

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az adipokinek szerepe a faggyúmirigy
működésében**

Kovács Dóra

Témavezető: Dr. Törőcsik Dániel



DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az adipokinek szerepe a faggyúmirigy
működésében**

Kovács Dóra

Témavezető: Dr. Törőcsik Dániel



DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016

Az adipokinek szerepe a faggyúmirigy működésében

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

Írta: **Kovács Dóra**, okleveles biológus

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

Témavezető: Dr. Törőcsik Dániel, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora

tagok: Dr. Holló Péter, PhD

Dr. Nagy Béla, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Bőrgyógyászati Tanszék, Könyvtár, 2016. május 9. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Baltás Eszter, PhD

Dr. Bálint Bálint László, PhD

A bíráló bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora

tagok: Dr. Baltás Eszter, PhD

Dr. Bálint Bálint László, PhD

Dr. Holló Péter, PhD

Dr. Nagy Béla, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme, 2016. május 9. 13 óra

BEVEZETÉS

A faggyúmirigy, a haj folliculusokkal együtt, a pilosebaceus egység alkotója, melynek elsődleges feladata a szébum termelés. Az intenzív szébum termelés valamint a szébum lipid összetételének változása kulcsfontosságú szerepet játszik olyan gyulladásos bőrbetegségek kialakulásában, mint az akné vagy az atópiás dermatitis. Különböző receptorokon (Toll-like receptor [TLR] 2, 4 és 6) keresztül, a faggyúmirigy számos pro-és anti-inflammatórikus citokin (interleukin [IL] - 6 és 10), kemokin (IL-8), antimikrobiális lipid és peptid termelődését szabályozza. Továbbá a faggyúmirigy nemcsak antimikrobiális tulajdonságú β -defenzineket képes termelni, de hozzájárulhat a természetes fényvédelemhez és a melanociták éréséhez is. Az elmúlt évek intenzív kutatásai rávilágítottak arra, hogy a faggyúsejtek – az intenzív lipid metabolizmuson túl - képesek a zsírtermelés és a gyulladás sejtszinten történő összekapcsolására. Ez a kettős funkció nagyban hasonlít a zsírsejtek esetében megfigyeltekhez, ahol a sejtek az intenzív zsírtermelésen kívül képesek a környezetből érkező stimulusok hatására számos inflammatórikus mediátor (adipokin) termelésére. Ilyen adipokinek például az adiponektin, IL-6, resistin, leptin, serpin E1, visfatin, apelin, chemerin, retinol-kötő fehérje 4 (RBP4) vagy a monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1).

A faggyúmirigy által termelt lipidek

A faggyúsejtek az általuk termelt lipideket a sejten belül ún. lipid cseppek formájában halmozzák fel, mely a sejtekből kikerülve létrehozza az ún. faggyút, más néven szébumot. A humán szébum a holokrin szekréció eredménye, mely folyamat során az egész sejt átalakul, a faggyúsejtek teljes mértékben „szétesnek” és a pilosebaceus egység folliculáris csatornájába kerülnek. A szébum fő feladata, hogy bevonja a bőrt illetve a szőrszálakat, ezáltal hozzájárul a bőr hidrofób védelméhez. Alkotóit tekintve, az emberi szébumra elsősorban a zsírsavak, di-és

trigliceridek, viasz-észterek valamint a koleszterin és származékai, mint pl. a szkvalén jellemzőek.

A faggyú által termelt lipidek 2%-át a koleszterin alkotja, ami azonban nem egyedülállóan a faggyúmirigyre jellemző, a test más részein is megtalálható. A koleszterin bioszintézis közti terméke a szkvalén, mely 12%-os arányban fordul elő, és csaknem specifikus a humán szébumra. A viasz észterek szintén egyedülállóan a szébumban fordulnak elő, a test más területein termelődésük nem figyelhető meg, mennyiségük ~25%-a a szébum összsír mennyiségének. A szappansav valamint a szebalénsav szintén kizárólag a faggyúmirigyre jellemző zsírsav, mely nem található meg más állat szébumában. Az imént említett zsírok mellett a telítetlen zsírsavak szintén fontos alkotói a faggyúnak.

A faggyúmirigy gyulladási válasza

A faggyúmirigy számos ún. mintázat felismerő receptorral rendelkezik (TLR2, 4 és 6) melyek aktiválódásával a pro-inflammatórikus citokinek (IL-1 β , IL-6, vagy a tumor nekrozis faktor- α [TNF- α]), kemokinek (IL-8), antimikrobiális lipidek, peptidek valamint a periglanduláris peptidek és neuropeptidek fokozott termelődése figyelhető meg. Ezen fehérjék közül mind az *in vivo* vizsgált faggyúmirigyekben, mind pedig az SZ95 faggyúsejtekben általánosan jellemző az IL-6 és az IL-8 jelenléte, melyek termelődése lipoxigenázok (LOX) cikloxigenázok (COX) vagy arachidon sav jelenlétében tovább fokozódik. A faggyúmirigyek az intenzív lipid metabolizmusukat is képesek a gyulladási válaszuk kialakítására használni, olyan mediátorok termelésével, mint a különböző leukotriének (LT), prosztaglandinok (PG) vagy a 15-hidroxi-eikosa-tetraenolsav. A Δ 6-deszaturáz és a Δ 5-deszaturáz kulcsfontosságú enzimek a többszörösen telítetlen zsírsavak, mint pl. az arachidon sav szintézisében is, mely a pro-inflammatórikus eikozanoidok prekursorául szolgál. Az itt említett gyulladási mediátorok, enzimek és fehérjék termelésén túl a faggyúmirigy különböző

neuroendokrin/neuromediátor folyamatba is integrálható a neuropeptideken és periglanduláris peptideken keresztül, melyek különböző idegrendszeri folyamatok révén fejtik ki (pato)fiziológiás hatásukat a bőrben.

A faggyúmirigy betegségekhez társuló kóros működése

Akné

Az akné, a pilosebaceus egység gyulladása, az egyik leggyakoribb bőrbetegség, mely egyes tanulmányok szerint a serdülők 90%-át érinti, de a tünetek közel 20%-ban felnőttkorban is megmaradnak. A betegség kialakulásában a megváltozott hormonális hatások szerepe megkérdőjelezhetetlen, magyarázatot adva arra, hogy az akné miért jellemzően a serdülőkor megbetegedése. Legfontosabb klinikai jellemzői a gyulladással járó comedók, papulák, pustulák és ciszták kialakulása a faggyúmirigyben gazdag bőrterületeken, jellemzően az arcon, mellkason és a háton. Szövettanilag a faggyúmirigy „szétrobbanása” jellemző, mely során jelentős gyulladással járó sejtinfiltrátum alakul ki és megemelkedik az IL-1 β és az IL-17A citokinek szintje. Számos hipotézis a *Propionibacterium acnes*-t (*P. acnes*) is kulcsfontosságúnak tekinti az akné kialakulásában. A legelfogadottabb elmélet szerint a pilosebaceus egység nyílásának elzáródása a keratinociták által és így a szébum kiürülésének megakadályozása, melyben a *P. acnes* mint a keratinociták osztódását és gyulladást befolyásoló stimulus lehet fontos az akné iniciációjában. Az akné kialakulásának hátterében álló okok között szerepel a faggyúmirigy megnövekedett szébum termelése valamint a szébum összetételének megváltozása. Az aknéval kapcsolatos vizsgálatok csökkent linolsav mennyiséget mutattak ki az érintett betegek bőrén, mely alapján jogos a feltételezés, hogy a linolsav közvetlenül részt vesz a faggyúmirigy lipid szintézisében, továbbá ez a csökkent linolsav mennyiség befolyásolhatja a szfingolipidek összetételét a folliculusokban. Számos tanulmány szignifikáns eltérést mutatott ki a telített és telítetlen zsírsavak arányában is. A

szébogenezisben és az akné kialakulásában a tünetek súlyosbodása és a megnövekedett szébum termelés mellett kiemelt szerepe van a zsírsavak deszaturációjának, melynek következtében megváltozik az egyszeresen telítetlen zsírsavak mennyisége és aránya. A gyulladáshoz vezető folyamatok és a comedók kialakulásában a lipid peroxidoknak is jelentős szerepet tulajdonítanak, mivel a gyulladáshoz vezető léziókban a lipidek peroxidációjának mértéke emelkedett a nem gyulladáshoz vezető léziókkal összehasonlítva. A peroxidálódott szkvalén miatt kialakult oxidatív „teher” hatására megnő a citotoxikusság és nagyobb eséllyel jelennek meg a comedók. A bőr a peroxidált szkvalén káros hatásainak kivédésére egy belső védelmi rendszert épített ki. A szébum által termelt E vitamin fontos antioxidáns szerepet tölt be a bőrben. Az aknés betegek szébumában a szkvalén peroxidok megnövekedett mennyisége valamint az E vitamin szint csökkenése figyelhető meg. A szébum lipid összetételében bekövetkező változáson kívül, az akné kialakulásában további faktorok is fontos szerepet kapnak. Ilyen faktorok pl. az androgének, ösztrogének, neuropeptidek és növekedési hormonok is.

A zsírszövet és a faggyúmirigy közötti hasonlóság

A faggyúmirigy működésének egyik központi és talán egyben legérdekesebb kérdése, hogy mennyire állítható párhuzamba a szintén elsődlegesen zsírsavanyagcserét folytató zsírsejtekkel, melyek hasonlóan képesek sejtszinten összekapcsolni a gyulladást a zsírsavanyagcserével. A párhuzam olyan, a zsírsejtek differenciálódásában kulcsfontosságú transzkripciós faktorok szintjén is megjelenik, mint a CCAAT/enhancer binding proteinek (c/EBP) és a Peroxisome Proliferator Activated Receptorok (PPAR). Humán bőrben, a szőrtüsző dermális és epitéliális sejtjeiben azonosították a c/EBP- α , - β , - δ -t, melyek közül különösen magas mennyiségben a c/EBP- β volt megfigyelhető a haj folliculusokban és a faggyúmirigyben. A PPAR-ok három izotípusát különböztetjük meg (α , β/δ , γ), melyek szintén megtalálhatóak a bőrben és a faggyúmirigyben egyaránt. Miután beigazolódott a c/EBP és PPAR transzkripciós faktorok

központi szerepe a faggyúsejtek differenciálódási és lipid termelési folyamataiban, további vizsgálatok számos más zsírsejt specifikus transzkripciós faktort azonosítottak úgy, mint pl. a Liver X Receptor (LXR), a sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) vagy a galectin-12.

Adipokinek

A fehér zsírszövet elsődleges feladata a felesleges tápanyag trigliceridek formájában történő raktározása. Működését tekintve egy rendkívül dinamikus szerv, mely az általa termelt és a keringésbe eljuttatott fehérjéken, az ún. adipokineken keresztül számos (pato)fiziológiai és metabolikus folyamat szabályozásában vesz részt mind a környező szövet, mind pedig a szervezet egésze szintjén. Az adipokinek családjába tartozó fehérjéket leggyakrabban az alábbi szempontok szerint csoportosítjuk: klasszikus citokinek, a vérnyomás és a lipid metabolizmus szabályozásában szerepet játszó fehérjék, az erek valamint a glükóz homeosztázisban fontos faktorok és kemoattraktáns tulajdonsággal bíró adipokinek.

A pro-inflammatórikus adipokinek celluláris és szisztémás hatása

IL-6

Az IL-6 az első olyan inflammatórikus mediátor volt, melyet a monociták, makrofágok, endotélsejtek, keratinociták és fibroblasztok mellett a faggyúsejtekben is azonosítottak gyulladásos stimulusok hatására a bőrben. Endokrin, parakrin és autokrin módon egyaránt részt vesz számos gyulladásos folyamat szabályozásában. Szérumban mérhető szintje nem csak a testtömeg növekedésével, de a plazma szabad zsírsav arányának megemelkedésével is párhuzamosan növekszik.

Leptin

A leptin a hipotalamuszon keresztül az étvágyat és az energia felhasználást képes szabályozni. Biológiailag aktív receptorán (Ob-Rb) keresztül olyan szignálútvonalak aktiválódásáért felelős, mint a signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) és a nukleáris faktor kappa-B (NF- κ B). Ez a jelátviteli kaszkád felelős például a monocita/makrofágokban a leptin hatására bekövetkező pro-inflammatórikus citokinek (TNF- α , IL-6, IL-12) termelődésének fokozásáért. A vérben lévő leptin kulcsszerepet tölt be a zsíryanycsere és a gyulladás összekapcsolásában, mennyisége pozitív korrelációt mutat a BMI-vel és az adipociták méretével egyaránt.

Resistin

Jelen tudásunk szerint úgy tűnik, hogy a legjelentősebb resistin forrásnak a monociták és a makrofágok számítanak, mely sejtekben számos gyulladáscitokin (IL-6, IL-1 β , TNF- α) képes az expresszióját indukálni. A resistin deficiens *ob/ob* egér az extrém mértékű obezitás mellett károsodott glükóz toleranciával és inzulin érzékenységgel is jellemezhető.

Plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1; serpin E1)

A serpin E1 termelődése a zsírszövet mellett az endotélsejtekben is jelentős mennyiségben megfigyelhető, ahol fontos szerepet játszik a vaszkuláris homeosztázis fenntartásában, azáltal, hogy gátolja a plazminogén aktivitását, befolyásolva a véralkodási kaszkádot. A serpin E1 megemelkedett szintje figyelhető meg a sebgyógyulásban valamint a különböző tumorok (pl. melanoma) esetében is.

Visfatin

A visfatin részt vesz a metabolikus folyamatok szabályozásában, mint pl. a nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) bioszintézis, vagy a hasnyálmirigy β -sejtjeinek inzulin szekréciója. Továbbá a visfatin az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló gyulladáshoz kapcsolódó mediátor az atherosclerotikus leziók ún. „habos” sejtjeiben.

Apelin

Az apelin fontos szerepet tölt be a vérnyomás, az angiogenezis és a folyadék homeosztázis szabályozásában. Termelődése szoros kapcsolatban áll a gyulladással, legfőbb stimulusa a TNF- α , aminek hatására expressziója jelentősen fokozódik a zsírszövetben.

Chemerin (tazaratone-induced gene 2; retinoic acid receptor responder 2 [RARRES2])

A chemerin kemoattraktáns tulajdonságának köszönhetően a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokat szabályozza azáltal, hogy elősegíti az immunsejteknek a gyulladás helyszínére történő vándorlását. A szérumban lévő chemerin szintje pozitív korrelációt mutat a BMI-vel, az éhgyomri vércukorral, a triacilglicerolok és a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek mennyiségével.

Retinol-kötő fehérje 4 (RBP4)

A májsejtek által termelt RBP4-et, mely a retinol (A vitamin) keringésben való szállításáért felelős, a hepatocitákon kívül az adipociták és a makrofágok is képesek termelni. Az emelkedett RBP4 szintje a szérumban olyan betegségekkel hozható összefüggésbe, mint a metabolikus szindróma, a magas vérnyomás, a koleszterin és a trigliceridek emelkedett mennyisége valamint a megnövekedett BMI.

Monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1)

Az MCP-1 talán az egyik legfontosabb adipokin a zsírszövet gyulladáshoz vezető környezetének kialakításában, ugyanis az immunsejtek zsírszövetbe történő infiltrációjáért, ezáltal a zsírszövet gyulladáshoz vezető folyamatainak elindításáért felel. Nem csak a zsírszövet, de számos immun-, kötőszöveti vagy éppen malignusan transzformált sejt is képes termelni nem ritkán akár alapállapotban is.

Az anti-inflammatorikus adiponektin celluláris és szisztémás hatása

Az adiponektin anti-inflammatorikus hatását számos adat támasztja alá, egyfajta „védelmi faktor” pozícióba helyezve, melynek szintjét a pro-inflammatorikus fehérjék illetve a hipoxia egyaránt képes csökkenteni. Jelenlétében az NF- κ B útvonal valamint a TNF- α indukált változások gátlódnak, makrofágokban csökkenti a lipopoliszacharid (LPS) indukció hatására történő interferon- γ (IFN- γ) szekréciót is, miközben fokozza az anti-inflammatorikus citokinek (IL-10 és IL-1 receptor antagonistá) termelődését.

Adipokinek szerepe a bőrben

Habár az adipokinek elsődleges mediátorai a különböző, zsírszövet által indukált és szabályozott gyulladáshoz vezető betegségeknek, az elmúlt évek kutatásai számos bőrgyógyászati megbetegedés esetében találtak összefüggést mind a betegség megjelenése mind pedig súlyossága és a keringésben lévő adipokinek szintje között. A pikkelysömörben szenvedő betegek szérumában mérhető adipokinek változó szintje az egyik legfontosabb példa, melyet emelkedett TNF- α , IL-6, leptin és resistin szintek mellett az adiponektin csökkent szintje jellemez, korrelációt mutatva a tünetek súlyosságával. Szöveti vizsgálatok súlyos pikkelysömörös betegek bőrében nem csak a leptin, de a leptin receptor valamint az IL-6 emelkedett mennyiségét is kimutatták.

A fokozott bőrszárazsággal járó atópiás dermatitisben szenvedő betegek esetében az emelkedett leptin szérumszint mellett a resistin és az apelin magasabb szintje volt megfigyelhető, míg a visfatin szérumszintje csökkent volt az egészségesekéhez képest.

Az adipokinek vizsgálata aknés betegekben is az érdeklődés középpontjába került, bár az eddigi eredmények a vizsgálatok alacsony betegszáma és esetenként a nem megfelelően megtervezett vizsgálatok miatt is csak korlátozottan értékelhetők. A leptin esetében bizonyos kutatások emelkedett szintet találtak, míg mások csökkent leptin szintet mértek, megint más kutatások pedig nem találtak változást.

A sebgyógyulás és hajnövekedés szempontjából is kiemelt figyelmet élveznek az adipokinek, mely során az immunhisztokémiai vizsgálatok a leptin és a leptin receptor fokozott expresszióját mutatták ki károsodott szövetben.

Az itt felsorolt adatok ellenére igen kevés eredmény és információ áll rendelkezésünkre arról, hogy az adipokinek milyen szerepet tölthetnek be a bőrben, különösen a faggyúmirigy-biológia szemszögéből. Munkacsoportunk ezért célul tűzte ki, hogy azonosítja a faggyúmirigy adipokin profilját, felvetve azt a kérdést, hogy a faggyúmirigy részt vehet-e a bőr gyulladásos folyamatainak kialakításában és szabályozásában az adipokineken keresztül.

CÉLKITÚZÉS

A faggyúmirigy, az intenzív zsíryanycsere mellett, különböző gyulladásoo folyamatok szabályozásában is részt vesz, mely kettős funkció nagyban hasonlít a zsírsejtek esetében megismertekhez, ahol a sejtek a zsír metabolizmuson kívül, a környezeti stimulusokra adott válaszként számos, gyulladásoo mediátort is képesek termelni.

A faggyúmirigy és a zsírszövet közötti hasonlóságokból kiindulva, munkánk során célul tűztük ki:

1. a faggyúmirigy adipokin profiljának meghatározását normál bőrben, aknéban, rosaceában, melanomában és psoriasisban;
2. az *in vivo* azonosított adipokinek meghatározását *in vitro* immortalizált SZ95 faggyúsejtvonalban;
3. az adipokinek expressziós és szekréciós profiljának meghatározását TLR1/2 és TLR4 aktivátorok (PAM3CSK4 és LPS) valamint 13-*cis* retinsav hatására;
4. a biológiailag aktív, hosszú izoformájú leptin receptor (Ob-Rb) detektálását SZ95 faggyúsejtekben;
5. valamint a leptinnek a faggyúsejtek zsírtermelésére és gyulladásoo folyamatira gyakorolt hatását.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Szöveti minták

Az immunhisztokémiai festéshez a Debreceni Egyetem Klinikai Központ (DE KK) Bőrgyógyászati Klinika Szöveti Laboratóriumából származó anonim, fagyasztott illetve formalin fixált és paraffinba ágyazott mintáit használtuk. Minden betegségcsoport esetében (normál bőr, akné, rosacea, melanoma, psoriasis) legalább három különböző betegből származó mintával dolgoztunk.

SZ95 faggyúsejtek tenyésztése és kezelése

A humán immortalizált SZ95 faggyúsejteket 37°C-os termosztátban, 5% (v/v) CO₂ és nedves páratartalom mellett, 10% fetal bovin szérummal (FBS, Biowest), 1mM CaCl₂-dal, 1% penicillin/streptomycinnel (Sigma-Aldrich) és 5 ng/ml epidermális növekedési faktorról ([EGF], Sigma-Aldrich) kiegészített Sebomed Basal Médiumban® (Biochrom) tenyésztettük. A kezelésekhöz 1 µg/ml LPS (TLR4 útvonal aktivátor; Sigma-Aldrich), 1 µg/ml PAM3CSK4-et (TLR1/2 aktivátor; InVivoGen), 1 µM 13-*cis* retinsavat ([13CRA]; német kollaborációs partnerünk biztosította; BASF AG, Ludwigshafen, Németország) és 20 nM humán rekombináns leptint (R&D Systems) használtunk.

Proliferáció mérés

Az SZ95 sejteket 1 µM 13CRA-val valamint az ennek megfelelő mennyiségű DMSO oldószerrel kezeltük. A kezelést követő 6. napon a sejtek proliferációjának meghatározására 100 µl 100 µg/ml koncentrációjú 4-metilumbelliferil heptonát (MUH) reagenst adtunk minden mintához. A fluoreszcenciát 355 nm excitációs és 480 nm emissziós filtereket használva határoztuk meg (Synergy H1 microplate reader, BioTek).

Immunhisztokémia

A fagyasztott metszeteket 10 percig fixáltuk jéghideg acetonban. A paraffinba ágyazott metszeteket deparaffináltuk majd rehidratáltuk és az endogén peroxidázok gátlására 3% H₂O₂ oldatot használtunk. Az antigén feltárást Tris-EDTA pufferben végeztük, a nem specifikus kötőhelyek blokkolása pedig 5% borjú szérum albumin (BSA) oldatban történt. Az immunhisztokémiai módszer során az alábbi antitesteket használtuk: anti-leptin receptor (Ob-Rb; Abbiotec), anti-adiponektin, anti-chemerin, anti-resistin, anti-visfatin (Santa Cruz Biotechnology), anti-leptin, anti-IL-6 (LifeSpan BioSciences), anti-apelin, anti-MCP-1 (Abcam), anti-RBP4 és anti-serpin E1 (Thermo Fisher Scientific). A torna-peroxidáz konjugált szekunder antitestek után (SuperSensitive One-step Polymer-HRP Detection Systems, BioGenex) az immunreakciót Vector VIP Kit (Vector Labs.) segítségével tettük láthatóvá. A sejtmagokat metil zölddel festettük meg, a minták analízisére pedig Leica DM2000 LED mikroszkópot használtunk (Leica Microsystems).

Immuncitokémia

Az SZ95 sejteket Superfrost Ultra Plus tárgylemezeken (Thermo Fisher Scientific) tenyésztettük, majd a lemezeket 1% ecetsav 96% etanol oldatban fixáltuk. A nem specifikus kötőhelyek blokkolására 5% normál humán szérumot használtunk. Az immuncitokémiai módszer során az alábbi antitesteket használtuk: anti-leptin receptor (Ob-Rb; Abbiotec), anti-adiponektin, anti-chemerin, anti-resistin, anti-visfatin (Santa Cruz Biotechnology), anti-leptin, anti-IL-6 (LifeSpan BioSciences), anti-apelin, anti-MCP-1 (Abcam), anti-RBP4 és anti-serpin E1 (Thermo Fisher Scientific). Kecské anti-nyúl IgG Alexa Fluor 555 (Molecular Probes, Eugene), kecské anti-nyúl IgG Dylight 549 és ló anti-egér IgG Dylight 549 szekunder antitestekkel történő inkubáció után a lemezeket Vectashield DAPI fedő médiummal (Vector

Labs.) fedtük le. A lemezeket Plan-apochromat 63X/1.40 objektívvel felszerelt, konfokális lézer pásztázó mikroszkóphoz (Zeiss) kapcsolt CCD IMAC kamerával (Sony) analizáltuk.

Lipid analízis

Az SZ95 sejteket 12 és 36 órás leptin kezelést követően begyűjtöttük, a lipid analízist nagy teljesítményű vékonyréteg kromatográfia (HPTLC), gáz-kromatográfia-tömegspektroszkópia (GC-MS) és tömegspektroszkóphoz kapcsolt, nagy teljesítményű folyadék kromatográfia (HPLC-ToF/MS) módszerekkel végeztük római San Gallicano Institute of Dermatology munkatársaival együttműködve. Az álló fázis HPTLC szilika gél 60 (Merck) volt, melyre minden mintából 20 µl-nyi koncentrált lipid extraktum került. Az elválasztás eléréséhez a HPTLC lemezeken két egymást követő eluálási módszert alkalmaztunk. A lemezek inkubálása a szürke-fekete foltok megjelenéséig tartott. A foltok intenzitásának meghatározása denzitometriás mérésekkel történt. Az E vitamin, koleszterin és szkvalén szinteket GC-MS módszer segítségével határoztuk meg (Agilent Technologies). Az E vitaminból, CH-ből és SQ-ből származékokat képeztünk bisz(trimetil-szilil)-trifluor-acetamid (BSTFA) felhasználásával és a vegyületek a gázfázisban egy RTX-5MS Crossbond® 5% difenil/95% dimetil-polisziloxán (Restek Corporation) oszlopon lettek elválasztva. Az adott célmolekula detektálása egyedi bázis és minősítő tömegcsúcsai alapján történt. A szabad zsírsavak mennyiségi analízise HPLC-ToF/MS módszerrel (Agilent Technologies) történt, melyet egy reverz fázisú HPLC (RP-HPLC) kromatográfias elválasztás követett. Az elúció bináris rendszer segítségével zajlott: A, víz-0,1% hangyasav-3% acetonitril illetve B: acetonitril-3% izopropil-alkohol felhasználásával. A vegyületek elektropray ionforrással (ESI) felhasználásával ionizálódtak és az azonosításuk a 80 - 400 tömegtartományban történt. Az extrahált ion kromatogramok az [M-H]⁻ ionok pontos tömegének a célvegyületekből és a belső standardból (d4-LA) történő kivonásával kerültek kiszámításra.

Lipid cseppek detektálása és kvantifikálása

A lipid cseppek azonosítását 4,4-difluor-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacén 493/503 fluoreszcens lipid festékekkel ([BODIPY]; Life Technologies) végeztük. Az SZ95 sejteket LabTek tárgylemezeken (Thermo Fisher Scientific) tenyésztettük, majd humán rekombináns leptinnel kezeltük. A sejteket 4%-os paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk, majd 10 µg/ml BODIPY festékekkel inkubáltuk. A lemezeket Vectashield DAPI fedőmédiummal (Vector Labs.) fedtük le és Plan-apochromat 63X/1.40 objektívvel felszerelt, konfokális lézer pásztázó mikroszkóphoz (Zeiss) kapcsolt CCD IMAC kamerával (Sony) analizáltuk.

Western blot

A leptin kezelést követően a sejteket begyűjtöttük és proteáz/foszfátáz inhibitorral kiegészített RIPA pufferben (Sigma Aldrich) lizáltuk. A megfelelő poliakrilamid gélt kiválasztva minden mintából egységesen 20 µg-nyi mennyiséget futtattunk meg. A nitrocellulóz membránra (Bio-Rad) történő blottolás után a membrán blokkolása történt. A Western blot során az alábbi antitesteket használtuk: anti-leptin receptor (Abbiotec), anti-cikloxigenáz-2 (COX-2), anti-5-lipoxigenáz (5-LOX), anti-foszfo-STAT3 (Tyr705), anti-foszfo-NF-κB p65 (Ser536) és anti-β-aktin (Cell Signalling). A megfelelő torna-peroxidáz konjugált szekunder antitesttel (Bio-Rad) történő inkubációt követően a létrejött antigén-antitest reakciót az Immobilon Western HRP Substrate Kit (Millipore, Bedford, MA, USA) segítségével tettük láthatóvá.

mRNS szintek meghatározása

Az SZ95 faggyúsejtekből TRI reagens (MRC) felhasználásával totál RNS-t izoláltunk, a mennyiségi és minőségi meghatározást pedig NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztünk. A kvantitatív valós idejű PCR-hoz (*qRT-PCR*) a totál RNS-ből cDNS átírást végeztünk Superscript II reverz transzkriptáz és random primerek (Life Technologies)

felhasználásával. A qPCR-t valós idejű PCR (QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR; Applied Biosystems) alkalmazásával végeztük, melyhez specifikus primereket és TaqMan próbákat (Applied Biosystems) használtunk. A transzkriptumok kvantifikálását az „összehasonlító Ct módszer” alapján készítettük el, a kapott adatokat Peptidilprolil Izomeráz A (Cyclophilin A [PPIA]) normalizáltuk. A PPIA expressziós szintek nem mutattak varianciát a kezelések között.

Az *RNS szekvenáláshoz (RNS-Seq)* és könyvtárkészítéshez 1 µg totál RNS-ből cDNS-t generáltunk a TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina) segítségével. A poli-A végű RNS-eket oligodT -konjugált mágneses gyöngyökkel kitisztítottuk, fragmentáltuk, majd egyszálú cDNS-t képeztünk random primerek és SuperScript II reverz transzkriptáz használatával. Ezt követően kétszálú cDNS-t szintetizáltunk, a dupla szálú cDNS véget javítottuk és a 3' végeket adeniláltuk. Illumina index adaptereket ligáltunk a mintákhoz. Az adapter ligált cDNS fragmenteket PCR segítségével sokszorosítottuk. A fragment méret eloszlásokat és a molaritást Agilent BioAnalyzer DNA1000 chip (Agilent Technologies) készülékkel ellenőriztük. Az RNS-Seq könyvtárakat 10 nM-ra hígítottuk és 5-5 könyvtárból ekvimolárisan könyvtár mixet készítettünk. A szekvenálást Illumina HiScan SQ készüléken (Illumina) végeztük. Minden egyes könyvtár az ún. szekvenálási flow cell-en külön külön csatornában került szekvenálásra 16-18 millió szekvencia olvasat keletkezett egyedi mintánként.

RNS-Seq adatok elemzése

A minőségellenőrzési és demultiplexelési folyamatokhoz CASAVA szoftvert (Illumina) használtunk. A megszekvenált adatokat a humán genom 19-es verziójára illesztettük TopHat algoritmus segítségével és bam fájlkat generáltunk. További statisztikai elemzéseket a

GeneSpring 12.6 szoftver (Agilent Technologies) NGS moduljának használatával végeztünk. A relatív mRNS expressziós szinteket DESeq algoritmus alkalmazásával számoltuk ki.

ELISA (Enzim-kapcsolt immunoszorbens assay)

Az SZ95 sejtek lizálását desztillált vízben 0,1% Triton-X jelenlétében végeztük. Az adiponektin felülúszóban való mennyiségének meghatározására ELISA Development Kitet és Quantikine ELISA Kitet (R&D Systems) használtunk. Az IL-6, IL-8, leptin, serpin E1 és resistin mennyiségét ELISA Development Kit (R&D Systems), míg a visfatin szintjét ELISA Assay Kit (Biovision) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően határoztuk meg.

Statisztikai analízis

A vizsgált változókra vonatkozó deskriptív analízist átlag \pm szórás segítségével reprezentáltuk. Az ELISA mérések során kapott eredményeket független t-próba, illetve egytényezős varianciaanalízis (ANOVA) és Tukey post-hoc teszt segítségével elemeztük. A qRT-PCR és proliferációs assay vizsgálatok esetében párosított t-próbát alkalmaztunk, míg az RNS-Seq esetében független t-próbát használtunk az értékek analizálása során.

EREDMÉNYEK

Az adipokinek jellegzetes expressziója figyelhető meg in vivo humán faggyúmirigyben

Munkánk első lépéseként arra kerestük a választ, hogy mely adipokinek fejeződnek ki fiziológias körülmények között a faggyúmirigyekben. Immunhisztokémiai vizsgálatainkkal fagyasztott, normál humán bőrmintán azonosítottuk a pro-inflammatórikus IL-6, resistin, leptin, serpin E1, visfatin és az anti-inflammatórikus adiponektin jelenlétét a faggyúmirigyben, míg az apelin, chemerin, RBP4 és MCP-1 esetében nem figyeltünk meg pozitívítást. Az azonosított expressziós mintázat különböző patológias körülmények (akné, rosacea, melanoma és psoriasis) között sem változott. Ezen eredmények a faggyúmirigy karakterisztikus adipokin profilját igazolták, melyet függetlennek találtunk a vizsgált patológiai kondícióktól.

Az adipokinek expressziós profilja in vitro humán SZ95 faggyúsejtekben

További, *in vitro* munkánkhoz az SZ95 faggyúsejtvonalat választottuk. Az SZ95 faggyúsejtekben is sikerült a szövettani vizsgálatok során detektált adipokinek (adiponektin, IL-6, resistin, leptin, serpin E1 és visfatin) kifejeződését azonosítanunk immunfluoreszcens festéssel valamint a faggyúsejtek lizátumát használva ELISA módszerrel. Az immunfluoreszcens festéssel az adipokinek sejten belüli lokalizációját is tudtuk detektálni. Míg az adiponektin, IL-6, resistin, serpin E1 és visfatin a citoplazmában és a sejtmagban is detektálható volt, addig a leptin elsősorban a citoplazmában volt jelen.

Az SZ95 faggyúsejtek eltérően szekretálják a különböző adipokineket

A továbbiakban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a faggyúsejtek képesek lehetnek-e nem csak az adipokinek termelésére, de azok felszabadítására is. ELISA módszerrel azt találtuk, hogy a kezeletlen SZ95 faggyúsejtek felülúszójában az IL-6, leptin, serpin E1 és

visfatin egyaránt megtalálható volt, viszont sem a resistin, sem pedig az adiponektin nem volt detektálható.

Az adipokinek expressziója és szekréciója eltérő módon változik különböző stimulusok hatására

További kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy az adipokinek expressziója és szekréciója indukálható és/vagy szabályozható-e különböző gyulladásos stimulusokkal. A TLR1/2 (PAM3CSK4) és a TLR4 (LPS) útvonalak aktiválása mellett, 13CRA kezelést is végeztünk a sejteken, mely jelenleg a bőrgyógyászatban az egyik leggyakrabban használt anti-akné ágens. A TLR aktivátorok hatására mRNS szinten indukálódott a leptin, serpin E1 és a visfatin, valamint az IL-6. A gyulladásos citokinek emelkedése mellett ugyanakkor az anti-inflammatorikus adiponektin mRNS szintje nemcsak a TLR1/2 aktivátor hatására, de 13CRA kezelésre is csökkenést mutatott. A vizsgált adipokinek lehetséges felszabadulásának meghatározását ELISA mérésekkel végeztük, mely során a leptin, serpin E1, visfatin és az IL-6 felülűszóban mért mennyisége emelkedést mutatott a TLR aktivátorok hatására. A resistinnek ugyanakkor nem csak az mRNS mennyisége, de a szekréciója sem volt indukálható egyik alkalmazott stimulus hatására sem. Ezen eredmények megerősítik azt a feltevést, hogy a faggyúsejtek a különböző stimulusok hatására eltérő módon képesek az egyes adipokinek expressziójára és felszabadítására.

A funkcionálisan aktív leptin receptor (Ob-Rb) expressziója megfigyelhető in vivo humán faggyúmirigyben és in vitro SZ95 sejtvonalban egyaránt

Mivel a kísérletek során alkalmazott TLR1/2 és 4 aktivátorok, valamint a 13CRA kezelés hatására mind gén mind pedig fehérje szinten a leptin esetében tapasztaltunk egyértelmű indukciót, ezért felvetődött a leptin kulcsszerepe a faggyúbiológiában. A leptin, biológiai

hatását a funkcionálisan aktív, hosszú izoformájú receptorán (Ob-Rb) keresztül fejtí ki. Immunhisztokémiai festéssel azonosítottuk az Ob-Rb jelenlétét normál humán és aknés bőr minták faggyúmirigyében, mely eredményt *in vitro* vizsgálatainkkal SZ95 faggyúsejtekben is megerősítettük.

Az SZ95 faggyúsejtek zsírtermelése megváltozik leptin kezelés hatására

A továbbiakban a leptinnek a faggyúsejtek lipid termelésére gyakorolt korai illetve késői hatását kívántuk vizsgálni 12 és 36 órás időpontokban. A faggyúsejtek által termelt legfőbb lipidek, mint a szkvalén (SQ), koleszterin (CH), triglicerid (TG), szabad zsírsav (FFA) valamint E vitamin szintjének meghatározását a római San Gallicano Institute of Dermatology munkatársaival együttműködve végeztük nagy teljesítményű vékonyréteg kromatográfia (HPTLC), gáz-kromatográfia-tömegspektroszkópia (GC-MS) és tömegspektroszkóphoz kapcsolt, nagy teljesítményű folyadék kromatográfia (HPLC-ToF/MS) módszerekkel. A denzitometriás analízis illetve a HPTLC módszerrel kapott eredmények a TG szint szignifikáns emelkedését igazolták a 36 órás leptin kezelést követően. Az SQ és a CH esetében további GC-MS vizsgálatok történtek, mely mérésekben a SQ szintje nem változott a kezelési idő előrehaladtával a kontroll faggyúsejtekben, viszont a leptin kezelés hatására mennyisége szignifikánsan növekedett, továbbá a CH szintjének szignifikáns növekedése időfüggést mutatott mind a kontroll mind pedig a leptin kezelt sejtekben. A szabad zsírsavak és a trigliceridek csoportjához tartozó lipid alosztályok vizsgálatához, a minták HPLC-ToF/MS és GC-MS analízise történt. Az egyszeresen telítetlen zsírsavak/telített zsírsavak (MUFA/SFA) arányában a 36 órás kontroll és leptin kezelt sejteknél jelentős eltérés volt mérhető, míg a többszörösen telítetlen zsírsavak/telített zsírsavak (PUFA/SFA) esetében szignifikáns növekedést találtunk a 12 órás leptin kezelést követően. További zsíranalízisünk során az E vitamin szintjének szignifikáns csökkenését találtuk 12 és 36 órás leptin kezelés

hatására. A lipidanalízis eredménye arra utal, hogy a leptin egyrészt egy korai hatással bír a faggyúsejtekre, amikor a zsírsavak deszaturációját okozza, míg késői hatása a trigliceridek szintézisének fokozódását eredményezi. A leptin hatása továbbá összekapcsolható az E vitamin szint csökkenésével is a faggyúban.

A lipidtestek mérete megnövekedett a leptin kezelt SZ95 faggyúsejtekben

A faggyúsejtek, az általuk szintetizált és metabolizált intracelluláris lipideket hidrofób organellekben, ún. lipid testekben tárolják. A leptin hatására a lipid testek képződésében bekövetkező változások detektálásához a BODIPY zsírfestéket alkalmaztuk, majd a sejteket konfokális fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a leptin kezelést követően megnövekedett a lipid cseppeknek a száma a kezeletlen sejtekhez képest. A BODIPY festék fluoreszcens tulajdonsága a minták áramlási citometriával való analízisét is lehetővé tette, mely szintén megerősítette a leptin, lipid test indukáló hatását.

Leptin hatására fokozódik a COX-2 és az 5-LOX enzimek valamint a gyulladásoos citokinek expressziója SZ95 faggyúsejtekben

A leptin, gyulladásoos folyamatokban betöltött szerepének tanulmányozása érdekében elsőként olyan fehérjék expressziójának változását vizsgáltuk, mint a COX-2 és az 5-LOX, melyek a faggyúsejtek esetében is központi szerepet töltenek be a gyulladásoos mediátorok termelésében. Western blot technikával azonosítottuk a leptin kezelés hatására bekövetkező COX-2 és 5-LOX enzimek fokozott expresszióját SZ95 faggyúsejtekben. Ezek után olyan citokinek expresszióját vizsgáltuk, mint az IL-6 és az IL-8, melyek a faggyúsejtek gyulladásoos folyamatainak szabályozásában fontos szerepet töltenek be. Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy leptin kezelés hatására az IL-6 és az IL-8 citokinek expressziója fokozódik mRNS és fehérje szinten egyaránt.

A leptin aktiválja a STAT3 és az NF- κ B útvonalakat SZ95 faggyúsejtekben

A leptin, receptorához kötődve a STAT3 és az NF- κ B útvonalak foszforilálódását, ezáltal aktiválódását eredményezi számos sejtípusban. Ezen gyulladássos jelátvitel faggyúsejtben való meglétének igazolására Western blot technikával vizsgáltuk a STAT3 és az NF- κ B útvonalakat. A leptin kezelést követően mindkét útvonalat aktívnak találtuk SZ95 faggyúsejtekben.

MEGBESZÉLÉS

A faggyúmirigy, a hajfollikulusokkal együtt, a pilosebaceous egység alkotója, melynek fő feladata a szébum termelés. Az elmúlt évek kutatásai rávilágítottak arra, hogy a faggyúsejtek az intenzív lipid metabolizmuson kívül az általuk termelt pro-inflammatórikus citokineken és kemokineken keresztül nemcsak a bőrben zajló gyulladásos folyamatokat képesek befolyásolni, de képesek a lipid metabolizmus és a gyulladásos folyamatok sejtszintű összekapcsolására is. Ez a funkció nagyban hasonlít a zsírsejtek esetében megfigyeltekhez, ahol a sejtek az általuk termelt ún. adipokineken keresztül különböző krónikus gyulladásos folyamatok szabályozásában vesznek részt. Mivel a bőrben eddig csak a keratinocitákat és a fibroblasztokat azonosították olyan sejtípusokként, melyek korlátozottan, de képesek adipokineket termelni, ezért munkánk során célul tűztük ki az adipokinek expressziós profiljának meghatározását a faggyúmirigyben. Első lépésként megállapítottuk, hogy az adiponektin, IL-6, resistin, leptin, serpin E1 és visfatin jelen van a normál humán bőr faggyúmirigyében csakúgy, mint különböző patológiás körülmények között (akné, rosacea, melanoma, psoriasis), míg az apelin, chemerin, RBP4 és MCP-1 expressziója nem volt megfigyelhető egyik esetben sem. Tekintve, hogy az adipokinek megjelenése független volt a vizsgált bőrgyógyászati betegségektől, feltételezhető, hogy (pato)fiziológiás szerepük a termelődésüket, szekréciójukat befolyásoló különböző mechanizmusokhoz köthető. Annak érdekében, hogy ezeket a folyamatokat vizsgálni tudjuk, kutatásainkat az SZ95 immortalizált humán faggyúsejtvonalon folytattuk tovább. Az *in vitro* végzett vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy az SZ95 faggyúsejtek eltérő mennyiségben expresszálják és szekretálják az adipokineket, mely különböző stimulusok hatására eltérően, de indukálható. A citoplazmában és a sejtmagban történő felhalmozódásuk pedig arra enged következtetni, hogy a sejten belül további funkciókkal is bírhatnak. TLR1/2 és 4 aktivátorokat használva nemcsak az IL-6, de a leptin, serpin E1 és a visfatin esetében is indukciót figyeltünk meg mind

génexpressziós, mind pedig fehérje szinten. A TLR1/2 és 4 aktivátorokon kívül, a 13CRA hatását is vizsgáltuk, mely a bőrgyógyászatban az egyik legelterjedtebben használt anti-akné szer. Mivel fehérje szinten a leptin termelésének, gén szinten pedig az adiponektin mRNS expressziójának indukcióján kívül egyik adipokin esetében sem figyeltünk meg változást 13CRA hatására, így feltételezhetően a 13CRA elsősorban a differenciáció/metabolizmus folyamatok szabályozásában vesz részt a humán faggyúsejtekben csakúgy, mint ahogy azt a patkány zsírszövetében megfigyelték.

Vizsgálataink egyik érdekes eredménye, hogy a visfatin nemcsak rendkívül magas mennyiségben expresszálódott és szekretálódott a faggyúsejtek esetében, de mennyisége további indukciót mutatott az alkalmazott TLR aktivátorok hatására. A visfatinnak feltételezhetően nemcsak a cukorbetegségben és a metabolikus szindrómában van gyulladáso szerepe, de igen jelentős mértékben fejeződik ki a meszes érre jellemző ún. zsírmakrofágokban is. Ami a visfatin bőrben betöltött szerepét illeti, elősegítheti a psoriasis kialakulását azáltal, hogy fokozza az antimikrobiális peptidok termelését a humán keratinocitákban. A visfatin rendkívül nagy mennyiségben történő termelése a faggyúsejtek által jól példázza a faggyúmirigy pro-inflammatórikus tulajdonságát, így vizsgálata mindenképpen érdekes kutatások tárgyát képezheti a jövőben.

A serpin E1 a zsírszövet, valamint az endotélium által nagy mennyiségben termelt adipokin, mely egyfajta összekötő „kapocs” lehet az obezitás és a betegséghez társuló megnövekedett trombozusra való hajlam között. A bőrben betöltött szerepét illetően a melanoma esetében, mint rossz prognosztikai markert azonosították, ugyanis a szöveti mátrix átépülésén keresztül részt vehet a malignusan transzformált sejtek inváziójában és a metasztázis képződés szabályozásában. Mivel a serpin E1 a faggyúmirigyben is expresszálódik feltételezhetjük, hogy a faggyúmirigy is ezen adipokin segítségével potenciálisan hozzájárulhat az extracelluláris mátrix „remodelling” szabályozásához.

Az adiponektin jelen ismereteink szerint a legelfogadottabb anti-inflammatórikus adipokin, gátolja az IL-6 szekrécióját, továbbá olyan anti-inflammatórikus citokinek termelődését segíti elő, mint az IL-10 és az IL-1 receptor antagonisták. Vizsgálataink, mely az adiponektint a humán faggyúmirigyben is azonosította, kulcsfontosságúak, tekintve hogy a humán dermiszben lejátszódó gyulladási folyamatok szabályozásában a faggyúmirigy ezáltal nem csak pro-, de akár anti-inflammatórikus módon is részt tud venni.

Mivel a kísérletek során alkalmazott TLR1/2 és 4 aktivátorok, valamint a 13CRA kezelés hatására a fent említett adipokinek közül mind gén mind pedig fehérje szinten a leptin esetében tapasztaltunk egyértelmű indukciót, felvetődött a leptin kulcsszerepe a faggyúbiológiában. Ezért további kutatásunk céljaul tűztük ki annak a kérdésnek a megválaszolását, hogy a leptin a faggyúsejtekre is hatással lehet-e. A leptin étvágyat befolyásoló hatását a hipotalamuszban található leptin receptoron keresztül fejt ki, szérumban megfigyelhető szintje pedig pozitív korrelációt mutat a BMI-vel. A leptin az energiaháztartás szabályozásán túl olyan sejtek immunválaszát is szabályozza, mint a zsírsejtek, makrofágok, dendritikus sejtek, T- és B-sejtek, természetes ölü sejtek, porcsejtek, fibroblasztok és keratinociták. Mivel a leptin sejt szinten igen komplex szerepet tölt be a zsírcsere és a gyulladási folyamatának szabályozásában, feltételezhető, hogy a leptin által indukált szignál folyamatok beilleszthetők a faggyúsejtben lejátszódó biológiai folyamatokba is. Az általunk vizsgált normál és aknés bőr faggyúmirigyében egyaránt kifejeződik a leptin, funkcionálisan aktív receptora (Ob-Rb), jelezve hogy kondíciótól függetlenül képes lehet a faggyúsejt válaszolni a leptinre. Annak érdekében, hogy meghatározzuk hogyan képes a faggyúsejtben a leptin a gyulladást és a zsírcsere befolyásolni, elsőként megerősítettük az Ob-Rb jelenlétét SZ95 faggyúsejtben is, majd átfogó analízist végeztünk, mely során a pro-inflammatórikus szignálút vonalakat, a lipid test képződést, továbbá a lipid profil változását vizsgáltuk. A leptin, receptorához kötődve olyan út vonalakat aktiválódásáért felelős, mint a

STAT3 és az NF- κ B. Kísérleteink során ezen szignál útvonalak aktiválódását figyeltük meg leptin kezelés hatására és elsőként mutattuk ki, hogy az SZ95 faggyúsejtekben aktiválható a STAT3 útvonal, rávilágítva ezzel a humán faggyúsejtek komplexitására. A lipid test képződés az intenzív zsíryanycserét folytató sejtekre jellemző, mely során a sejt az általa termelt lipideket hidrofób organelumokba „zárja”. BODIPY fluoreszcens festék segítségével kimutattuk, hogy leptin kezelés hatására megnő a lipid testek mérete SZ95 faggyúsejtekben. Ehhez hasonló jelenség tapasztalható leptin hatására a makrofágok esetében is, igazolva, hogy a leptin számos sejttípusban képes befolyásolni a zsírmetabolizmust és az intracelluláris lipid raktárak kialakulását. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a leptin kezelés hatására kialakult nagy méretű lipid testek a fokozott szekréció markereként szolgálhatnak. Annak érdekében, hogy megértsük mi is pontosan ezeknek a lipid testeknek a funkciója és kialakulásuk hátterében milyen mechanizmusok állnak, további kutatások szükségesek. További vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, vajon képes-e a leptin megváltoztatni a faggyúsejt által termelt zsír összetételét. Választ keresve a leptin esetleges szerepére a faggyú összetételének befolyásolásában, további lipid analízist végeztünk, meghatározva azoknak a zsíroknak a szintjét, melyek leginkább jellemzőek a humán faggyúra. Az eredményeink egyértelműen a leptin hatását igazolták: a kezelés következtében az SZ95 faggyúsejtekben különböző egyszeresen és többszörösen telítetlen zsírsavak halmozódtak fel, mely magyarázattal szolgálhat a megemelkedett triglicerid szintekre, valamint a nagyobb méretű lipid testek kialakulására egyaránt. Eredményeink biológiai relevanciájának interpretálásában rendkívül érdekes támpontot ad az a kutatás, melyben megállapították, hogy az aknés betegek tünetes bőrének faggyújában jellemző a telítetlen zsírok felhalmozódása, ahogy azt a leptin kezelt faggyúsejteknél is tapasztaltuk. A tanulmány külön kitért arra, hogy a tünetekben javulás figyelhető meg, ha a vizsgálatban résztvevő betegek alacsony glikémiás (LGL) étrendet követtek, aminek következtében csökkent a testtömeg és a faggyúban lévő telítetlen

zsírsavak mennyisége is a kontroll csoporthoz képest. Ezen eredmények felvetik az LGL diéta szerepét a szébum összetételének megváltozásában és ezzel együtt az aknés tünetek súlyosságában, azonban a háttérben álló mechanizmust nem azonosította. Eredményeink tükrében ebbe a folyamatba illeszkedhet be a leptin azáltal, hogy megnöveli a telítetlen zsírsavak arányát a faggyúsejtek által termelt zsírokban, hasonlóan az aknés betegek faggyújában ismertekhez. A szébumban megtalálható legfőbb antioxidáns, az E vitamin szint lecsökkenése leptin kezelés hatására pedig még inkább felveti a lehetőségét annak, hogy ha nem is teljes mértékben felelős a leptin, de komoly szereppel bírhat a gyulladással kapcsolatos aknés bőrtünetek esetében tapasztalt megváltozott faggyú kialakításában. Az adipokinek karakterizálásával munkánk még komplexebb megvilágításba helyezi a leptint, hisz felveti annak lehetőségét is, hogy nem csak a keringésben lévő leptin vezethet a faggyúmirigy gyulladásához és megváltozott zsírtermeléséhez, de maga a faggyúsejt is képes lehet használni autoregulatorikus formában. A faggyúsejtek és a leptin kapcsolatának további kiterjesztése olyan szignál útvonalak irányába, mint a mammalian target of rapamycin (mTOR) útvonal (melyet szintén képes a leptin indukálni), további érdekes kapcsolatokat teremthet az akné megléte/súlyossága és az érintett betegek egy részében megfigyelhető metabolikus eltérések között.

Munkánkat összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a zsírsejtekhez hasonlóan a faggyúsejtek is képesek expresszálni és szekretálni az adipokineket, így ezeken a fehérjéken keresztül a faggyúmirigy akár befolyásolhatja a dermiszben lejátszódó, dinamikusan változó folyamatokat is. Ha figyelembe vesszük a faggyúmirigyek igen nagy számát a bőrben, felvetődik az egyik legfontosabb kérdés is: képesek-e a faggyúmirigyek (a zsírszövethez hasonlóan) az általuk termelt adipokineken keresztül nemcsak lokálisan, de szisztémásan is kifejteni a hatásukat. Így a munkánkra épülő további kutatások egyrészt új megvilágításba állíthatják a szébum termelődését és a gyulladással kapcsolatos folyamatok kialakulását az adipokinek

tükrében, másrészt új lehetőségek előtt is megnyithatják az utat a különböző gyulladásos bőrbetegségek kezelésére vonatkozóan.

ÖSSZEFOGLALÁS

A faggyúmirigy, a haj folliculusokkal együtt, a pilosebaceus egység alkotója, melynek elsődleges feladata a szébum termelés. Az intenzív szébum termelés valamint a szébum lipid összetételének változása kulcsfontosságú szerepet játszik olyan gyulladásos bőrbetegségek kialakulásában, mint az akné vagy az atópiás dermatitis. Különböző receptorokon (TLR2, TLR4 és TLR6) keresztül, a faggyúmirigy számos pro-és anti-inflammatórikus citokin (IL-6 és 10), kemokin (IL-8), antimikrobiális lipid és peptid termelődését szabályozza.

A zsírszövet gyulladásos hatásának közvetítésében központi szerepet betöltő adipokinek, mint pl. az IL-6, MCP-1, TNF- α , leptin vagy az adiponektin, olyan kisméretű bioaktív molekulák, melyek immunrendszerre kifejtett hatása számos sejttípusban került leírásra. Ezek közül az IL-6-ról, illetve a TNF- α -ról már bebizonyosodott, hogy a zsírszövethez hasonlóan a faggyúsejtek is képesek termelni, felvetve, hogy ezeken a fehérjéken keresztül a zsírszövethez hasonlóan a faggyúsejtek is képesek gyulladást iniciálni illetve modulálni.

Munkacsoportunk az adipokinek szisztémás analízise során azt a megfigyelést tette, hogy a faggyúsejtek számos egyéb adipokint is képesek termelni. Kísérleteink során megvizsgáltuk, milyen stimulusok képesek szabályozni illetve felszabadítani a faggyúsejtekből az IL-6-ot, adiponektint, leptint, resistint, serpin E1-et és visfatint. Munkánkat szöveti preparátumokon, illetve SZ95 sejtkultúrán végeztük, olyan sejtkézeléseket használva, melyek dermális jelenléte ismert: gyulladásos stimulusok (TLR1/2 [PAM3CSK4] és 4 [LPS] aktivátorok) valamint terápiásan használt zsír (13CRA). Ezen stimulusok hatására a gén expresszió szintjén figyeltünk meg változásokat az IL-6, adiponektin, leptin, serpin E1 és visfatin esetében, mely eredményt ELISA módszerrel fehérje szinten is megerősítettünk. Ezek után figyelmünket a leptinre fordítottuk, ugyanis ez volt az az adipokin, melynek termelődése indukálható volt a fent említett stimulusok hatására.

A leptin, biológiailag aktív receptorán keresztül a szervezet energia háztartásának modulálásán kívül, számos sejttípusban (makrofágok, dendritikus sejtek, T- és B limfociták, keratinociták) képes immunválaszt szabályozni. Normál és aknés bőrmintában, valamint SZ95 sejtvonalon egyaránt azonosítottuk, hogy a biológiailag aktív, hosszú izoformájú leptin receptor kifejeződik a faggyúsejtekben, relevánssá téve a leptin faggyúsejtekre gyakorolt hatásának vizsgálatát. Munkacsoportunk kimutatta, hogy SZ95 faggyúsejtekben leptin kezelés hatására egyrészt megnő a lipid cseppek mérete és megváltozik a lipid összetétel, másrészt különböző gyulladásos mediátorok termelődésében szerepet játszó enzimek (COX2 és 5-LOX) expressziója indukálódik. A leptin fokozza továbbá a pro-inflammatórikus IL-6 és IL-8 citokinek mRNS és fehérje szintű expresszióját, valamint a STAT3 és az NF- κ B útvonalak aktiválódását eredményezi, mellyel sejtszinten kapcsolja össze a zsíryanycserét a gyulladással.

Eredményeink arra utalnak, hogy a faggyúmirigy az általa termelt adipokineken keresztül nem csak célpontja lehet a bőrben a különböző gyulladásos folyamatoknak, hanem annak iniciálója és modulálója is.

PUBLIKÁCIÓS LISTA



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/230/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Dóra
Neptun kód: TVRI4N
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, D.**, Lovászi, M., Pólsika, S., Oláh, A., Bíró, T., Veres, I., Zouboulis, C.C., Stähle, M., Rühl, R., Remenyik, É., Töröcsik, D.: Sebocytes differentially express and secrete adipokines. *Exp. Dermatol. Epub ahead of print (2015)*
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.12879>.
IF:3.762 (2014)
2. Töröcsik, D., **Kovács, D.**, Camera, E., Lovászi, M., Cseri, K., Nagy, G.G., Molinaro, R., Rühl, R., Tax, G., Szabó, K., Picardo, M., Kemény, L., Zouboulis, C.C., Remenyik, É.: Leptin promotes proinflammatory lipid profile and induces inflammatory pathways in human SZ95 sebocytes. *Br. J. Dermatol. 171(6)/2014, 1326-35, 2014.*
IF:4.275

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,037

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,037

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

Debrecen, 2015.10.30.



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. • Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. • Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu • Honlap: www.lib.unideb.hu

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Törőcsik Dánielnek a laboratóriumi és tudományos munkám során nyújtott rengeteg támogatását és a motiváció fenntartását. A PhD éveim alatt szakmai útmutatásával, mindenre kiterjedő figyelmével mindig segítségemre volt a kutatási eredmények megvitatása és a további kísérletek megtervezése során.

Köszönettel tartozok Dr. Remenyik Éva Professzornőnek, aki lehetővé tette, hogy tudományos munkámat a DE KK Bőrgyógyászati Tanszékén végezhessem.

Szeretném megköszönni a segítséget munkatársaimnak, Lovászi Mariannának és Toka-Farkas Tündének. Odaadó segítőkészségük nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg.

Köszönettel tartozok Dr. Póliska Szilárdnak, akinek szakmai tudására bármikor számíthattam az RNS-seq vizsgálat megtervezésekor és az eredmények elemzésekor.

Hálával tartozok Dr. Veres Imrének, a Bőrgyógyászati Tanszék patológusának, akihez bármikor bizalommal fordulhattam és idejét nem sajnálva mindig segítségemre volt az immunhisztokémiai eredmények megvitatásakor.

Köszönöm Kertészné Erzsikének és Csapóné Sandra Ildikónak a nélkülözhetetlen technikai segítséget továbbá Janka Eszternek, aki az adatok statisztikai elemzésében volt segítségemre.

Szeretném kifejezni hálámat Dr. Demény Máténak, támogatásáért, türelméért és hogy mindig átsegített a nehéz időkön.

Nagyon köszönöm minden kollégámnak, akikkel a Bőrgyógyászati Tanszéken együtt dolgoztam ezek alatt az évek alatt.

Végül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a lelki támogatást, a türelmet, a kitartó szurkolást és hogy mindig mellettem álltak.