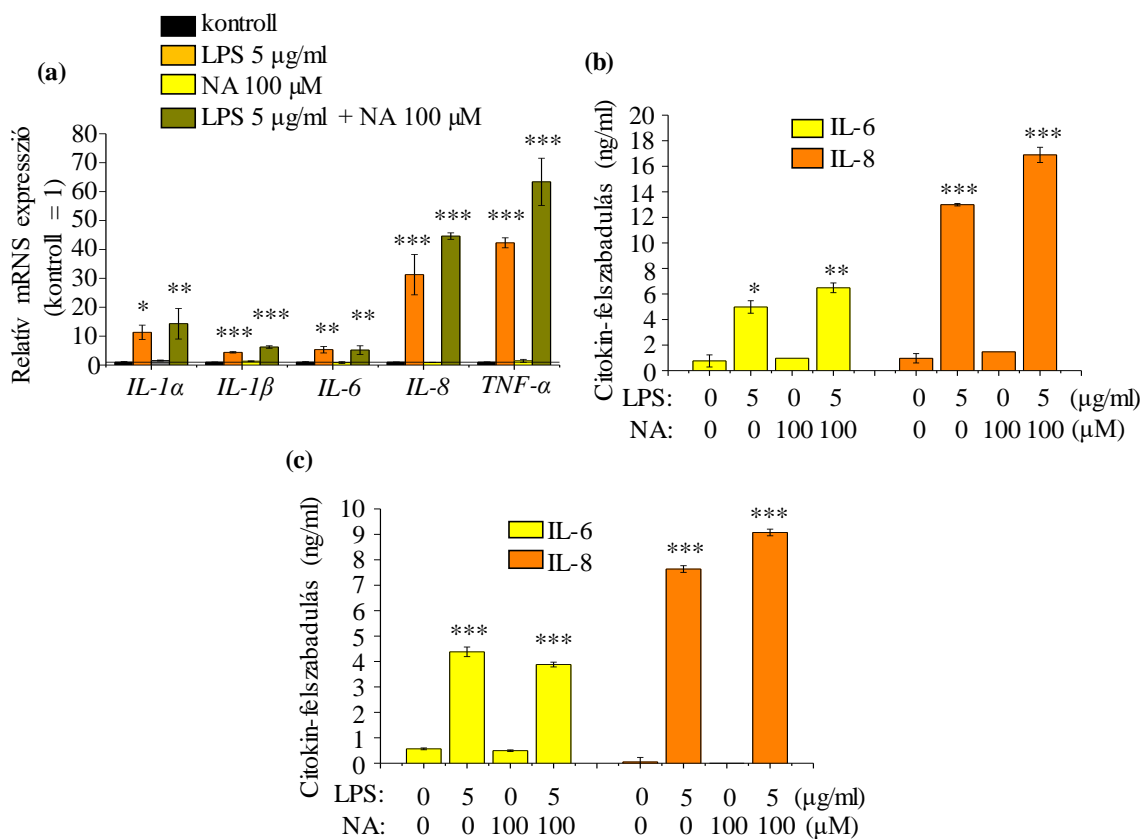
Tekintettel arra, hogy a faggyútermelés holokrin mechanizmusa miatt a faggyú tényleges mennyisége nemcsak az egyedi sejtek lipidtermelésétől, hanem azok számától is alapvetően függ, így egy szeborrea ellenes szer hatékonyságát nagyban növeli, ha nemcsak liposztatikus, hanem anti-proliferatív hatású is (4,27,32,98,99). Ezen logikát követve a NA sejtszámra gyakorolt hatásait CyQUANT proliferációs assay alkalmazásával vizsgáltuk, és kimutattuk, hogy kis de szignifikáns mértékben csökkentette a szebociták proliferációját az 10-100 µM-os koncentrációtartományban (72 órás kezelések; **25. ábra**). Figyelemre méltó továbbá, hogy az életképesség adatokkal (**20. ábra** és **21. ábra**) összhangban a sejtszám nem csökkent a 24 órás kontroll szintje alá, megerősítve ezzel, hogy valóban nem citotoxikus, hanem „tisztán” anti-proliferatív hatással állunk szemben.

6.2.5. 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 (27). Ezt szem előtt tartva

fenomenológiai kísérleteink zárásaként megvizsgáltuk, hogy a NA miként befolyásolja a szebociták immunprofilját.

A gyulladásos válaszreakciót a korábban ismertetett protokollunkat követve jelen esetben is 5 µg/ml LPS-sel váltottuk ki, majd expressziós (*IL-1α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-8* és *TNF-α*; 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.



26. ábra A NA nem csökkenti a gyulladásos citokinek kifejeződését és felszabadulását humán szebocitákon

(a) 3 órás kezeléseket követően a Q-PCR vizsgálat során belső kontrollként a *18S RNS*-t alkalmaztuk. A relatív génextpressziók megállapításához az eredményeket a $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmazva előbb a *18S RNS*, majd pedig az ábrán folytonos vonallal jelzett kontroll expressziós szintjére normalizáltuk, és $\text{átlag} \pm \text{SD}$ alakban ábrázoltuk ($N=2-3$). Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. (b-c) A szekretált citokinek mennyiségének meghatározására 3 (b), illetve 24 (c) órás kezeléseket követően a sejtek felülcszójából került sor ELISA módszerrel. Az adatokat standard görbe segítségével kvantifikálva $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ alakban ($N=3$) ábrázoltuk. *, **, *** $p < 0,05$, $0,01$, illetve $0,001$ a kontrollhoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. IL: interleukin; TNF- α : tumornekrózis faktor- α .

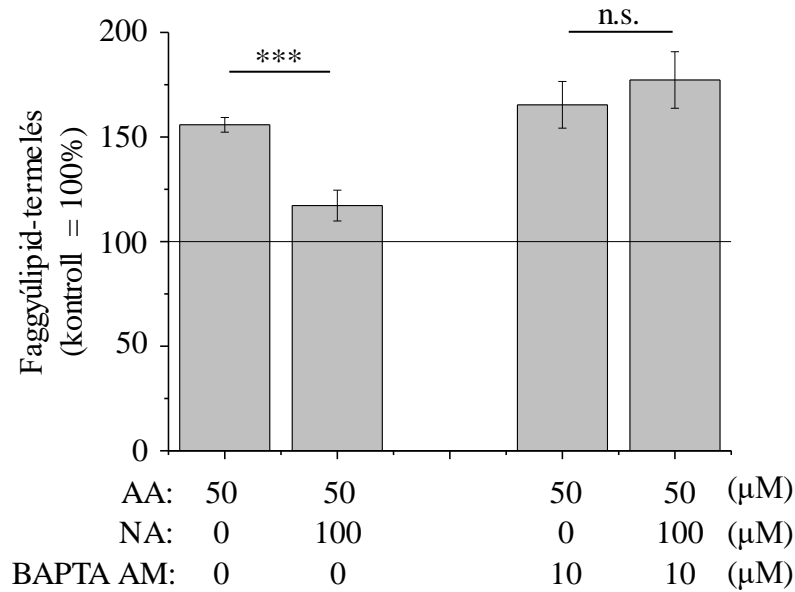
Megállapítottuk, hogy a 100 μM -ban alkalmazott NA nem csökkentette a fenti citokinek LPS-indukálta fokozott termelődését, és önmagában történő alkalmazás esetén sem fejtett ki érdemi hatást a génexpresszióra (**26/a ábra**). Megvizsgáltuk azt is, hogy a NA miként befolyásolja két kulcsfontosságú citokin, az IL-6 és IL-8 felszabadulását^{†††}, amelyek révén újabb adatok alapján a szebociták részt vesznek a Th₁₇ sejtek aktivitásának szabályozásában (100). 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 (**26/b-c ábra**). Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a NA nem befolyásolja közvetlenül a humán szebociták gyulladásos és immunológiai folyamatait.

6.2.6. *A NA liposztatikus hatása Ca²⁺-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 (37,38,59), a NA pedig bizonyos sejttípusokban bizonyítottan képes megemelni a intracelluláris kalcium szintet (85,86), 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 Ca²⁺-kelátor, a BAPTA AM jelenlétében. Megállapítottuk, hogy a NA liposztatikus hatása 10 μM BAPTA AM jelenlétében nem alakult ki (**27. ábra**), így feltételezhető, hogy a hatás kialakításában Ca²⁺-kapcsolt jelpályák (is) szerepet játszhatnak.

^{†††} Fontos kiemelni, hogy korábbi kísérleteink során megvizsgáltuk az IL-1 α , az IL-1 β és a TNF- α szekréciót is, és azt találtuk, hogy a mi kísérleti elrendezésünkben az LPS-indukálta gyulladásmodellben ezek koncentrációja a felülúszóban a detekciós küszöb környéki (IL-1 α és IL-1 β) vagy az alatti (TNF- α) volt (39), ezért jelen kísérleteink során ezeket már nem vizsgáltuk.



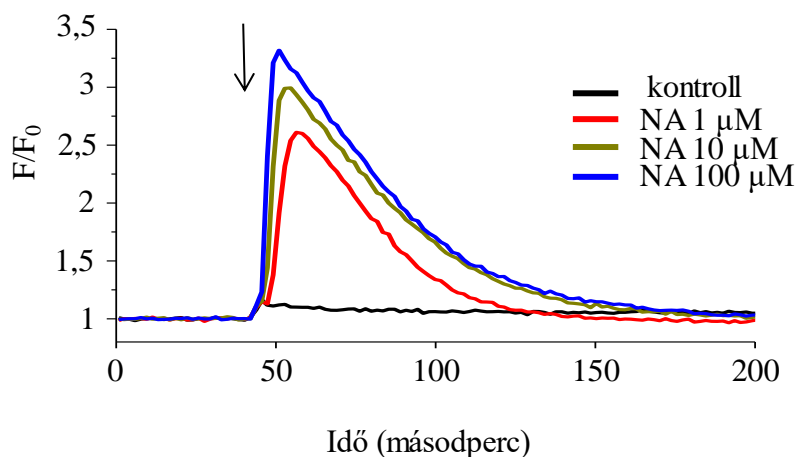
27. ábra A NA liposztatikus hatása valószínűleg Ca^{2+} -függő módon alakul ki

Tenyészeteinket 48 órán keresztül kezeltük az ábrán látható kombinációkban, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. ***p<0,001 a jelölés szerint; n.s.: nem szignifikáns különbség. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. **AA:** arachidonsav; **NA:** nikotinsav.

6.2.7. A NA 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 Ca^{2+} -jelet válthat ki a szebocitákon, következő lépésként Fluo-4 AM jelölést alkalmaztunk. Ahogy az a reprezentatív görbéken is látható (**28. ábra**), a NA hatékony liposztatikus koncentrációi dóziszfüggő módon fokozták az $[Ca^{2+}]_{IC}$ -t.

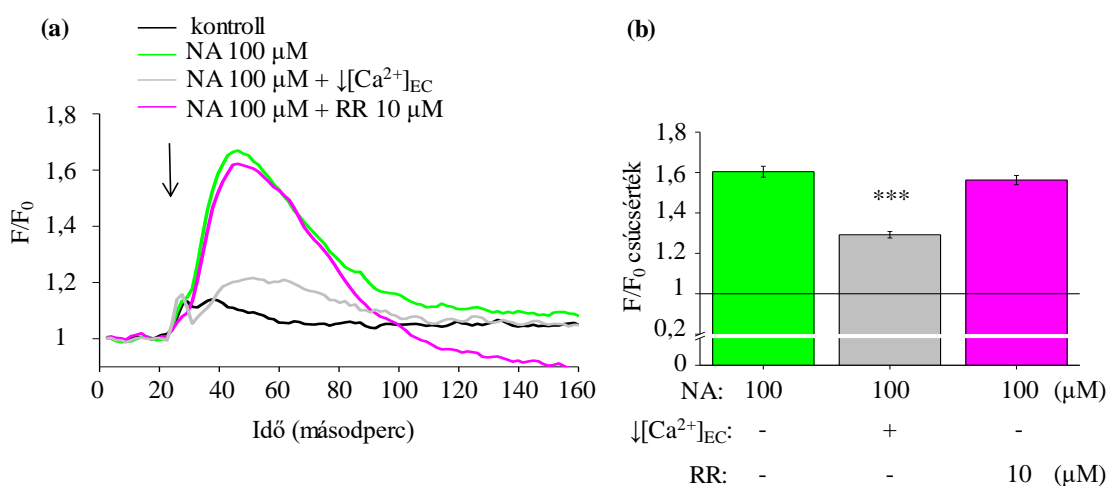
Következő kérdésünk az előző kísérletben tapasztalt (**28. ábra**) Ca^{2+} jel eredetének azonosítására irányult. A kísérletet névlegesen Ca^{2+} -mentes közegben elvégezve azt tapasztaltuk, hogy az $[Ca^{2+}]_{EC}$ csökkentése szinte teljes mértékben kivédte a Ca^{2+} jelet, ami arra utalt, hogy a NA közvetve vagy közvetlenül sejt felszíni Ca^{2+} csatornákat aktivál humán szebocitákon.



28. ábra A NA hatékony liposztatikus koncentrációi Ca^{2+} -jelet váltanak ki humán szebocitákon

Fluoreszcens Ca^{2+} -mérések reprezentatív analóg görbéi. A NA megfelelő koncentrációinak bemérésére a kísérlet 45. másodpercében (nyíllal jelölve) került sor; a görbéket a kezelést megelőző alapjellel korrigáltan, F/F_0 alakban ábrázoltuk. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

A NA-ról ismert, hogy közvetlenül képes aktiválni bizonyos, a vanilloid alcsaládba tartozó, főként Ca^{2+} -ra permeábilis TRP csatornákat (89,91), és hogy ezen csatornák közül több (TRPV1, TRPV3 és TRPV4) is hatékonyan csökkenti a faggyúlipid-termelést (37,38,59).



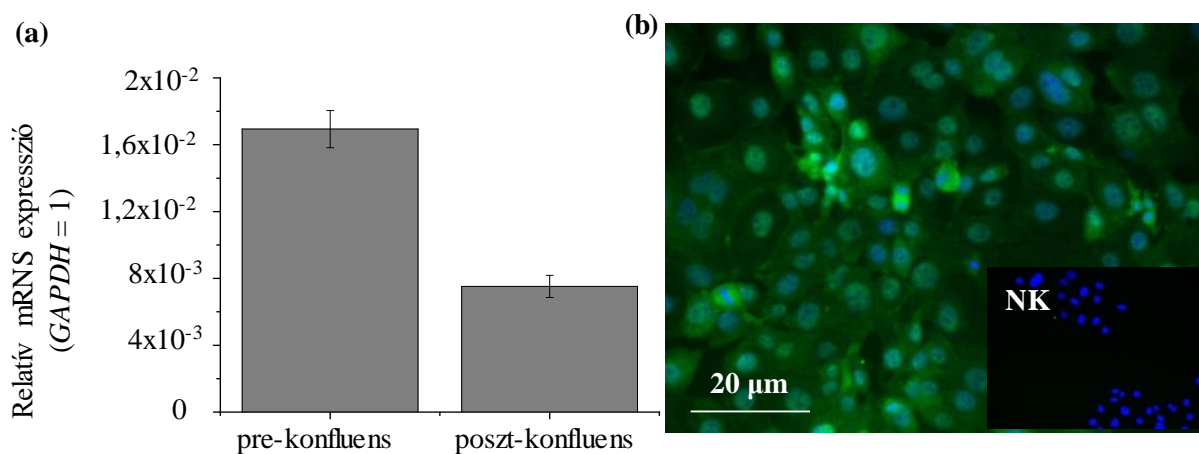
29. ábra A NA által kiváltott Ca^{2+} -jel forrása döntően az extracelluláris tér, de a Ca^{2+} nem TRPV csatornákon keresztül lép be a sejtekbe

Fluo-4 AM-alapú fluoreszcens Ca^{2+} -mérések reprezentatív analóg görbéi (a), illetve a mérések statisztikai analízise (b). A kezelőanyagok megfelelő kombinációinak bemérésére a kísérlet 35. másodpercében (nyíllal jelölve) került sor; a görbéket a kezelést megelőző alapjellel korrigáltan ábrázoltuk (a). Az egyes görbék normalizált fluoreszcencia csúcsértékeit átlag \pm SEM (N=12) alakban ábrázoltuk (b). *** $p < 0,001$ a normál $[Ca^{2+}]_{EC}$ jelenlétében végzett NA kezeléshez képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. $\downarrow[Ca^{2+}]_{EC}$: névlegesen Ca^{2+} -mentes médium; **NA**: nikotinsav; **RR**: ruténium vörös (általános TRPV gátlószer).

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk ezen csatornák esetleges részvételét a folyamatban, kísérleteinket az általános TRP csatorna gátlószer ruténium vörös (RR) jelenlétében is elvégeztük (101). Megállapítottuk, hogy a RR nem befolyásolta a NA által indukált kalciumjeleket (**29. ábra**), ami arra utal, hogy azokért valószínűleg eddig nem azonosított, nem-TRPV sejtfelszíni Ca^{2+} csatornák lehetnek felelősek.

6.2.8. A szebociták kifejezik a NA elsődleges receptorát, a HCA_2 -t

Mivel a fentiekben bemutatott adataink fényében valószínűtlennek tűnt a TRPV-csatornák részvétele az NA liposztikus hatásainak közvetítésében, így a következőkben a NA elsődleges receptoraként számoltartott HCA_2 lehetséges szerepét vizsgáltuk meg (102). Elsőként Q-PCR és immunfluoreszcens jelölés segítségével azt vizsgáltuk meg, hogy a receptor kifejeződik-e a humán szebocitákon. Megállapítottuk, hogy a HCA_2 mind mRNS (Q-PCR; **30/a ábra**), mind fehérje szinten (immunfluoreszcencia; **30/b ábra**) jelen van a sejteken.



30. ábra A HCA_2 receptor kifejeződik humán szebocitákon

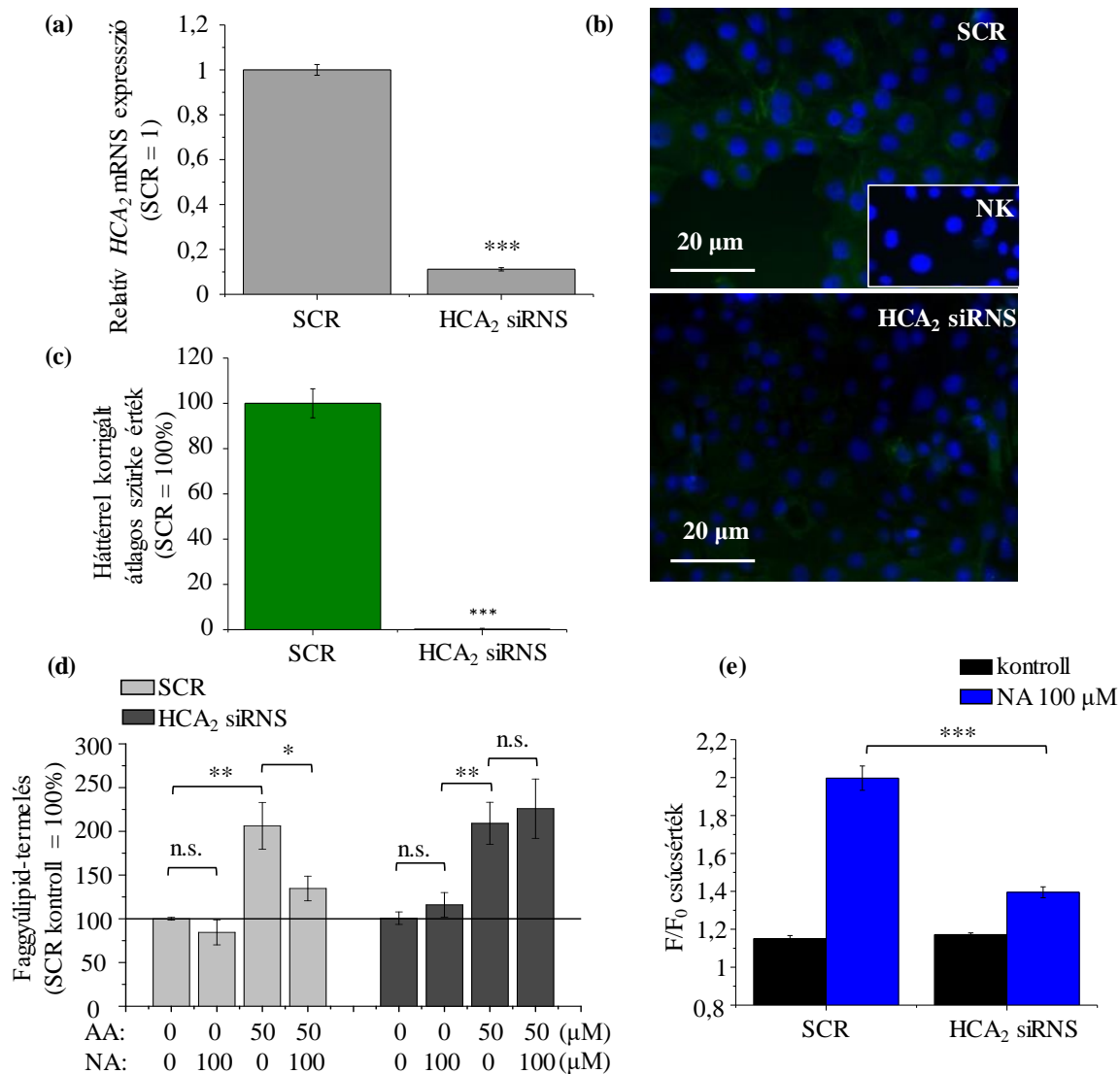
(a) A Q-PCR vizsgálatot pre-, valamint posztkonfluens kultúrákból kiindulva végeztük. Belső kontrollként a GAPDH expresszióját határoztuk meg, majd a relatív génexpressziók megállapításához az eredményeket a ΔCT módszert alkalmazva a GAPDH expressziós szintjére normalizáltuk, és $\text{átlag} \pm \text{SD}$ alakban ($N=3$) ábrázoltuk. (b) Immunfluoreszcens jelölés. Zöld: HCA_2 -specifikus immunjelölés; kék: DAPI magfestés. Negatív kontrollként (NK) az elsődleges antitest elhagyásával készült jelölést használtunk. Méretvonal: 20 μm .

6.2.9. *A HCA₂ szelektív géncsendesítése kivédi a NA liposztatikus és [Ca²⁺]_{1C}-t növelő hatását*

Tekintettel arra, hogy a HCA₂ receptor ellen nem állnak rendelkezésre hatékony és szelektív antagonisták (103), siRNS transzfekció-mediált szelektív „géncsendesítés”-t alkalmaztunk, ami szignifikáns csökkenést eredményezett a HCA₂ kifejeződésében mRNS **(31/a ábra)** és fehérje szinten is **(31/b-c ábra)**. A géncsendesítés sikerességének ellenőrzése után **(31/a-c ábra)** SCR-transzfektált, valamint HCA₂ géncsendesített szebocitákat vizsgálva megállapítottuk, hogy a NA celluláris hatásai valóban HCA₂-mediáltak volt, hiszen a receptor kifejeződésének csökkentésekor a NA liposztatikus hatása, valamint az általa kiváltott Ca²⁺-jel is szignifikánsan csökkent **(31/d-e ábra)**.

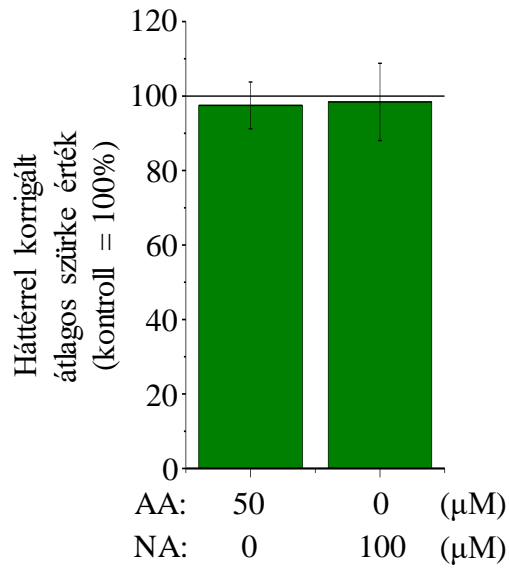
6.2.10. *Sem a NA, sem az AA nem befolyásolja a HCA₂ receptor expresszióját*

Ezen eredményeink alapján a HCA₂ 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 meg, hogy az AA-val, illetve a NA-val történő kezelések miként befolyásolják a HCA₂ expressziót humán szebocitákon. Megállapítottuk, hogy egyik kezelés sem gyakorolt érdemi hatást a receptor fehérje szintű kifejeződésére (immunfluoreszcens jelölés; **32. ábra**).



31. ábra A *HCA2* szelektív géncsendesítése kivédi a NA liposztatikus és $[Ca^{2+}]_{IC}$ -t fokozó hatását

(a) A szebocitákat a transzfekciót követő 2. napon arattuk, majd Q-PCR vizsgálatot végeztünk. Belső kontrollként a *18S RNS* expresszióját határoztuk meg, majd a relatív génexpressziók megállapításához az eredményeket a ΔCT módszert alkalmazva a *18S RNS* expressziós szintjére, majd a non-sense RNS-sel transzfektált „scrambled” (SCR) kontroll esetén mért értékre normalizáltuk, és átlag \pm SD alakban (N=3) ábrázoltuk. *** p <0,001. (b) Reprezentatív immunfluoreszcens képek. A jelölésre a transzfekciót követő 3. napon került sor. Zöld: *HCA2*-specifikus immunjelölés; kék: DAPI magfestés. Negatív kontrollként (NK) az elsődleges antitest elhagyásával készült jelölést használtunk. Méretvonalak: 20 μm. (c) Az immunfluoreszcens jelölés szemikvantitatív értékelése. A háttérre történő normalizálást követően a zöld csatorna intenzitásértékeit határoztuk meg, majd az adatokat a SCR kontrollra normáltuk, és átlag \pm SEM alakban (N=93 sejt/csoport) ábrázoltuk. *** p <0,001. (d) A *HCA2* géncsendesített, illetve SCR-transzfektált szebociták faggyúlipid-termelését Nile Red jelöléssel követtük nyomon. Tenyészetünket a transzfekciót követő második naptól kezdve 48 órán keresztül kezeltük az ábrán látható kombinációkban. A kapott értékeket átlag \pm SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt SCR kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. *, ** p <0,05, illetve 0,01 a jelölés szerint. n.s.: nem szignifikáns különbség. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. (e) A transzfekciót követő 2. napon elvégzett Fluo-4 AM-alapú fluoreszcens Ca^{2+} -mérések statisztikai analízise. Az egyes görbék normalizált fluoreszcencia csúcsértékeit átlag \pm SEM (N=7) alakban ábrázoltuk. *** p <0,001 a jelölés szerint. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. **AA:** arachidonsav; ***HCA2* siRNS:** *HCA2* géncsendesített csoport; **NA:** nikotinsav; **SCR:** non-sense RNS-sel transzfektált csoport.



32. ábra Sem az AA, sem a NA nem befolyásolja a HCA₂ kifejeződését humán sebocitákon

Az immunfluoreszcens jelölés szemikvantitatív értékelése. A háttérre történő normálást követően a zöld csatorna intenzitásértékeit határoztuk meg, majd az adatokat a kontrollra normáltuk, és átlag±SEM alakban (N=15-16 sejt/csoport) ábráztuk.

7. Diszkusszió

Az akne az egyik leggyakoribb emberi bőrbetegség, amely, bár az életet közvetlenül nem veszélyeztető kórállapot, mégis jelentős mértékben képes rontani a betegek életminőségét (12–14,32). Tekintettel arra, hogy a jelenleg rendelkezésre álló leghatékonyabb kezelési módok (pl. az orális izotretinoin) alkalmazása adott esetben súlyos mellékhatások kialakulásához vezethet (14) érthető, hogy világszerte jelentős erőfeszítések történnek biztonságos, de mégis hatékony, az eddigiektől eltérő hatásmechanizmussal működő, új anti-akne szerek kifejlesztésére.

7.1. A kiválasztott nem-pszichotróp pCB-ok hatásainak áttekintése

Amint arról az *Irodalmi áttekintés*ben már részletesen szó esett, az ECS összetett módon befolyásolja a humán szebociták 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 (35,37–39,59). Kimutattuk azt is, hogy a leginkább tanulmányozott és a klinikai gyakorlatban már évek óta biztonságosan alkalmazott nem-pszichotróp pCB, a CBD alkalmazása komplex celluláris anti-akne hatások kialakulásához vezet (59), amelyek az eddig elérhető klinikai vizsgálati adatok fényében *in vivo* is nagy valószínűséggel kialakulnak (<https://www.botanixpharma.com/>; clinicaltrials.gov ID: NCT03573518) (54,62). Mindezek figyelembevételével a jelen dolgozat alapjául szolgáló kísérletek első felében azt vizsgáltuk meg, hogy a CBD-n kívül más növényi eredetű, nem-pszichotróp pCB-oknak is lehetnek-e anti-akne hatásai.

Elsőként megállapítottuk, hogy ≤ 10 μM -os koncentrációban mind az öt vizsgált pCB a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható 24-48 órás kezelésekkorán (**8. ábra.** és **10. ábra**), magasabb koncentrációban azonban apoptózis-domináns sejthalált okoznak (24 órás kezelésekkorán **9.** és **11. ábra**). Ezt követően a szebociták talán legjellemzőbb biológiai funkcióját, a faggyúlipidek szintézisét Nile Red jelöléssel vizsgálva meglepő eredményre jutottunk. Egyrészt – természetesen – az előzőekben citotoxikusnak talált koncentrációkban valamennyi pCB

jelentősen csökkentette a faggyúlipidek termelését (24 órás kezelések; **12. ábra**), másrészt viszont az anyagok nem-citotoxikus koncentrációi eltérően befolyásolták a lipidszintézist, ami alapján három „hatástani csoportba” soroltuk a vegyületeket. A CBG és a CBGV „eCB-szerű” módon viselkedve kis, de szignifikáns mértékben növelte a lipogenezist, míg a „CBD-szerű”-nek mutató CBDV-nek nem volt szignifikáns hatása, a liposztatikus CBC és a THCV viszont csökkentette a bazális faggyúlipid-szintézist (48 órás kezelések; **13. ábra**). 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.

Ezen eredményekből kiindulva megvizsgáltuk a CBC, a CBDV és a THCV hatásait az aknéra jellemző szeborreát modellező AA kezelést követően. Megállapítottuk, hogy a nem-citotoxikus koncentrációban alkalmazott CBC, CBDV és THCV egyaránt képes volt szignifikánsan csökkenteni a lipogén hatást (48 órás kezelések; **15. ábra**). Tekintettel arra, hogy a három pCB közül a THCV bizonyult a leghatékonyabbnak, a következőkben ennek az anyagnak a lehetséges anti-akne hatásait jártuk alaposabban körül. Elsőként azt vizsgáltuk meg, hogy a fokozott lipidszintézis normalizálása csak a döntően a PKC δ aktiválásán keresztül ható (36) AA kezelést követően, vagy ettől részben független jelátviteli útvonalak (pl. CB₂ → ERK1/2 MAPK → PPAR) (35) aktiválásakor is megvalósul-e. A kérdés megválaszolására két ismert lipogén eCB-ot (AEA és 2-AG) alkalmaztunk, és megállapítottuk, hogy a THCV mindkét esetben normalizálta a faggyúlipid-termelést (48 órás kezelések; **16. ábra**). Ennek megfelelően eredményeink azt mutatták, hogy a THCV (a CBD-hez hasonlóan) (59), univerzális liposztatikus hatást fejtett ki.

Tekintettel arra, hogy a faggyútermelés mértéke (a holokrin szekréción mechanizmus miatt) *in vivo* nemcsak az egyes sejtek lipidtermelésétől, hanem a sejtek számától is nagymértékben függ (12), a következőkben megvizsgáltuk, hogy a THCV miként befolyásolja a sebociták proliferációját. Kimutattuk, hogy a THCV nem-citotoxikus, hatékony liposztatikus

koncentrációi dózisfüggő módon anti-proliferatív hatást váltottak ki (48-72 órás kezelések; **17. ábra**).

Mivel az eddigi adatok arra utaltak, hogy a THCV hatékonyan csökkentheti a faggyútermelést, kísérleteink következő szakaszában a gyulladási válaszra gyakorolt hatásait vettük górcső alá. Kimutattuk, hogy a THCV nagy hatékonysággal csökkenti a sebociták LPS-sel indukált gyulladási válaszát nemcsak mRNS, de fehérje szinten is (3 órás kezelések; **18. ábra**)^{†††}. Összességében tehát eredményeink azt mutatták, hogy a THCV a CBD-vel összemérhető hatékonysággal az akne összes sebocita-specifikus aspektusát kedvezően befolyásolta.

Jelen fenomenológiai kísérleteinknek nem volt célja a hatásmechanizmus vizsgálata, azonban a CBD-vel nyert ismeretek, illetve a rendelkezésre álló irodalmi adatok fényében élhetünk bizonyos feltételezésekkel. Abból kiindulva, hogy a THCV hatásai nagyon hasonlítanak a CBD esetén tapasztaltakra, valószínűnek látszik, hogy a liposztikus és anti-proliferatív hatások közvetítésében ebben az esetben is TRPV csatornák játszanak szerepet. Fontos kiemelni, hogy ezt az elméleti következtetést irodalmi adatok is megerősíteni látszanak, hiszen TRPV3-at és TRPV4-et overexpresszáló HEK-293 sejtek vizsgálata során De Petrocellis és munkatársai azt találták, hogy a THCV az alacsony mikromoláris tartományban (azaz abban a koncentrációtartományban, amelyben a liposztikus és anti-proliferatív hatásokat is kifejtette; **15. ábra** és **17. ábra**) képes aktiválni a fenti két csatornát. Ráadásul az is bebizonyosodott, hogy a THCV a fenti kísérletes rendszerben nagyobb hatékonysággal működött, mint a CBC vagy a CBDV (104), ami tökéletes összhangban áll a mi megfigyeléseinkkel, azaz, hogy a vizsgált PCB-ok között a THCV mutatkozott a legpotensebb

^{†††} Ezen a ponton fontos kiemelni, hogy az mRNS szintű expresszió és a felszabadult citokinek mennyiségének egyidejű mérésével a sebociták immunválaszának korai (kvázi azonnali citokinfelszabadulás) és késői (*de novo* citokinszintézis) fázisáról is információt szereztünk, és a THCV a gyulladási válasz mindkét fázisát hatékonyan gátolta.

liposztatikumnak, hiszen a CBC és a CBDV részleges hatékonyságával szemben teljes mértékben normalizálta az AA lipogén hatását (**15. ábra**).

Egy korábbi tanulmányában ugyanez a csoport azt is leírta, hogy a THCV hatékony aktivátora a humán TRPV1 és a patkány TRPV2 ioncsatornáknak (105), ami azt jelenti, hogy képes aktiválni mind a három TRPV csatornát (nevezetesen a TRPV1-et, TRPV3-at és TRPV4-et), amelyekről ismert, hogy negatívan szabályozzák a sebociták faggyúlipid-termelését (37,38,59). Ezek az adatok azt sugallják, hogy a THCV sebosztatikus (liposztatikus + anti-proliferatív) hatását nagy valószínűséggel a fenti TRPV csatornák közvetíthetik.

Amint arról fentebb már szó esett, kutatásaink nagyon 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 sebociták faggyúlipid-szintézisét (**13/a-b ábra**). Tekintettel arra, hogy mRNS-szinten nyert adataink szerint a CBG és a CBGV (valamint a CBC és a CBDV is) hatékonyan csökkent a sebociták LPS-sel kiváltott gyulladáshoz való válaszát (**19. ábra**), eredményeink alapján felmerül, hogy ezek a vegyületek alkalmasak lehetnek egyes bőrszárazsággal és gyulladással kísért kórképek (pl. AD) kezelésére^{§§§}. Így, bár nem ez volt az elsődleges célunk, adataink rávilágítottak a különböző pCB-ok által aktivált jelátviteli útvonalak összetettségére.

Sajnálatos módon a THC-n, a CBD-n és a CBG-n kívül viszonylag keveset tudunk a többi pCB celluláris célpontjairól. A CBG-ről ismert, hogy antagonizálja a CB₁ receptort, míg a CB₂ esetében parciális agonistaként viselkedik; emellett aktiválja α₂ adrenoceptort, aktiválja, majd gyorsan deszenzitizálja a TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV3 és TRPV4 ioncsatornákat, gátolja az EMT-t, a TRPM8 csatornát és az 5-HT_{1A} szerotonin receptort (104,106–109), valamint anti-

^{§§§} Bár ez megfelelően kontrollált klinikai vizsgálatok hiányában természetesen merő spekuláció, érdemes megemlíteni, hogy elméleti megfontolások alapján a CBGV kiemelkedően ígéretes szernek tűnik az AD kezelésében, hiszen négy független ponton (gyulladásgátló hatás, a faggyúlipid-termelés mérsékelt fokozása, az AD patogenezisében fontos, gyulladáshoz kiváltó TRPV3 ioncsatorna deszenzitizálása, valamint antibakteriális hatás) hatva komplex módon interferálhat az AD patogenezisével (54).

bakteriális és gyulladáscsökkentő hatása is ismert (110,111). Tekintve, hogy a CBG és a hozzá szerkezetileg nagyon hasonló CBGV az eCB-okhoz hasonlóan fokozta a faggyúlipid-termelést (**13/a-b ábra**), valamint (érdekes módon) csökkentette az AEA-dal kiváltott lipogén választ (**14. ábra**), feltételezhető, hogy az általunk vizsgált szebocita modellrendszerben parciális CB₂ agonistaként (35) vagy esetleg EMT-inhibitoroként (39) viselkedhettek.

Eredményeink klinikai transzlálhatóságával kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy irodalmi adatok alapján a pCB-ok még orális alkalmazás esetén is jól tolerálhatók (46,112,113), a klinikai vizsgálatokban topikálisan alkalmazott CBD pedig szintén kiemelkedően biztonságosnak bizonyult (clinicaltrials.gov ID: NCT03573518; további részletek a <https://www.botanixpharma.com/> honlapon érhetőek el) (54,62). Tekintettel arra, hogy valamennyi pCB erősen lipofil vegyület, ezért helyi alkalmazás esetén (speciális permeációs enhanszer hiányában) valószínűleg a transzfollikuláris úton át jutnak a bőrbe, és jó eséllyel felhalmozódnak a lipidekben gazdag FM-ekben (114); ezen fizikokémiai tulajdonságaik a pCB-okat ideális, szelektíven a FM-eket megcélzó gyógyszerjelöltekké teszik, ami minimalizálhatja a szisztémás mellékhatások felléptének kockázatát.

7.2. A NA humán szebocitákra gyakorolt hatásainak áttekintése

Kísérleteink második felében a NA biológiai hatásainak vizsgálata állt az érdeklődésünk középpontjában. Kimutattuk, hogy a NA ≤ 100 μM -os koncentrációig nem befolyásolja a szebociták életképességét (24, 48 és 72 órás kezelések; **20. ábra**), nem indukál korai sejthalál folyamatokat (24 és 48 órás kezelések; **21. ábra**), és nem befolyásolja a bazális, homeosztatis faggyúlipid-termelést sem (48 órás kezelések; **22. ábra**). Ezzel ellentétben a NA normalizálja az AA-val indukált, aknét modellező, kórosan fokozott lipidszintézist (48 órás kezelések; **23. ábra**). A NA nem-citotoxikus koncentrációinak liposztatis hatása ráadásul

univerzálisnak bizonyult, hiszen nemcsak a döntően a PKC δ aktivációja révén lipidtermelést fokozó AA (36), hanem az ettől részben független jelpályákat aktiváló AEA (CB₂) (35), illetve LA+T kombináció (PPAR-ok) (60) hatását is kivédte (48 órás kezelések; **24/a-b ábra**). Végezetül kimutattuk azt is, hogy a NA fenti, nem-citotoxikus koncentrációi dóziszfüggő módon csökkentették a szebociták proliferációját (72 órás kezelések; **25. ábra**), ami alapján felmerül, hogy *in vivo* is hatékony lehet a kórosan fokozott faggyútermelés normalizálásában.

A látott kedvező hatások mechanizmusát kutatva elsőként a NA Ca²⁺-homeosztázisra gyakorolt hatásait vizsgáltuk meg, hiszen a mi munkacsoportunk és mások korábbi eredményei alapján az [Ca²⁺]_{IC} emelkedése a most látottakhoz nagyon hasonló liposztatikus hatások kialakulásához vezethet (37,38,59,115). Ezen korábbi adatokkal összhangban megállapítottuk, hogy a NA lipidszintézist csökkentő hatása valóban Ca²⁺-függő módon alakult ki, hiszen a Ca²⁺-kelátor BAPTA AM-mel történő együttes kezelés esetén a hatás nem jelentkezett (48 órás kezelések; **27. ábra**). Kimutattuk azt is, hogy a NA liposztatikus koncentrációi dóziszfüggő módon fokozzák a humán szebociták [Ca²⁺]_{IC}-jét (**28. ábra**), a Ca²⁺-jel forrása pedig az extracelluláris tér, hiszen a Ca²⁺-jel szinte teljesen megszűnt névlegesen Ca²⁺-mentes oldat alkalmazásakor (**29. ábra**). Mindezek alapján nagyon valószínű, hogy a NA (a CBD-hoz hasonlóan) (59) a szebociták Ca²⁺-homeosztázisát befolyásolva normalizálja azok faggyúlipid-termelését.

Amint arról a fentiekben már szó esett, a NA képes közvetlenül aktiválni számos döntően Ca²⁺-ra permeábilis TRPV csatornát (89,89–91), amelyekről ismert, hogy a NA esetében látotthoz hasonló liposztatikus hatást fejtenek ki (37,38,59), ezért a következőkben azt vizsgáltuk meg, hogy ezek a csatornák részt vehetnek-e a NA hatásainak kialakításában. Tekintettel arra, hogy a NA által kiváltott Ca²⁺-jelet a TRPV csatornák általános gátlószere, a RR nem csökkentette (**29. ábra**), eredményeink arra mutattak, hogy a hatás hátterében egy eddig ismeretlen, TRPV csatorna-független mechanizmus állhat.

Amint arról az *Irodalmi áttekintés* fejezetben már szó esett, a farmakológiai dózisban alkalmazott NA elsődleges receptora a HCA₂ (80–82). Bár ez egy 7 transzmembrán doménnel rendelkező, általában G_i-fehérjéhez kapcsolt metabotróp receptor (83), az aktivációját (indirekt módon) szintén követheti Ca²⁺-jel kialakulása (85,86), ezért megvizsgáltuk azt, is, hogy jelen van-e a HCA₂ humán szebocitákon. Megállapítottuk a receptor mind mRNS (Q-PCR), mind fehérje szinten (IF) kifejeződik a sejteken (**30. ábra**), ami alapján felmerült, hogy az aktivációja lehet felelős a NA biológiai hatásaiért. Tekintettel arra, hogy nem állt rendelkezésre szelektív antagonistá, elvégeztük a HCA₂ siRNS-transzfeccióval történő szelektív „gécscsendesítését”, és megállapítottuk, hogy a liposztatikus hatás és a Ca²⁺-jel kialakulása egyaránt HCA₂-függő folyamat (**31. ábra**). Jelen adataink tehát nemcsak felvetik a klinikumban már évtizedek óta biztonságosan használt NA esetleges bőrgyógyászati (topikális) alkalmazásának a lehetőségét, hanem rávilágítanak egy eleddig ismeretlen szabályozó, a HCA₂ receptor szerepére is, ami egy teljesen új terápiás célpont lehet a jövőbeli akne és szeporreá elleni gyógyszerfejlesztési stratégiában****.

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 szeporreában. Ezek közé a bizonyítékok közé sorolható először is az a tény, hogy pellagránban (azaz a NA hiánybetegségében) gyakran észlelhető „dyssebacia” (78), azaz a szebociták hiperpláziája, megváltozott faggyútermelése és a FM-ek következményes megnagyobbodása (**5/b ábra**). Másodsor, a farmakológiai dózisban alkalmazott NA kezelés mellékhatásai között szerepel a bőr kiszáradása (<https://www.drugs.com/pro/niacin.html>).

**** Annál is inkább, hiszen a HCA₂ szelektív „gécscsendesítése” nem befolyásolta sem a bazális, sem pedig az AA-val indukált faggyúlipid-termelést (**31/d ábra**), és sem az AA, sem a NA kezelés nem változtatta meg a HCA₂ receptor kifejeződését (**32. ábra**), így (bár ezt természetesen szövettani vizsgálatokkal kellene megerősíteni) a receptor jó eséllyel az akne egész kórlefolyása alatt stabilan jelenlévő farmakológiai célpont lehet.

Harmadszor, egyes klinikai vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy az orálisan alkalmazott NA hatékonyan csökkenti a pattanásosságot (92–94)^{††††}.

Azt is érdemes megjegyezni, hogy a B3 vitaminkomplex másik tagja, a nikotinamid topikális alkalmazást követően egy kettősvak, placebo-kontrollált klinikai vizsgálatban hatékonyan csökkentette a faggyútermelést, és összességében egyre több bizonyíték utal arra, hogy hatékony az akne, illetve más bőrbetegségek kezelésében (65,66,117–120). Jóllehet a nikotinamid akne ellenes hatásának mechanizmusa még csak részben ismert (117). Az bizonyos, hogy nem aktiválja a HCA₂ receptort (82,121), tehát biztosan nem az általunk a NA-val összefüggésben a fentiekben leírt liposztatikus jelátviteli utat aktiválja. Tekintettel azonban arra, hogy a NA *in vivo* átalakulhat nikotinamiddá (122), feltételezhető, hogy a helyileg alkalmazott NA klinikai hatékonysága akár meg is haladhatja a nikotinamidét, hiszen elméletileg mind HCA₂-függő direkt, mind pedig nikotinamiddá történő átalakulásból fakadó, HCA₂-független, közvetett akne ellenes hatásokat kialakíthat.

Amint arról a fentiekben már szó esett, liposztatikus és anti-proliferatív hatékonysága ellenére a NA nem volt képes megakadályozni a szebociták LPS-indukálta gyulladási válaszát (26. ábra). Érdemes ugyanakkor megjegyezni, hogy a CBD vizsgálatok kapott korábbi adataink alapján nem teljesen váratlan, hogy a NA nem bizonyult gyulladásgátló hatásúnak (59). Amint arról korábban már részletesen szó esett, a CBD liposztatikus és anti-proliferatív hatásaiért eredményeink szerint a TRPV4 ioncsatornák aktiválása és a következményesen kialakuló Ca²⁺-jel a felelős, gyulladáscsökkentő hatását azonban egy ettől független jelpálya (adenozin A_{2A} receptor → cAMP↑ → TRIB3↑ → a p65 NF-κB útvonal gátlása) közvetítette (59). Nemrégiben ráadásul azt is kimutattuk, hogy egy másik Ca²⁺-permeábilis ioncsatorna,

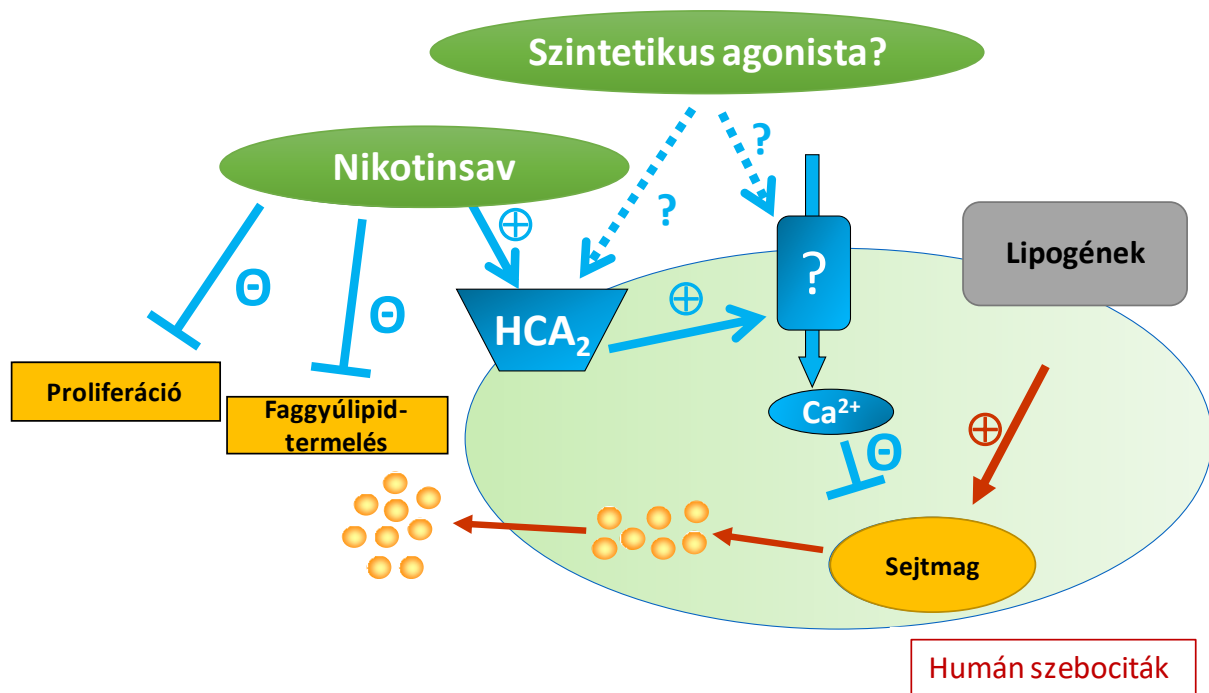
^{††††} Bár három független klinikai vizsgálatról van szó, fontos hangsúlyozni, hogy ezek a legjobb indulattal is csak előzetes eredményeknek tekinthetők, hiszen egyik esetben sem alkalmaztak kettősvak, placebo-kontrollált vizsgálati elrendezést, ami (tekintetbe véve az akne esetén tapasztalható jelentős, akár 20-30%-os spontán léziószám-csökkenést is eredményező placebo hatást) (116) mindenképpen szükséges volna a kezelés tényleges hatásosságának megítélésére.

nevezetesen a TRPV3 aktiválása (amellett, hogy a TRPV1-hez és a TRPV4-hez hasonlóan csökkentette az aknéra jellemző, kórosan fokozott faggyúlipid-termelést) fokozta számos gyulladáscsökkentő citokin expresszióját és felszabadulását humán sebociták (37) és epidermális keratinociták esetén is (123). Mindezek fényében nem meglepő, hogy a NA a HCA₂ aktiválásán és az [Ca²⁺]_{IC} következményes emelésén keresztül hatékonyan normalizálta az faggyúlipid-szintézist, de nem tudta kivédeni az LPS gyulladáscsökkentő választ kiváltó hatását. Ezzel együtt fontos megjegyezni, hogy a NA a sebociták által termelt gyulladáscsökkentő citokinek szintjére gyakorolt közvetlen hatás nélkül is lehet hatékony az aknéra jellemző gyulladás enyhítésében. Egyfelől a sebociták nemcsak citokineket, hanem egyéb immunológiailag potenciálisan aktív mediátorokat (pl. adipokineket) is termelnek (124), amelyek kifejeződésére akár a HCA₂ receptor aktiválása is befolyással lehet, arról nem is szólva, hogy egy közelmúltban megjelent tanulmány szerint egyes faggyúlipidek maguk is közvetlenül szabályozzák a makrofágok polarizációját és aktivációját (125) ^{†††}. Másfelől pedig azt sem szabad elfelejteni, hogy, bár a NA elhanyagolható hatást gyakorol a sebociták immunfolyamataira (**26. ábra**), közvetlenül a környező immunsejtekre (például makrofágokra) hatva (11,126), mégis képes lehet gyulladásgátló hatás elérésére.

Bár eredményeink alapján a HCA₂ a FM-ek biológiájának egy újonnan megismert szabályozója, kísérleteink végén egy fontos kérdés nyitva maradt, jelesül, hogy a HCA₂ receptor aktiválása pontosan hogyan vezethet az [Ca²⁺]_{IC} növekedéshez a humán sebociták esetében (**33. ábra**). Amint az már fentebb is említésre került, noha a HCA₂ egy G_i kapcsolt receptor, nem példanélküli, hogy aktiválását Ca²⁺ beáramlás követi (85,86). A jelenleg még nem ismert Ca²⁺-permeabilis csatorna azonosítása már csak azért is fontos lenne, mert

^{†††} Természetesen a NA által a faggyú összetételére gyakorolt hatások pontos felderítéséhez további, célzott lipidomikai vizsgálatok lennének szükségesek, azonban könnyen elképzelhető, hogy a CBD-hoz hasonlóan (59) a faggyúlipid-termelés mennyiségi csökkentése egyszersmind minőségi normalizálással is együtt jár, ami – tekintettel arra, hogy a fentiek szerint egyes faggyúlipidek maguk is rendelkeznek immunregulatórikus funkciókkal - kedvezően befolyásolhatja a bőr gyulladáscsökkentő folyamatait.

közvetlen farmakológiai aktiválásával egy új terápiás célponttal gazdagodna az akne és szeborrea elleni terápiás repertoárunk, arról nem is szólva, hogy szemben pl. a TRPV3-mal, ahol az ioncsatorna aktivációja a liposztatikus hatás mellett gyulladásos választ is kivált (37), ezek az ismeretlen Ca^{2+} -csatornák eredményeink szerint olyan módon befolyásolják a szebociták Ca^{2+} -háztartását, ami nem vált ki gyulladásos választ (26. ábra).



33. ábra A NA és a HCA_2 agonizmus lehetséges anti-akne hatásának áttekintése

A NA az életképesség és a bazális, homeosztatisz faggyúlipid-termelés csökkentése nélkül képes anti-proliferatív, valamint univerzális liposztatikus hatást kifejteni a HCA_2 receptor aktiválása, illetve a következményes Ca^{2+} -beáramlás révén. A NA-ban, valamint a szintetikus HCA_2 agonistákban, illetve az ez ideig nem azonosított sejtfelszíni Ca^{2+} -csatornát közvetlenül aktiváló farmakológiai ágensekben rejlő lehetséges anti-akne és/vagy anti-szeborrea potenciál tesztelése célzott, jól tervezett, randomizált, kettősvak, placebo-kontrollált klinikai vizsgálatok feladata lesz.

7.3. Záró gondolatok – A jelen tanulmány korlátai

Nyilvánvaló, hogy – bár a fentiekben ígéretes kísérletes adatok kerültek ismertetésre - a jelen vizsgálat transzlációs értékét korlátozza, hogy megállapításaink a megfelelő állatmodellek sajnálatos hiánya, valamint a primer szebocita tenyészetek fenntartásának objektív nehézségei miatt (12,27,29,30,32,34) egyetlen sejtvonalon alapulnak. Tekintettel azonban arra, hogy az

általunk használt sejtes modellrendszer a CBD esetében megbízhatóan jelezték előre nemcsak az *ex vivo* (teljes vastagságú humán bőr szervkultúra), hanem az eddigi adatok alapján az *in vivo*, klinikai hatékonyságot is (<https://www.botanixpharma.com/>; clinicaltrials.gov ID: NCT03573518) (54,62), 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.

8. 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 μM -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 homeosztatikus 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 HCA₂ receptor aktivációja és a következményes Ca²⁺-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, szeporrea stb.) kezelésében.

9. Summary

In the first part of our experiments, we aimed to investigate the biological effects of certain non-psychotropic pCBs on human SZ95 sebocytes. We have shown that, up to 10 μ M, pCBs can differentially influence the most characteristic biological function of sebocytes, i.e. the basal sebaceous lipid synthesis, without decreasing the viability of the cells. Just like the eCBs, CBG and CBGV promoted lipogenesis, CBDV exerted no significant effects, whereas CBC and THCV reduced basal sebaceous lipid synthesis. Since all pCBs efficiently suppressed the LPS-induced pro-inflammatory response of the sebocytes, these data collectively suggest that CBG and CBGV might be beneficial in dryness-accompanied inflammatory skin conditions. Next, we found that CBC, CBDV and THCV significantly decreased the AA-induced lipogenesis. Further dissecting the effects of the most potent compound, i.e. THCV, we have shown that it behaved as a “universal” lipostatic agent (i.e. it was able to abrogate the effects of other lipogens acting via signaling pathways, which were different from the ones activated by AA), it exerted anti-proliferative effects, and, as mentioned above, it almost completely normalized the LPS-induced expression and release of pro-inflammatory cytokines.

In the second part of our experiments, we demonstrated that, without influencing viability or homeostatic sebaceous lipid synthesis, NA efficiently suppressed proliferation as well as various lipogenic agent-induced, acne-mimicking, excessive sebaceous lipogenesis of the sebocytes. Moreover, we also showed that the effects of NA were mediated via the activation of HCA₂ receptor and the subsequent Ca²⁺-influx.

Collectively, our data demonstrate that NA as well as pCBs influence biology of human sebocytes in a rather complex manner, and that they can become promising, novel tools in the management of several diseases characterized by sebaceous gland dysfunction (e.g. dry skin, acne, seborrhea, etc.).

10. Irodalomjegyzék

1. Kárpáti S. Bőrgyógyászat és venerológia. 2013.
2. Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008. 0;17(12):1063–72.
3. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W, Antal Miklós. Szövettan: kézikönyv és atlasz. Budapest: Medicina; 2007.
4. Fischer H, Fumicz J, Rossiter H, Napirei M, Buchberger M, Tschachler E, és mtsai. Holocrine Secretion of Sebum Is a Unique DNase2-Dependent Mode of Programmed Cell Death. *J Invest Dermatol.* 2017. március 1.;137(3):587–94.
5. Inoue T, Miki Y, Kakuo S, Hachiya A, Kitahara T, Aiba S, és mtsai. Expression of steroidogenic enzymes in human sebaceous glands. *J Endocrinol.* 2014. szeptember;222(3):301–12.
6. Ottaviani M, Camera E, Picardo M. Lipid mediators in acne. *Mediators Inflamm.* 2010;2010.
7. Ye C, Chen J, Yang S, Yi J, Chen H, Li M, és mtsai. Skin sensitivity evaluation: What could impact the assessment results? *J Cosmet Dermatol.* 2019. szeptember 9.;
8. Kubo A, Nagao K, Amagai M. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J Clin Invest.* 2012. február 1.;122(2):440–7.
9. Kuo I-H, Yoshida T, De Benedetto A, Beck LA. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013. február;131(2):266–78.
10. Pappas A. Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol.* 2009. március;1(2):72–6.
11. Shi Y, Lai X, Ye L, Chen K, Cao Z, Gong W, és mtsai. Activated niacin receptor HCA2 inhibits chemoattractant-mediated macrophage migration via Gβγ/PKC/ERK1/2 pathway and heterologous receptor desensitization. *Sci Rep.* 2017. 10;7:42279.
12. Tóth BI, Oláh A, Szölloosi AG, Czifra G, Bíró T. „Sebocytes” makeup”: novel mechanisms and concepts in the physiology of the human sebaceous glands”. *Pflugers Arch.* 2011. június;461(6):593–606.
13. Saitta P, Keehan P, Yousif J, Way BV, Grekin S, Brancaccio R. An update on the presence of psychiatric comorbidities in acne patients, part 1: overview of prevalence. *Cutis.* 2011. július;88(1):33–40.
14. Kurokawa I, Danby FW, Ju Q, Wang X, Xiang LF, Xia L, és mtsai. New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. *Exp Dermatol.* 2009. október;18(10):821–32.
15. Szabó K, Kemény L. Studying the genetic predisposing factors in the pathogenesis of acne vulgaris. *Hum Immunol.* 2011. szeptember;72(9):766–73.
16. Zouboulis CC, Eady A, Philpott M, Goldsmith LA, Orfanos C, Cunliffe WC, és mtsai. What is the pathogenesis of acne? *Exp Dermatol.* 2005. február;14(2):143–52.

17. Dursun R, Daye M, Durmaz K. Acne and rosacea: What's new for treatment? *Dermatol Ther.* 2019. július 11.;e13020.
18. Bocquet-Trémoureux S, Corvec S, Khammari A, Dagnelie M-A, Boisrobert A, Dreno B. Acne fulminans and *Cutibacterium acnes* phylotypes. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2019. 0;
19. Dagnelie M-A, Corvec S, Saint-Jean M, Nguyen J-M, Khammari A, Dréno B. *Cutibacterium acnes* phylotypes diversity loss: a trigger for skin inflammatory process. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2019. július 12.;
20. Schuetz AN. The Nesting Doll of *Cutibacterium acnes* Clonality. *J Clin Microbiol.* 2019. 0;
21. Yang J, Tsukimi T, Yoshikawa M, Suzuki K, Takeda T, Tomita M, és mtsai. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) 16S rRNA Genotyping of Microbial Samples from Possessions Contributes to Owner Identification. *mSystems.* 2019. 0;4(6).
22. Zeng R, Xu H, Liu Y, Du L, Duan Z, Tong J, és mtsai. miR-146a Inhibits Biofilm-Derived *Cutibacterium acnes*-Induced Inflammatory Reactions in Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2019. 0;139(12):2488-2496.e4.
23. Zouboulis CC, Jourdan E, Picardo M. Acne is an inflammatory disease and alterations of sebum composition initiate acne lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2014. május;28(5):527–32.
24. Ellis CN, Krach KJ. Uses and complications of isotretinoin therapy. *J Am Acad Dermatol.* 2001. 0;45(5):S150-157.
25. Kutlu Ö. Effect of isotretinoin treatment on the inflammatory markers in patients with acne vulgaris: Can monocyte/HDL be a new indicator for inflammatory activity of isotretinoin treatment? *Cutan Ocul Toxicol.* 2019. 0;1–15.
26. Wang C, Li H, Ma P, Sun J, Li L, Wei J, és mtsai. The third generation retinoid adapalene triggered DNA damage to induce S phase arrest in HaCat cells. *Fundam Clin Pharmacol.* 2019. 0;
27. Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea | Christos C. Zouboulis | Springer [Internet]. [idézi 2017. október 11.]. Elérhető: <http://www.springer.com/gp/book/9783540693741>
28. Dessinioti C, Katsambas A, Antoniou C. Hidradenitis suppurativa (acne inversa) as a systemic disease. *Clin Dermatol.* 2014. június;32(3):397–408.
29. Zouboulis CC, Seltmann H, Neitzel H, Orfanos CE. Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol.* 1999. 0;113(6):1011–20.
30. Mirshahpanah P, Maibach HI. Models in acnegenesis. *Cutan Ocul Toxicol.* 2007;26(3):195–202.
31. Xia L, Zouboulis CC, Detmar M, Mayer-da-Silva A, Stadler R, Orfanos CE. Isolation of human sebaceous glands and cultivation of sebaceous gland-derived cells as an in vitro model. *J Invest Dermatol.* 1989. szeptember;93(3):315–21.
32. Zouboulis CC, Baron JM, Böhm M, Kippenberger S, Kurzen H, Reichrath J, és mtsai. Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Exp Dermatol.* 2008. június;17(6):542–51.

33. Lo Celso C, Berta MA, Braun KM, Frye M, Lyle S, Zouboulis CC, és mtsai. Characterization of bipotential epidermal progenitors derived from human sebaceous gland: contrasting roles of c-Myc and beta-catenin. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2008. május;26(5):1241–52.
34. Zouboulis CC, Schagen S, Alestas T. The sebocyte culture: a model to study the pathophysiology of the sebaceous gland in seborrhea, seborrhoea and acne. *Arch Dermatol Res*. 2008. szeptember;300(8):397–413.
35. Dobrosi N, Tóth BI, Nagy G, Dózsa A, Géczy T, Nagy L, és mtsai. Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2008. október;22(10):3685–95.
36. Géczy T, Oláh A, Tóth BI, Czifra G, Szöllősi AG, Szabó T, és mtsai. Protein kinase C isoforms have differential roles in the regulation of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol*. 2012. 0;132(8):1988–97.
37. Szántó M, Oláh A, Szöllősi AG, Tóth KF, Páyer E, Czakó N, és mtsai. Activation of TRPV3 Inhibits Lipogenesis and Stimulates Production of Inflammatory Mediators in Human Sebocytes-A Putative Contributor to Dry Skin Dermatoses. *J Invest Dermatol*. 2019. 0;139(1):250–3.
38. Tóth BI, Géczy T, Griger Z, Dózsa A, Seltmann H, Kovács L, és mtsai. Transient receptor potential vanilloid-1 signaling as a regulator of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol*. 2009. február;129(2):329–39.
39. Zákány N, Oláh A, Markovics A, Takács E, Aranyász A, Nicolussi S, és mtsai. Endocannabinoid Tone Regulates Human Sebocyte Biology. *J Invest Dermatol*. 2018;138(8):1699–706.
40. Pollio A. The Name of Cannabis: A Short Guide for Nonbotanists. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2016;1(1):234–8.
41. Gloss D. An Overview of Products and Bias in Research. *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. 2015. október;12(4):731–4.
42. Grotenhermen F. Cannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005. október;4(5):507–30.
43. Russo EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol*. 2011. 0;163(7):1344–64.
44. Kumar A, Premoli M, Aria F, Bonini SA, Maccarinelli G, Gianoncelli A, és mtsai. Cannabimimetic plants: are they new cannabinoidergic modulators? *Planta*. 2019. június;249(6):1681–94.
45. Mechoulam R, Gaoni Y. Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron*. 1965. május;21(5):1223–9.
46. Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol*. 2006. 0;147 Suppl 1:S163-171.
47. Caprioglio D, Allegrone G, Pollastro F, Valera S, Lopatriello A, Collado JA, és mtsai. O-Methyl Phytocannabinoids: Semi-synthesis, Analysis in Cannabis Flowerheads, and Biological Activity. *Planta Med*. 2019. április 1.;

48. Solymosi K, Köfalvi A. Cannabis: A Treasure Trove or Pandora's Box? *Mini Rev Med Chem*. 2017;17(13):1223–91.
49. Pratt M, Stevens A, Thuku M, Butler C, Skidmore B, Wieland LS, és mtsai. Benefits and harms of medical cannabis: a scoping review of systematic reviews. *Syst Rev*. 2019. 0;8(1):320.
50. Welling MT, Liu L, Raymond CA, Ansari O, King GJ. Developmental Plasticity of the Major Alkyl Cannabinoid Chemotypes in a Diverse Cannabis Genetic Resource Collection. *Front Plant Sci*. 2018;9:1510.
51. Corroon J, Felice JF. The Endocannabinoid System and its Modulation by Cannabidiol (CBD). *Altern Ther Health Med*. 2019. június;25(S2):6–14.
52. Cunningham CW. Plant-Based Modulators of Endocannabinoid Signaling. *J Nat Prod*. 2019. március 22.;82(3):636–46.
53. Di Marzo V. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(9):623–39.
54. Tóth KF, Ádám D, Bíró T, Oláh A. Cannabinoid Signaling in the Skin: Therapeutic Potential of the “C(ut)annabinoid” System. *Molecules* [Internet]. 2019. március 6. [idézi 2019. június 8.];24(5). Elérhető: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6429381/>
55. Maccarrone M, Bab I, Bíró T, Cabral GA, Dey SK, Di Marzo V, és mtsai. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci*. 2015. május;36(5):277–96.
56. Oláh A, Szekanecz Z, Bíró T. Targeting Cannabinoid Signaling in the Immune System: „High”-ly Exciting Questions, Possibilities, and Challenges. *Front Immunol*. 2017;8:1487.
57. Di Marzo V, Piscitelli F. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*. 2015. október;12(4):692–8.
58. Bíró T, Tóth BI, Haskó G, Paus R, Pacher P. The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends Pharmacol Sci*. 2009. augusztus;30(8):411–20.
59. Oláh A, Tóth BI, Borbíró I, Sugawara K, Szöllösi AG, Czifra G, és mtsai. Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. *J Clin Invest*. 2014. szeptember;124(9):3713–24.
60. Makrantonaki E, Zouboulis CC. Testosterone metabolism to 5alpha-dihydrotestosterone and synthesis of sebaceous lipids is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor ligand linoleic acid in human sebocytes. *Br J Dermatol*. 2007. március;156(3):428–32.
61. Leonardsson G, Steel JH, Christian M, Pocock V, Milligan S, Bell J, és mtsai. Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. június 1.;101(22):8437–42.
62. Kircik LH. What's new in the management of acne vulgaris. *Cutis*. 2019. július;104(1):48–52.
63. Chai JT, Digby JE, Ruparelia N, Jefferson A, Handa A, Choudhury RP. Nicotinic acid receptor GPR109A is down-regulated in human macrophage-derived foam cells. *PLoS One*. 2013;8(5):e62934.

64. Digby JE, Martinez F, Jefferson A, Ruparelia N, Chai J, Wamil M, és mtsai. Anti-inflammatory effects of nicotinic acid in human monocytes are mediated by GPR109A dependent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012. március;32(3):669–76.
65. Draelos ZD, Matsubara A, Smiles K. The effect of 2% niacinamide on facial sebum production. *J Cosmet Laser Ther Off Publ Eur Soc Laser Dermatol.* 2006. június;8(2):96–101.
66. Walocko FM, Eber AE, Keri JE, Al-Harbi MA, Nouri K. The role of nicotinamide in acne treatment. *Dermatol Ther.* 2017. szeptember;30(5).
67. Julius U, Fischer S. Nicotinic acid as a lipid-modifying drug--a review. *Atheroscler Suppl.* 2013. 0;14(1):7–13.
68. Drexel H. Nicotinic acid in the treatment of hyperlipidaemia. *Fundam Clin Pharmacol.* 2007. 0;21 Suppl 2:5–6.
69. Farmer JA. Nicotinic acid: a new look at an old drug. *Curr Atheroscler Rep.* 2009. március;11(2):87–92.
70. Bodor ET, Offermanns S. Nicotinic acid: an old drug with a promising future. *Br J Pharmacol.* 2008. március;153 Suppl 1:S68-75.
71. PubChem. Nicotinic acid [Internet]. [idézi 2019. június 24.]. Elérhető: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/938>
72. Subramani K, Chu X, Warren M, Lee M, Lu S, Singh N, és mtsai. Deficiency of metabolite sensing receptor HCA2 impairs the salutary effect of niacin in hemorrhagic shock. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019. március 1.;1865(3):688–95.
73. Karthikeyan K, Thappa DM. Pellagra and skin. *Int J Dermatol.* 2002. 0;41(8):476–81.
74. Nogueira A, Duarte AF, Magina S, Azevedo F. Pellagra associated with esophageal carcinoma and alcoholism. *Dermatol Online J.* 2009. május 15.;15(5):8.
75. Hegyi J, Schwartz RA, Hegyi V. Pellagra: dermatitis, dementia, and diarrhea. *Int J Dermatol.* 2004. 0;43(1):1–5.
76. Asifa N, Shashikiran AR, Rajashekhar N. Dyssebacia: An Early Cutaneous Marker of Niacin Deficiency. *Int J Med Dent Sci.* 2017. július 1.;6(2):1539.
77. Elvehjem CA. Pellagra, a deficiency disease. *Proc Am Philos Soc.* 1949. szeptember;93(4):335–9.
78. Wan P, Moat S, Anstey A. Pellagra: a review with emphasis on photosensitivity. *Br J Dermatol.* 2011. június;164(6):1188–200.
79. McKenney J. Niacin for dyslipidemia: considerations in product selection. *Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm.* 2003. május 15.;60(10):995–1005.
80. Santolla MF, De Francesco EM, Lappano R, Rosano C, Abonante S, Maggiolini M. Niacin activates the G protein estrogen receptor (GPER)-mediated signalling. *Cell Signal.* 2014. július;26(7):1466–75.
81. Offermanns S. Free fatty acid (FFA) and hydroxy carboxylic acid (HCA) receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54:407–34.

82. Wise A, Foord SM, Fraser NJ, Barnes AA, Elshourbagy N, Eilert M, és mtsai. Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid. *J Biol Chem.* 2003. március 14.;278(11):9869–74.
83. Colletti SL, IJzerman AP, Lovenberg TW, Offermanns S, Semple G, Waters MG, és mtsai. Hydroxycarboxylic acid receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. IUPHARBPS Guide Pharmacol CITE [Internet]. 2019. szeptember 16. [idézi 2019. december 20.];2019(4). Elérhető: <http://journals.ed.ac.uk/gtopdb-cite/article/view/3201>
84. Dunbar RL, Goel H, Tuteja S, Song W-L, Nathanson G, Babar Z, és mtsai. Measuring niacin-associated skin toxicity (NASTy) stigmata along with symptoms to aid development of niacin mimetics. *J Lipid Res.* 2017;58(4):783–97.
85. Benyó Z, Gille A, Kero J, Csiky M, Suchánková MC, Nüsing RM, és mtsai. GPR109A (PUMA-G/HM74A) mediates nicotinic acid-induced flushing. *J Clin Invest.* 2005. december 1.;115(12):3634–40.
86. Benyó Z, Gille A, Bennett CL, Clausen BE, Offermanns S. Nicotinic Acid-Induced Flushing Is Mediated by Activation of Epidermal Langerhans Cells. *Mol Pharmacol.* 2006. december;70(6):1844–9.
87. Hanson J, Gille A, Offermanns S. Role of HCA₂ (GPR109A) in nicotinic acid and fumaric acid ester-induced effects on the skin. *Pharmacol Ther.* 2012. október;136(1):1–7.
88. Maciejewski-Lenoir D, Richman JG, Hakak Y, Gaidarov I, Behan DP, Connolly DT. Langerhans Cells Release Prostaglandin D2 in Response to Nicotinic Acid. *J Invest Dermatol.* 2006. december 1.;126(12):2637–46.
89. Clifton HL, Inceoglu B, Ma L, Zheng J, Schaefer S. TRPV1 Channels are Involved in Niacin-induced Cutaneous Vasodilation in Mice: *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014. november;1.
90. Ma L, Lee BH, Mao R, Cai A, Jia Y, Clifton H, és mtsai. Nicotinic acid activates the capsaicin receptor TRPV1: Potential mechanism for cutaneous flushing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014. június;34(6):1272–80.
91. Ma L, Lee BH, Clifton H, Schaefer S, Zheng J. Nicotinic Acid is a Common Regulator of Heat-Sensing TRPV1-4 Ion Channels. *Sci Rep* [Internet]. 2015. augusztus [idézi 2019. augusztus 21.];5(1). Elérhető: <http://www.nature.com/articles/srep08906>
92. Jiang 姜 H浩, Li C-Y. High dose niacin in the treatment of acne vulgaris: a pilot study. *Chin J Aesthetic Med.* 2016. 0 15.;25.
93. Lynch FW. Nicotinic acid in the treatment of acne vulgaris. *Arch Dermatol Syphilol.* 1940. szeptember 1.;42(3):481–2.
94. Marchand WE. The treatment of acne vulgaris with nicotinic acid induced vasodilatation. *Mil Med.* 1955. július;117(1):60–2.
95. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998. 0;281(5381):1309–12.
96. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta.* 1998. 0;1366(1–2):151–65.

97. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, és mtsai. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012. június 28.;9(7):676–82.
98. Schneider MR, Paus R. Sebocytes, multifaceted epithelial cells: lipid production and holocrine secretion. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010. február;42(2):181–5.
99. Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. *Rook's Textbook of Dermatology* [Internet]. New York, NY: John Wiley & Sons; 2013 [idézi 2019. szeptember 19.]. Elérhető: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:101:1-2014111312593>
100. Mattii M, Lovászi M, Garzorz N, Atenhan A, Quaranta M, Lauffer F, és mtsai. Sebocytes contribute to skin inflammation by promoting the differentiation of T helper 17 cells. *Br J Dermatol*. 2018. március;178(3):722–30.
101. Alexander SP, Striessnig J, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, Faccenda E, és mtsai. The concise guide to pharmacology 2017/18: Voltage-gated ion channels. *Br J Pharmacol*. 2017. 0;174 Suppl 1:S160–94.
102. Elangovan S, Pathania R, Ramachandran S, Ananth S, Padia RN, Lan L, és mtsai. The niacin/butyrate receptor GPR109A suppresses mammary tumorigenesis by inhibiting cell survival. *Cancer Res*. 2014. február 15.;74(4):1166–78.
103. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Di Marzo V, Elphick MR, és mtsai. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev*. 2010. 0;62(4):588–631.
104. De Petrocellis L, Orlando P, Moriello AS, Aviello G, Stott C, Izzo AA, és mtsai. Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiol Oxf Engl*. 2012. február;204(2):255–66.
105. De Petrocellis L, Vellani V, Schiano-Moriello A, Marini P, Magherini PC, Orlando P, és mtsai. Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008. június;325(3):1007–15.
106. Navarro G, Varani K, Reyes-Resina I, Sánchez de Medina V, Rivas-Santisteban R, Sánchez-Carnerero Callado C, és mtsai. Cannabigerol Action at Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptors and at CB₁–CB₂ Heteroreceptor Complexes. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018. június 21. [idézi 2019. december 20.];9. Elérhető: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6021502/>
107. De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allarà M, Bisogno T, Petrosino S, és mtsai. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol*. 2011. 0;163(7):1479–94.
108. Cascio M, Gauson L, Stevenson L, Ross R, Pertwee R. Evidence that the plant cannabinoid cannabigerol is a highly potent α 2-adrenoceptor agonist and moderately potent 5HT_{1A} receptor antagonist. *Br J Pharmacol*. 2010. január;159(1):129–41.
109. Borrelli F, Pagano E, Romano B, Panzera S, Maiello F, Coppola D, és mtsai. Colon carcinogenesis is inhibited by the TRPM8 antagonist cannabigerol, a Cannabis-derived non-psychoactive cannabinoid. *Carcinogenesis*. 2014. 0;35(12):2787–97.
110. Brierley DI, Harman JR, Giallourou N, Leishman E, Roashan AE, Mellows BAD, és mtsai. Chemotherapy-induced cachexia dysregulates hypothalamic and systemic lipoamines and is attenuated by cannabigerol. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2019. 0;10(4):844–59.

111. Mammana S, Cavalli E, Gugliandolo A, Silvestro S, Pollastro F, Bramanti P, és mtsai. Could the Combination of Two Non-Psychotropic Cannabinoids Counteract Neuroinflammation? Effectiveness of Cannabidiol Associated with Cannabigerol. *Med Kaunas Lith.* 2019. 0;55(11).
112. Zuardi AW, Crippa J a. S, Hallak JEC, Moreira FA, Guimarães FS. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol.* 2006. április;39(4):421–9.
113. Zuardi AW, Hallak JEC, Dursun SM, Morais SL, Sanches RF, Musty RE, és mtsai. Cannabidiol monotherapy for treatment-resistant schizophrenia. *J Psychopharmacol Oxf Engl.* 2006. szeptember;20(5):683–6.
114. Lodzki M, Godin B, Rakou L, Mechoulam R, Gallily R, Touitou E. Cannabidiol-transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2003. 0;93(3):377–87.
115. Zouboulis C, Seltmann H, Abdel-Naser M, Hossini A, Menon G, Kubba R. Effects of Extracellular Calcium and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on Sebaceous Gland Cells In vitro and In vivo. *Acta Derm Venereol.* 2017;97(3):313–20.
116. Chiou WL. Low intrinsic drug activity and dominant vehicle (placebo) effect in the topical treatment of acne vulgaris. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2012. június;50(6):434–7.
117. Bains P, Kaur M, Kaur J, Sharma S. Nicotinamide: Mechanism of action and indications in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2018. január 3.;84(2):234.
118. Endly DC, Miller RA. Oily Skin: A review of Treatment Options. *J Clin Aesthetic Dermatol.* 2017. augusztus;10(8):49–55.
119. Rolfe HM. A review of nicotinamide: treatment of skin diseases and potential side effects. *J Cosmet Dermatol.* 2014. 0;13(4):324–8.
120. Shalita AR, Smith JG, Parish LC, Sofman MS, Chalker DK. Topical nicotinamide compared with clindamycin gel in the treatment of inflammatory acne vulgaris. *Int J Dermatol.* 1995. június;34(6):434–7.
121. Tunaru S, Lättig J, Kero J, Krause G, Offermanns S. Characterization of determinants of ligand binding to the nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A/PUMA-G). *Mol Pharmacol.* 2005. 0;68(5):1271–80.
122. Montserrat-de la Paz S, Rodriguez D, Cardelo MP, Naranjo MC, Bermudez B, Abia R, és mtsai. The effects of exogenous fatty acids and niacin on human monocyte-macrophage plasticity. *Mol Nutr Food Res.* 2017;61(8).
123. Szöllősi Ag, Vasas N, Angyal Á, Kistamás K, Nánási Pp, Mihály J, és mtsai. Activation of TRPV3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes [Internet]. *The Journal of investigative dermatology.* 2018 [idézi 2019. december 23.]. Elérhető: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28964718-activation-of-trpv3-regulates-inflammatory-actions-of-human-epidermal-keratinocytes/?from_term=vasas+sz%C3%B6ll%C5%91si&from_size=10&from_pos=2
124. Kovács D, Lovászi M, Póliska S, Oláh A, Bíró T, Veres I, és mtsai. Sebocytes differentially express and secrete adipokines. *Exp Dermatol.* 2016. március;25(3):194–9.
125. Lovászi M, Mattii M, Eyerich K, Gácsi A, Csányi E, Kovács D, és mtsai. Sebum lipids influence macrophage polarization and activation. *Br J Dermatol.* 2017;177(6):1671–82.

126. Zhou E, Li Y, Yao M, Wei Z, Fu Y, Yang Z. Niacin attenuates the production of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced mouse alveolar macrophages by HCA2 dependent mechanisms. *Int Immunopharmacol.* 2014. 0;23(1):121–6.

11. Tárgyszavak

Akne, bőr, CBC, CBDV, CBG, CBGV, endokannabinoid rendszer, faggyúmirigy, faggyútermelés, fitokannabinoid, HCA₂ receptor, nikotinsav, szebocita, THCV, TRP csatorna.

12. Key words

Acne, CBC, CBDV, CBG, CBGV, endocannabinoid system, HCA₂ receptor, nicotinic acid, phytocannabinoid, sebaceous gland, sebocyte, sebum production, skin, THCV, TRP channel.

13. 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. Szöllősi 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 Pálma Tímea segítségéért vagyok rendkívül hálás.

Hálásan köszönöm témavezetőmet, Dr. Magi József munkáját, akinek aszemélyében 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.

14. 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-psychoactive phytocannabinoids on human sebocyte functions implicates their introduction in dry/seborrhoeic 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., Szöllősi, 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.

