

Az endokannabinoid tónus szerepének vizsgálata a bőr egyes  
nem-neuronális sejtjeinek biológiájában

Zákány Nóra

Témavezető:

Dr. Szabó Tamás



Debreceni Egyetem  
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2018

**Az endokannabinoid tónus szerepének vizsgálata a bőr egyes nem-neuronális sejtjeinek biológiájában**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az „*Elméleti Orvostudományok*” tudományágban

Írta: Zákány Nóra okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája  
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia program) keretében

Témavezető: Dr. Szabó Tamás, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kappelmayer János István, az MTA doktora

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

Dr. Margittai Éva, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet Könyvtára

2018. december. 19, 11:00 óra

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, az MTA doktora

Dr. Juhász Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kappelmayer János István, az MTA doktora

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

Dr. Margittai Éva, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK Belgyógyászati Intézet, A épület tanterme

2018. december. 19, 13:00 óra

# BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## *A human bőr, mint barrier*

A bőr a maga 1,8 m<sup>2</sup>-es méretével (átlagos felnőtt) az emberi test legnagyobb kiterjedésű szerve. Amellett, hogy egy jól felépített védőpajzsként szolgál a potenciálisan veszélyes fizikokémiai és biológiai ártalmakkal szemben, fontos szerepe van a szervezet hő- és a vízháztartásának szabályozásában is, képes különféle hormonok (pl. D vitamin) termelésére, számos anyag (pl. különféle zsírok) tárolására, valamint lehetővé teszi a hő, a nyomás és a fájdalom érzékelését.

A bőr ezen összetett feladatait fizikokémiai, immunológiai, illetve mikrobiológia barrierként látja el. A fizikokémiai védőfunkció legfontosabb eleme az epidermisz, azon belül is a *stratum corneum*. Ezen réteg terminálisan differenciált keratinocitákból (KC) áll, melyeket egy extracelluláris lipidmátrix vesz körül. Ezen protektív lipidréteget egészíti ki a faggyúmirigyek által termelt, és a bőrfelszínre juttatott olajos, viaszos faggyú (szébum). A mikrobiológiai barrier azon „hasznos” mikroorganizmusok hozzák létre, melyek a bőrfelszínen élnek, és képesek az emberi szervezetre veszélyt jelentő patogénekkal szemben fellépni. Az immunológiai védőfunkció a bőrben megtalálható sejtek (pl. KC-k, szebociták stb.) által termelt antimikrobiális peptidek és lipidek révén, a veleszületett és az adaptív immunrendszer tagjaival szoros együttműködésben valósul meg. A veleszületett immunrendszer itt megtalálható tagjai közé számos különböző epidermális (pl. KC-k, Langerhans sejtek), illetve dermális pl. szebociták, hízósejtek (MC-ek) és különféle dendritikus sejtek tartoznak.

## *A humán faggyúmirigyek (FM-ek) biológiája és az őket érintő betegségek*

A lipidtermelés mellett a FM-ek szintén fontos funkciót töltenek be pl. mint őssejtraktárok, és szerepük van a bőr öregedésében és gyulladásos folyamataiban is. Ezen funkciók a faggyútermeléshez hasonlóan jól szabályozottak egyebek mellett nemi hormonok, növekedési faktorok, neuropeptidek és számos egyéb

receptor és modulátor által (pl. peroxiszóma-proliferátor aktivált receptorok [PPAR-ok], hisztamin stb.).

Ezen túlmenően a FM-ek immunológiai szerepe is számottevő. A FM-ek sejtjei, vagyis szebociták számos patogén asszociált molekuláris mintázatot felismerő receptorral rendelkeznek (pl. Toll-like receptorok [TLR-ok], CD14 stb.), melyek képesek felismerni a veszélyt jelentő patogéneket.

A FM-ekhez köthető legismertebb bőrbetegségek az acne és a szeporrea, melyek igen nagy arányban érintik a lakosságot. Az acne a fiatalok (12-25 éves korig) 85%-nak körében fordul elő. Kialakulásához többek között az alábbi lehetséges tényezők járulnak hozzá: megnövekedett szébum termelés, androgén aktivitás, follikuláris hiperkeratinizáció és a *Cutibacterium* (korábban *Propionibacterium*) *acnes* jelenléte.

Sajnos a jelenleg alkalmazott FM-eket érintő betegségek terápiás eljárásai több kihívással is szembenéznek: legtöbbjük a FM-ek homeosztatisz funkcióinak megzavarásán túl súlyos szisztémás mellékhatásokat is okozhat (pl. bőrszárazság, viszketés, májkárosodás, vérszegénység stb.). A klinikai gyakorlatban ezért igen nagy az igény olyan új, alternatív kezelési módszerekre, melyek megoldást jelenthetnek ezen problémákra.

### ***A humán FM-ek modellje: az SZ95 szebocita sejtvonala***

Ahhoz, hogy jobban megismerjük és megértsük a FM-ekhez köthető kórképeket, szükség van megfelelő kísérletes modellekre. Olyan állatmodell azonban, mely lehetővé tenné az intakt FM-ek vizsgálatát természetes, szöveti körülmények között, nem áll rendelkezésünkre.

Habár a primer sejtek megtartják a szebocitákra jellemző tulajdonságaikat, alkalmazásuknak sajnos több hátránya is van, mint pl. a rövid maximális tenyészidő (3-6 passzázs) vagy a nagyszámú donor szükségessége.

Ezen nehézségek áthidalására a közelmúltban több humán immortalizált szebocita sejtvonala hoztak létre. Közülük az első és egyben legjobban jellemzett az SZ95 szebocita sejtvonala. Ezen sejtek előnye, hogy nemcsak fenotípusosan,

hanem funkcionálisan is nagyon hasonlóak a normál humán szebocitákhoz, és – mint a sejtvonalak általában - tenyészetben hosszabb ideig is fenntarthatóak. Mindezek figyelembevételével kísérleteinkhez, számos korábbi munkánkhoz hasonlóan, ezúttal is az SZ95 szebocitákat használtuk.

### ***A humán hízósejtek (MC-ek) biológiája és az őket érintő leggyakoribb megbetegedések***

A MC-ek a humán bőr immunrendszerének fontos effektor sejtjei. Döntő szerepük van pl. a nem-saját struktúrák felismerésében, a sebgyógyulásban és a szőrnövekedésben.

Miután ezen sejtek éretlen alakjai elhagyják a csontvelőt, kemotaktikus ingerek hatására különböző szövetekbe, legfőképpen kötőszövetes területekre, illetve nyálkahártyákba vándorolnak. Itt az adott szöveti környezet és az ott megtalálható speciális faktorok hatására az előalakok képesek befejezni érési folyamataikat. Érdekes módon ezen éretlen MC progenitorok a humán, illetve rágcsáló bőr szőrtüszőiben, azon belül azok follikuláris kötőszövetes tokjában (CTS) is megtalálhatóak, ahol csontvelő nélkül, *ex vivo* is képesek differenciálódni.

A MC-ek túlzott aktivitásához köthető igen gyakori betegségek manapság jelentős kihívást jelentenek nemcsak a betegeknek, de az őket ellátó egészségügyi rendszernek is. Az egyik ilyen betegség pl. az atópiás dermatitisz, mely világszerte a gyerekek 15-20%-át, míg a felnőtt lakosság csaknem 1-3%-át érinti. Ezen gyakori betegségek hatékonyabb kezelése miatt is fontos, hogy minél többet megtudjunk arról, hogy élettani körülmények között ezen sejtek miként kerülnek el a túlzott működést.

### ***A MC-ek in situ modellje: a humán szőrtüsző (HF) szervkultúra***

A MC-ek izolálása és fenntartása számos nehézségbe ütközik. Az egyik, hogy mivel adott szövetben igen kis számban vannak jelen, így nehéz őket kellően nagy mennyiségben kinyerni. A másik, hogy izolálásuk során igen erős stresszhatásnak vannak kitéve, mely képes őket aktiválni, ami vizsgálatuk során

akár félrevezető eredményekhez is vezethet. Legvégül pedig nem szabad megfeledkezni arról sem, hogy ezen sejtek érését, illetve működését nagyban befolyásolják az őket körülvevő szöveti mikrokörnyezetből érkező ingerek. Ezen feltételek sajnos sejtes kísérletek esetén nem adóttak.

A fentieket szem előtt tartva tehát a legideálisabb a MC-ket intakt szöveti feltételek mellett, *in situ* tanulmányozni. Humán vonatkozásban erre kiválóan alkalmas a MC-ekben gazdag bőr, mely manapság plasztikai műtétek melléktermékeként (pl. „ráncfelvarrás”) viszonylag könnyen hozzáférhető.

Ahogy azt már említettük, a már jelenlévő MC progenitorok csontvelő hiányában is képesek differenciálódni a szőrtüszők CTS-ében, ezért azt feltételeztük, hogy itt lennie kell olyan szabályozó mechanizmusnak, mely képes a MC-ek érését és működését hatékonyan befolyásolni. Mindezek figyelembe vételével a MC-ek biológiáját tanulmányozó kísérleteinkhez humán HF szervkultúrát alkalmaztunk.

### ***Az endokannabinoid rendszer (ECS)***

A kannabinoid receptorok, ligandok, valamint azok felépítéséért és lebontásáért felelős enzimek együttesen alkotják az ECS-t. Az elmúlt évtizedben bizonyítást nyert, hogy az endokannabinoid (eCB) aktivitás kulcsfontosságú a szervezet homeosztatikus folyamatainak fenntartásában.

A kannabinoid ligandok három kategóriába sorolhatók be: növényi (azaz „fito-”) kannabinoidok, eCB-ok és ezek szintetikus analógjai.

A pszichotróp (-)-*transz*- $\Delta^9$ -tetrahidrokannabinol (THC), mely a legintenzívebben kutatott fitokannabinoid, olyan kulcsfontosságú funkciókra van hatással az emberi szervezetben, mint pl. a motoros- és kognitív képességek, memória, illetve étvágy.

Az eCB-ok talán két legismertebb tagja az anandamid (AEA) és a 2-arachidonoil-glicerol (2-AG). Ezen csoportba tartoznak továbbá az „eCB-szerű” ligandok is, nevezetesen az N-acil-etanolaminok (pl. oleoil-etanolamid [OEA], palmitoil-etanolamid [PEA]) és a monoacil-glicerolok (pl. 2-palmitoil-glicerol).

Az utóbbi években számos kannabinoid vegyületet állítottak elő mesterségesen terápiás felhasználás céljával. Ezen szintetikus komponensek jellemzően funkcionális hasonlóságot mutatnak pl. a THC-vel, de nagyobb hatékonysággal képesek a különböző kannabinoid-érzékeny receptorok stimulálására.

A kannabinoid ligandok specifikus receptorokon keresztül képesek kifejteni hatásmechanizmusukat. Mindezidáig 2 G-protein kapcsolt receptort (GPCR) azonosítottak, mint klasszikus kannabinoid receptort, nevezetesen az egyes (CB<sub>1</sub>) és kettes kannabinoid receptort (CB<sub>2</sub>). A THC hatásai legnagyobb mértékben a CB<sub>1</sub>-n keresztül valósulnak meg, mely receptor legfőképp a központi idegrendszerben fejeződik ki. Ezzel szemben a CB<sub>2</sub> inkább az immunrendszer sejteiben domináns, és ennek köszönhetően ott is fejt ki legfontosabb biológiai hatásait.

A kannabinoid ligandok képesek a fenti, „klasszikus” útvonalak aktiválása nélkül is hatást kifejteni, pl. egyéb metabotróp (pl. GPR18, GPR55 és GPR119), ionotróp (tranzien receptorpotenciálú [TRP] ioncsatornák, pl. a korábban vanilloid receptor 1 néven ismert TRPV1), illetve intranukleáris (PPAR-ok) receptorokon keresztül.

### ***Az eCB ligandok metabolizmusa és annak terápiás céllal történő modulációja***

Az eCB-ok jellemzően parakrin, illetve autokrin módon, a termelődésük közelében fejtik ki hatásukat, lebontásuk pedig viszonylag rövid időn belül megtörténik.

Az eCB metabolizmus megértésének a legegyszerűbb módja, ha a 2 legismertebb ligand szintézisének és lebontásának folyamatát tekintjük át. Az N-acil-foszfátidil-etanolamin-specifikus foszfolipáz D (NAPE-PLD) főként az AEA felépítéséért, míg a zsírsavamid-hidroláz (FAAH) annak lebontásáért felelős. A 2-AG hidrolízisét a monoacilglicerol-lipáz (MAGL), míg a szintézisét a diacilglicerol-lipáz (DAGL) végzi.

Miután a kannabinoid ligandok kifejtették hatásukat, nagy valószínűséggel facilitált diffúzió révén kerülnek felvételre a sejtekbe. Ezen transzportért a hipotetikus eCB membrántranszportert (EMT) tartják felelősnek. Érdekes módon, habár jelenléte és aktivitása funkcionális mérésekben jól nyomon követhető, mindezidáig a membránokon keresztüli transzportot mediáló molekulát nem sikerült azonosítani.

A megfelelő eCB szint, illetve tónus szabályozása különböző betegségek kezelésében új terápiás eljárások lehetőségét rejti magában. Napjainkban az eCB kutatások egyik fókuszában ezért a fent említett metabolikus enzimek modulációja és a moduláció hatásainak vizsgálata állnak.

### ***A „k(ut)annabinoid” rendszer***

Az ECS funkcionális tagjai széles körben képviseltetik magukat az emberi bőrben is, és ott fontos szerepet töltenek be különböző szabályozó mechanizmusokban, mind élettani, mind kóros állapotokban. Ismert, hogy nemcsak a bőrben található rezidens, de az oda bevándorló sejtek is kifejeznek különböző kannabinoid receptorokat és enzimeket, valamint, hogy ezen struktúrák közül több is képes eCB-ok termelésére. Mindezek fényében egyáltalán nem meglepő, hogy az ECS által a bőr homeosztázisára kifejtett hatások igen hangsúlyosak.

### ***Az ECS szerepe a FM-ek biológiájában***

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a FM-ek képesek olyan fontos eCB-ok termelésére, mint pl. az AEA vagy a 2-AG. Megállapítottuk azt is, hogy ezen lokálisan termelődő anyagok a CB<sub>2</sub> receptor aktiválásával képesek befolyásolni a szebociták differenciációját, mely a faggyútermelés fokozásával jár együtt. Nem volt információnk azonban arról, hogy vajon a FM-ek kifejezik-e az eCB enzimapparátus tagjait, sem pedig arról, hogy az általuk létrehozott eCB tónus és annak farmakológiai modulációja hogyan hat a faggyúlipidek termelésére. Jelen doktori értekezés keretein belül ezért egyebek mellett ezen kérdésköröket kívántuk alaposabban megvizsgálni.



### ***Az ECS szerepe a MC-ek biológiájában***

Az ECS által a bőrben kifejtett szabályozó hatások között kiemelkedően fontosak az immunrendszer ott megtalálható sejtjeinek (pl. Langerhans sejtek, intraepitheliális limfociták, dendritikus sejtek, memória T sejtek, MC-ek stb.) életképességét, proliferációját, érését, fagocitotikus aktivitását, valamint citokin és kemokin termelését befolyásoló hatások.

Különösen érdekes, hogy az ECS (a mechanizmus részleteinek ismerete nélkül), mint a MC-ek potenciális neuroendokrin regulátora került nemrégiben előtérbe. Az eddigiekben publikált közlemények *in vitro* körülmények között nyert eredményei esetenként egymásnak ellentmondóak, így a CB<sub>1</sub> és CB<sub>2</sub> stimuláció hatásai a MC-ek biológiai folyamatainak szabályozásában még nem tisztázottak. Ezenkívül szintén kevés információval rendelkezünk arról, hogy vajon az ECS hogyan befolyásolja a humán bőrben lévő MC-ek működését *in situ*, azaz klinikailag releváns körülmények között. Arról, hogy vajon képes-e ezen rendszer a MC progenitorok differenciálódását szabályozni, szintén nem áll rendelkezésünkre adat.

A fentiek ismeretében ezért kísérleteinkben elsősorban az ECS szerepét kívántuk vizsgálni a humán bőrben lévő MC-ek biológiai folyamatainak szabályozásában.

## CÉLKITŰZÉS

A fentiek fényében az ECS MC-ekre kifejtett lehetséges hatásainak vizsgálata során a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

- 1.) A humán HF vajon alkalmas modell-e a MC-ek és az ECS kapcsolatának fiziológias körülmények között történő vizsgálatára?
- 2.) Vajon a humán HF-k follikuláris kötőszövetes tokjában lévő MC-ek kifejeznek-e funkcionálisan aktív CB<sub>1</sub>-t?
- 3.) Ha igen, vajon annak stimulációja, illetve gátlása hatással van-e a MC-ek működésére?

Az eCB tónus FM-ekre kifejtett hatásának vizsgálatakor elsődlegesen a következőkre voltunk kíváncsiak:

- 1.) Vajon a humán szebociták kifejezik-e az eCB metabolizáló enzimapparátus legfőbb tagjait?
- 2.) Hogyan befolyásolja az eCB tónus modulációja a FM-ek biológiai folyamatait?

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### *Humán HF szervkultúra és sejtenyésztés*

Az anagén VI-os fázisú HF-ket plasztikai műtéten átesett, bőrgyógyászati szempontból egészséges donorok (8 donor, 49-72 év között) halántéktáji hajas fejbőr mintáiból izoláltuk. A mintavétel és a -feldolgozás a Helsinkii deklaráció szerint, annak irányelveit követve zajlott le, a németországi, Lübecki Egyetem Tudományos és Etikai Bizottságának jóváhagyásával (azonosítók: 06-109, 18-07-06). A minták felhasználását a donorok megfelelő tájékoztatást követően írásban engedélyezték. Az összesen 414 HF tenyésztésben tartása meghatározott ideig, 24-lyukú tenyésztőedényben, 37°C-on 5%-os CO<sub>2</sub> tartalmú légtérben, Williams E médiumban történt, melyet a következőkkel egészítettünk ki: 10 µg/ml inzulin, 10 ng/ml hidrokortizon, 2 mmol/L L-glutamin és 1% antibiotikum keverék. A tenyésztési körülményekhez való alkalmazkodás érdekében a HF-ket (a gécscsökkentést célzó kísérletek kivételével) egy éjszakán át kezelőanyag-mentes médiumban inkubáltuk. Ezek után a tápoldatot minden második napon cseréltük, a kezelésekre pedig naponta került sor.

A humán, külső gyökérhüvely (ORS) KC-ák izolálása és tenyésztése a következőképpen zajlott. A kitépett HF-ök elsőként egy 1 órás enzimátikus emésztésen mentek keresztül (0,2% tripszin, 0,1% etilén-diamin-tetraecetsav kalcium- és magnéziummentes foszfát pufferben [CMF-PBS], 37°C). Centrifugálás után (1000 rpm, 10 perc), majd a sejteket Dulbecco's modified Eagle médium (kiegészítve: L-glutamin, Na-piruvát és 4,5 g/L glükóz) és Ham's F12 médium (kiegészítve: 10% Fetal Clone II [Hyclone], 5 µg/ml inzulin, 0,4 µg/ml hidrokortizon, 2,43 µg/ml adenin, 2 nM trijód-tironin, 0,1 nM kolera toxin, 10 ng/ml humán epidermális növekedési faktor [EGF], 1 mM aszkorbil-2-foszfát, 100 U/ml penicillin G, és 25 µg/ml gentamycin) 3:1 arányú keverékében tenyésztettük. A tenyésztés során tápláló réteggént mitomicinnel kezelt humán dermális fibroblasztokat (HDF) alkalmaztunk. A mintavétel és a feldolgozás a Helsinkii deklaráció szerint, annak irányelveit követve zajlott le, a Debreceni

Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal jóváhagyásával (IX-R-052/01396-2/2012, IF-12817/2015, IF-1647/2016, IF-778-5/2017).

A humán FM-ekből származó immortalizált SZ95 sebocitákat Sebomed™ Basal Mediumban tenyésztettük, mely 10 (V/V)% hővel inaktivált magzati szarvasmarha szérummal, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -al, 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktorral (EGF) és MycoZap™ Plus-CL antibiotikum keverékkel volt kiegészítve. A tápoldatot minden második napon lecseréltük, a sejteket pedig 60-70%-os konfluencia elérésekor passzáltuk.

### ***Fagyasztott és paraffinos metszetek készítése***

A kezelések után a fagyasztott metszetek készítéséhez a mintákat cryomatrix médiumba ágyazva folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Később ezen mintákból 6  $\mu\text{m}$  vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket SuperFrost fedőlemezekre helyeztünk, és a felhasználásig  $-80^\circ\text{C}$ -on tároltunk.

A paraffinos minták 24 óráig egy 4%-os formalin-foszfát pufferben inkubálódtak, majd ezek után egy dehidrációs eljáráson estek át. Az immunfestések előtt a paraffinos blokkokból 4  $\mu\text{m}$  vastagságú metszeteket készítettünk, és a festések előtt a metszeteket deparaffinizáltuk.

### ***MC hisztokémia***

A MC-eket 2 érzékeny hisztokémiai technikával, nevezetesen Leder-észteráz és Giemsa festési eljárásokkal azonosítottuk.

### ***c-Kit (CD117), $\text{CB}_1$ , triptáz, kimáz és $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ immunfestések***

A c-Kit (CD117)  $\text{CB}_1$ , triptáz, kimáz és  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$  MC-ken történő kimutatásához Tyramide Signal Amplification (TSA™) módszert alkalmaztunk. A mintákat fixálás után elsődleges antitestekkel (nyúl-anti humán CD117, patkány anti-humán CD117, nyúl anti-humán  $\text{CB}_1$ , egér anti-humán  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ ; 1 éjszaka), majd a rákövetkező napon biotinilált másodlagos antitestekkel (kecskében termeltetett nyúl vagy egér IgG elleni biotinilált antitestek) inkubáltuk

(45 perc). Torma-peroxidázzal való jelölést követően jelerősítés céljából fluoreszcein-izotiocianát (FITC) tiramid amplifikációs reagenst alkalmaztunk. A magfestést 2,4 diamidino-2-fenilindol (DAPI) segítségével végeztük el. Negatív kontrollként az elsődleges antitest kihagyásával megfestett mintáinkat használtuk fel.

#### ***c-Kit/CB<sub>1</sub> kettős immunfestés***

TSA módszert az előző bekezdés szerint alkalmaztuk, a c-Kit-et FITC-cel, míg a CB<sub>1</sub>-et rodamin vörössel konjugált tiramiddal vizualizáltuk. Negatív kontrollként az elsődleges antitestek kihagyásával megfestett mintáinkat használtuk fel.

#### ***c-Kit/Tocrifluor kettős immunfestés***

Tocrilfuoros inkubációt, majd fixálást követően, az endogén peroxidázok gátlását 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> segítségével végeztük el. A következő lépésben blokkoltuk az endogén avidin-biotint, és a metszeteket egy éjszakán át az előzőekben alkalmazott elsődleges antitestekkel inkubáltuk. A mintákat ezután a megfelelő másodlagos antitestekkel festettük meg, majd streptavidin-konjugált torma-peroxidázzal való jelölés következett. Negatív kontrollként az elsődleges antitest kihagyásával megfestett mintáinkat használtuk fel. Legvégül DAPI segítségével magfestést végeztünk.

#### ***c-Kit/Ki67 kettős immunfestés***

c-Kit TSA festés után egér anti-humán Ki67 vagy patkány anti-egér Ki67 elsődleges antitesteket, majd a másodlagos jelöléshez rodaminnal jelölt kecske anti-egér vagy kecske-anti-patkány IgG-t használtunk. A magfestést DAPI-val végeztük el. Negatív kontrollként az elsődleges antitest kihagyásával megfestett mintáinkat használtuk fel.

#### ***Ki67/TUNEL kettős immunfestés***

A tenyésztett HF-kön a proliferáló és az apoptotikus sejtek egyidejű kimutatására Ki67/TUNEL („terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP

nick end labeling”) kettős immunfestést alkalmaztunk. Fixálás után a fagyasztott metszeteket TdT enzimmel inkubáltuk a megfelelő reakciópufferben, majd a reakció leállítása után a mintákat egér anti-humán Ki67 antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át. A TUNEL-lel festődő sejteket FITC-konjugált digoxigenin-ellenes antitesttel, míg Ki67-re pozitív sejteket rodaminnal jelölt kecske anti-egér antitesttel vizualizáltuk. Legvégül a magfestést DAPI-val végeztük el. A Ki67, illetve TUNEL pozitív sejtek a HF-k CTS-ében kerültek megszámlálásra, és a teljes sejtszámhoz (DAPI-val festődő) lettek viszonyítva. Negatív kontrollként a TdT enzim, illetve a Ki67 ellenes antitest elhagyásával megfestett mintákat használtuk fel.

### ***c-Kit/TUNEL kettős immunfestés***

Az apoptotikus MC-ek kimutatására c-Kit/TUNEL kettős immunfestést alkalmaztunk, mely során a fenti c-Kit TSA metódust TUNEL festés követte. Negatív kontrollként a TdT enzim, illetve a c-Kit ellenes antitest elhagyásával megfestett mintákat használtuk fel.

### ***SCF immunfestés***

Ahhoz, hogy meghatározzuk az őssejtfaktor (SCF) expressziójának mértékét a tenyésztett HF-kön, valamint ORS-KC-kon egy indirekt immunfluoreszcens technikát alkalmaztunk. A minták egy anti-SCF antitesttel inkubálódtak egy éjszakán át. Ezek után a HF-k esetében másodlagos antitestként FITC-konjugált, míg az ORS-KC-kák esetében rodamin-konjugált kecske anti-egér IgG-t használtunk. Pozitív kontrollként humán bőrmintát, negatív kontrollként pedig az elsődleges antitest kihagyásával megfestett mintáinkat használtuk fel.

### ***FM immunhisztokémia***

A NAPE-PLD, FAAH, MAGL és DAGL $\beta$  enzimek immunhisztológiai vizsgálatához 3 donortól származó formalinban fixált, paraffinba ágyazott, FM-ben gazdag bőrmintát használtunk fel. Ezen donorokat trichilemmális cisztával

diagnosztizálták a Kenézy Gyula Egyetemi Kórházban. A FM-ek DAGL $\alpha$  expressziójának vizsgálatát 3 donor koponyatetőjéről származó mintán végeztük el.

A fagyasztott mintákat acetonban fixáltuk. A paraffinos minták deparaffanizáció után hő indukálta epitóp feltáráson estek át; ez a FAAH, MAGL és DAGL $\beta$  metszeteknél 11 mM pH 6-os citrát pufferben (konyhai kukta, teljes nyomás, 2 perc), míg a NAPE-PLD metszetek esetében magas pH-jú EnVision FLEX Target feltáró pufferben (vízfürdő, 95 °C, 30 perc) történt. Miután mindkét esetben blokkoltuk az endogén peroxidázok aktivitását (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), majd az 1%-os szarvasmarha szérum albuminban hígított, elsődleges antitestekkel történő inkubáció következett. Ezek után, EnVision FLEX Labeled polymer-HRP System rendszert alkalmaztunk, diamino-benzidin (DAB) előhívás technikával. Utolsó lépésben a sejtmagokat hematoxin festéssel vizualizáltuk. Negatív kontrollként az elsődleges antitest kihagyásával megfestett mintáinkat használtuk fel.

### ***Mikroszkópia***

A MC-ek vizsgálata esetében Nikon lencsékkel felszerelt Keyence Biozero-8000 és Keyence Biozero-8100 fluoreszcens és fénymikroszkópokat használtuk. A felvételeket a Biozero Image Analyzer Software 2.5. változatának segítségével értékeltük ki. A megfelelő előkészületek után adott mintákról kollaborációs partnereink JEM-1200EXII, JEOL transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével készítettek felvételeket. A c-Kit és CB<sub>1</sub> kettős immunfestés nagyfelbontású képei „double positive cells laser scanning” konfokális mikroszkóp segítségével készültek (Fluoview 300, Olympus, Fluoview 2.1 Software). A FM-ek esetében Nikon Eclipse E600 mikroszkópot alkalmaztunk.

### ***A MC-ek számának meghatározása***

Azok a MC-ek melyek esetében hisztokémiaiilag 5 vagy annál több extracelluláris metakromáziás granulumot figyeltünk meg 400x fénymikroszkópos nagyítás esetén, degranulált MC-ként azonosítottuk. A

degranulált MC-ek számát, valamint a teljes MC számot a HF-k CTS-ének teljes területén számoltuk, ami HF-nként minimum 13 független látóteret jelentett. Kezelési csoportonként legalább 6 HF-t használtunk fel. A bemutatott kísérleteket legalább 2 független donorból származó mintákon végeztük el.

### ***A jelintenzitás mérése***

A festések jelintenzitásának szemikvantitatív analízisét az NIH Image J Software segítségével végeztük el.

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

A Q-PCR vizsgálatokat ABI Prism 7000 sequence detection system segítségével, 5' nukleáz assay segítségével végeztük, melynek során TaqMan assay-ket használtunk. Belső kontrollként a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz, a  $\beta$ -aktin, a 18S RNS és a peptidil-prolil izomeráz A expresszióját vizsgáltuk.

### ***CB<sub>1</sub> géncsendesítés in situ***

A frissen izolált HF-ket a géncsendesítést megelőzően hideg William's E médiumba helyeztük. A transzfekció ideje alatt (6 óra) a HF-ket 500 ml transzfekciós oldatban inkubáltuk, mely CB<sub>1</sub> specifikus siRNS-sel (2,5  $\mu$ l), siRNS transzfekciós reagenssel (2,5  $\mu$ l) vagy kontroll siRNS-sel (2,5  $\mu$ l) volt kiegészítve. A megadott idő után a médiumot ismét konvencionális HF tápoldatra (lásd fentebb) cseréltük le. A minták 24 órával a transzfekció után kerültek lefagyasztásra.

### ***CB<sub>1</sub><sup>-/-</sup> egerek***

CB<sub>1</sub> gén inaktivációja MPI2 embrionális őssejteken belül célzottan történt meg egy nem-kódoló szekvenciát használva, homológ rekombináció során. Ezen egereket több mint 13 alkalommal keresztezték C57BL/GJ állatokkal, így kialakítva egy kongenikus egér törzset. A CB<sub>1</sub><sup>+/-</sup> típusú egyedeket vad típusú és



KO egerek keresztezésével hozták létre. A CB<sub>1</sub><sup>-/-</sup> egereket kollaborációs partnereink biztosították számunkra.

### ***Triptáz immunassay***

A CB<sub>1</sub> géncsendesített HF-k felülúszójának triptáztartalmát fluoreszcens immunassay segítségével határoztuk meg (Phadia, ImmunoCap Tryptase).

### ***Az intracelluláris lipidtartalom meghatározása***

A lipidtartalom szemikvantitatív vizsgálatához fluoreszcens Nile Red jelölést alkalmaztunk, melynek intenzitását FlexStation 3 készülék segítségével detektáltuk.

### ***Az SZ95 szebociták életképességének vizsgálata***

A sejtek életképességének meghatározásához kolorimetriás MTT assay-t alkalmaztunk. A sejteket 96-lyukú plate-ekre szélesztettük (20.000 sejt/well), majd a 48 órás kezelési idő elteltével, 2 órán át 0,5 mg/ml MTT oldattal inkubáltuk. Végül a keletkezett lila színű formazán kristályokat feloldottuk, és 565 nm-en FlexStation 3 készülékkel kolorimetriásan lemértük.

### ***Az apoptotikus és nekrotikus folyamatok vizsgálata***

Az SZ95 szebociták apoptotikus folyamatait a mitokondriális membránpotenciál vizsgálatával követtük nyomon MitoProbe™ DiI<sub>C1</sub>(5) Assay Kit segítségével. Ezen fluoreszcens mérés során a csökkenő jelintenzitás apoptózisra utal. A sejtek nem programozott sejthalálát (nekrózis) SYTOX Green jelöléssel vizsgáltuk, ahol a nekrozist a jelintenzitás növekedése jelzi.

### ***A citokin-felszabadulás vizsgálata (ELISA)***

A standard módon szélesztett sejteket 24 óráig kezeltük. A felszabadult IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 és TNF $\alpha$  mennyiségét a felülúszókból határoztuk meg OptEIA Kit-ek segítségével a gyártó általi protokoll szerint.

Az ORS-KC-ák felülúszójának SCF mennyiségét kollaborációs partnereink Quantikine Human SCF ELISA Kit segítségével mérték.

## **Western blot**

A minták fehérjetartalmának meghatározásához BCA assay-t végeztünk. Ezt követően a mintákból azonos fehérjemennyiségeket vittünk fel 10%-os Mini Protean TGX gélekre, majd a proteineket nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét, végül pedig nitrocellulóz membránokra transzferáltuk. A membránokat egy éjszakán át inkubáltuk 4°C-on 5g/100 ml tejport tartalmazó foszfátpufferelt sóoldatban hígított elsődleges antitestekkel. Ezek után a membránokat tormaperoxidázzal konjugált nyúl IgG másodlagos antitesttel jelöltük. Az immunjeleket SuperSignal® West Pico kemilumineszcens kit és KODAK Gel Logic 1500 Imaging System segítségével tettük láthatóvá.

## **[<sup>3</sup>H]-AEA felvétel assay SZ95 szebocitákban**

Az SZ95 szebocita sejtek AEA felvételének vizsgálatát multi-phase assay segítségével, kollaborációs partnereink végezték el. A mintákat oldószerrel vagy az AEA felvételét gátló referencia szerrel (UCM707; 10 µM) 500 µl RPMI médiumban, 37°C-on, AquaSil™ szilanizált screw-cap Eppendorf csövekben inkubálták, ezek után pedig [etanolamin-1-<sup>3</sup>H]AEA (0,5 nM) és jelöletlen AEA (végkoncentráció: 100 nM) keverékével 15 percig. A felvétel leállításához a mintákat először lecentrifugálták (800x, 5 perc, 4°C), majd jégre helyezték. A felülúszókat és a pelleteket külön-külön gyűjtötték össze. Előbbieket 500 µl jéghideg 1% zsírsavmentes BSA-t tartalmazó PBS-ben ismét feloldották. A mosóoldat szintén megtartásra került, mely fázis elválasztás után (jéghideg 1:1 CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 1 ml, 10.000g) azzal a szerves fázissal lett összekeverve, amelyet a primer felülúszók extracelluláris fázisából nyertek ki. A vizes fázisokat szintén különválasztották, a pelleteket pedig 250 µl PBS-ben reszuszpendálták.

Legvégül az összes fázist Ultima Gold szcintillációs keveréket tartalmazó szcintillációs küvetákba helyezték, és folyadékszscintillációs mérés technika (LSC) segítségével (Packard Tri-Carb 211 TR beta counter) elvégezték a méréseket.

### ***Az eCB szint meghatározása***

A minták eCB tartalmának meghatározását folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömeg spektrometriával (LC-APCI-MS) kollaborációs partnereink végezték el. Az AEA, 2-AG, PEA és OEA tartalmakat (pmol) a minták extrahált lipidtartalmával (mg) normalizálták.

### ***A FAAH aktivitás in vitro mérése***

Az SZ95 szebociták FAAH aktivitásának mérését kollaborációs partnereink végezték el a sejtek radioaktívan jelölt AEA hidrolízisének mérésével.

### ***Statisztikai analízis***

A MC-ekre vonatkozó adatokat Prism 5.0 Software (GraphPad Prism) segítségével, kétoldalú, kétmintás t-próbával vagy Mann-Whitney U próbával vizsgáltuk. A  $p < 0,05$  értékeket tekintettük szignifikánsnak.

A szebocitás adatokat Origin Pro Plus 6.0 Software segítségével, kétoldalú, kétmintás t-próbával vizsgáltuk. A  $p < 0,05$  értékeket tekintettük szignifikánsnak. A grafikonokat Origin Pro Plus 6.0 Software segítségével ábrázoltuk.

## EREDMÉNYEK

### ***1. Az eCB-ok korlátozzák a MC-ek érését és aktivációját***

#### ***A humán CTS-MC-ek kifejezik a CB<sub>1</sub>-t***

Első lépésben megállapítottuk, hogy a c-Kit (a MC növekedési faktor SCF receptora) pozitivitást mutató CTS-MC-ek 75,5%-a kifejezi a CB<sub>1</sub>-et is (c-Kit/CB<sub>1</sub> kettős immunfestés). Nemcsak izolált, de intakt humán bőrben lévő HF-k vizsgálatakor is hasonló arányt kaptunk. Ezek után a HF-eket 24 órán át kezeltük a CB<sub>1</sub> inverz agonista AM251 fluoreszcens változatával (Tocrifluor), és megállapítottuk, hogy ez a relatíve nagy méretű ligandum az intakt szöveti környezet ellenére is képes eljutni a MC-ekhez, így alkalmas azok funkcionális vizsgálatára.

#### ***A CB<sub>1</sub> gátlása fokozza a CTS-MC-ek számát és azok degranulációját***

A következő lépésben arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon hogyan hat a CB<sub>1</sub> stimuláció/gátlás a MC-ek működésére. Kimutattuk, hogy az AEA (nem-szelektív CB<sub>1</sub> agonista, 30 µM) és az ACEA (CB<sub>1</sub> szelektív agonista, 30 µM) nem befolyásolta szignifikáns mértékben sem a CTS-MC-ek számát, sem azok aktivációját. Meglepő módon, ezzel szemben az AM251 (CB<sub>1</sub> antagonist/inverz agonista, 1 µM) szignifikánsan megnövelte mindkét paramétert (Leder-észteráz immunohisztokémia). A hatás ráadásul nagy valószínűséggel valóban a CB<sub>1</sub> szignalizáció gátlása révén alakult ki, hiszen a CB<sub>1</sub> agonista AEA és ACEA gyakorlatilag teljesen kivédte azt.

#### ***A CB<sub>1</sub> gátlása fokozza a CTS-MC-ek érését, de a proliferációjukat nem befolyásolja***

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy az előzőekben megfigyelt sejtszámnövekedéssel összefüggésben változott-e a c-Kit<sup>+</sup> MC-ek aránya. c-Kit immunfluoreszcens festés segítségével megállapítottuk, hogy a CB<sub>1</sub> gátlás hatására ezen sejtek aránya szintén megemelkedett.

Hogy vajon a proliferáló, illetve apoptotizáló MC-ek száma milyen mértékben módosult, Ki67/c-Kit, illetve TUNEL/c-Kit kettős immunfestésekkel vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a CB<sub>1</sub> gátlása sem a c-Kit+/Ki67+ kettőspozitív, vagyis proliferáló, sem a Kit+/TUNEL+ kettőspozitív, vagyis apoptotizáló MC-ek számát nem változtatta meg szignifikáns mértékben. Mindebből arra következtettünk, hogy a CB<sub>1</sub> gátlás hatására bekövetkező MC szám növekedés nem a proliferáció fokozódásából vagy apoptózis gátlásából adódott, hanem a CTS-ben jelenlévő, még c-Kit- progenitorok c-Kit+ sejté történő differenciálódásának a következménye.

Ezek után megvizsgáltuk, hogy a CB<sub>1</sub> gátlása befolyásolta-e különböző, leginkább az érett MC-ekre jellemző faktorok kifejeződését. Az AM251-gyel történő kezelés a c-Kit esetében tapasztaltakhoz hasonlóan megnövelte a triptáz+, kimáz+ és FcεRIα+ MC-ek számát a HF-kön belül. Ezen eredmény arra utalt, hogy azon MC progenitorok melyek először c-Kit+ váltak, később teljesen érett sejtekké differenciálódtak.

### ***A CB<sub>1</sub> szelektív géncsendesítése kivitelezhető humán HF-ben***

Természetesen nem elégedtünk meg a jelenség pusztán farmakológiai vizsgálatával, ezért siRNS transzfekcióval történő szelektív géncsendesítés segítségével lecsökkentettük a CB<sub>1</sub>-en keresztül történő eCB szignalizáció lehetőségét. A géncsendesítés hatékonyságát többféle festési eljárással is ellenőriztük (pl. CB<sub>1</sub> immunhisztokémia és fluoreszcens festés), melyek eredményei azt mutatták, hogy a CB<sub>1</sub> expressziója lényegesen lecsökkent a géncsendesített mintákban a transzfekciós reagenssel kezelt és a „scrambled” RNS-sel transzfektált kontroll csoporthoz képest is.

### ***A CB<sub>1</sub> géncsendesítése növeli a CTS-MC-ek számát és degranulációját in situ***

A sikeres géncsendesítés biológiai hatásait vizsgálva megállapítottuk, hogy - teljes összhangban az AM251-gyel végzett kísérleteink eredményeivel - a CB<sub>1</sub>-géncsendesített HF-kben nemcsak a CTS-MC-ek száma (Leder-észteráz, c-Kit és triptáz festések), de azok degranulációjának mértéke is megnőtt (Leder-

észteráz immunhisztokémia, triptáz immunfestés), míg – csakúgy, mint a farmakológiai vizsgálatok során - a Ki67+, proliferáló MC-ek aránya változatlan maradt.

Mindezen eredményeket egybevéve elmondhatjuk, hogy élettani körülmények között a HF-kben jelenlévő eCB-ok által kifejtett tónusos CB<sub>1</sub> stimuláció szabályozza, kontroll alatt tartja a MC-ek számát és aktivációját.

### ***Az eCB-ok kivédik a MC aktivátorok degranulációt fokozó hatását***

A MC-ekkel kapcsolatos kísérleteink következő lépéseként megvizsgáltuk, hogy vajon a CB<sub>1</sub> eCB-okkal történő stimulációja képes-e ellensúlyozni különböző MC aktivátorok hatásait. Kimutattuk, hogy az AEA (30 µM) és az ACEA (30 µM) nemcsak az endogén aktivátor P-anyag (100 pM), de az exogén aktivátor „compound 48/80” (10 µg/ml) MC hatásait is képes volt kivédeni (Leder-észteráz kvantitatív immunhisztomorfometria). Mindez ismételt arra hívja fel a figyelmet, hogy az ECS a MC-ek aktivitásának fontos, klinikailag releváns, endogén negatív szabályozója lehet.

### ***A CB<sub>1</sub> gátlás hatásai részben SCF függők***

A humán HF-k epitéliuma fontos forrása az SCF-nek, ami a MC-ek érésének pozitív regulátora. Tekintettel arra, hogy a CB<sub>1</sub> funktionálisan aktív formája kifejeződik ezen a területen is, kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a CB<sub>1</sub> gátlás hatással van-e az intrafollikuláris SCF expresszióra.

Kimutattuk, hogy az AM251 (1 µM) kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett az SCF expressziója nemcsak *in situ* (SCF immunfestés), de mRNS (Q-PCR) szinten is izolált HF-kben. A hatás ráadásul nagy valószínűséggel valóban a CB<sub>1</sub> szignalizáció gátlása révén alakult ki, hiszen az AM251 hatását a CB<sub>1</sub> agonista ACEA gyakorlatilag teljesen kivédte.

Hasonlóképpen izolált ORS-KC-k esetében is kimutattuk, hogy AM251 kezelés hatására az SCF kifejeződése nemcsak a sejtek membránjában (SCF fluoreszcens festés), de azok felülszójában is megemelkedett (ELISA).

Ezen eredmények arra utalnak, hogy a CB<sub>1</sub> gátlása az SCF mennyiségének megemelkedéséhez vezethet a HF-k epitéliumában, vagyis az ECS képes lehet ezen fontos növekedési faktor termelődésének szabályozására. Végezetül, a HF-ket 24 órán át inkubáltuk AM251-gyel (1 µM) és egy SCF-t semlegesítő antitesttel (1 µg/ml). Ezek után összehasolítva a c-Kit<sup>+</sup> sejtek számát a kontroll és kezelt csoportokon belül megállapítottuk, hogy az előzőekben megfigyelt CB<sub>1</sub> gátlás hatására bekövetkező sejtszámnövekedés, ha nem is teljesen, de szignifikáns mértékben lecsökkent.

***CB<sub>1</sub><sup>-/-</sup> egerekben is fokozódik a CTS-MC-ek száma és degranulációja in vivo***

Annak érdekében, hogy a CB<sub>1</sub> szerepét egy még egyértelműbb modellben is megvizsgálhassuk, kísérleteink végső állomásaként CB<sub>1</sub><sup>-/-</sup> egerek segítségével vizsgáltuk meg eredményeink *in vivo* relevanciáját. A humán HF-kben nyert *in situ* eredményeinkkel teljes összhangban a knockout egerek bőrében jelentősen megnőtt a Leder-észterázzal azonosítható MC-ek száma és degranulációjának mértéke is a vad típusú kontrollhoz képest.

Végezetül a teljes (érett és éretlen) MC populációt azonosító c-Kit jelölés segítségével azt is megállapítottuk, hogy a CB<sub>1</sub> hiánya a c-Kit<sup>+</sup> MC-ek számát is szignifikánsan megnövelte. Ráadásul, csakúgy, mint a HF-k esetében, c-Kit<sup>+</sup> proliferáló MC-ek arányában itt sem történt szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest. Ezen eredmények alapján tehát elmondhatjuk, hogy az ECS *in vivo* is kontroll alatt tartja a MC-ek érését és degranulációját.

## **2. Az eCB tónus szabályozza a humán szebociták biológiai folyamatait**

### **A legfontosabb eCB metabolizáló enzimek kifejeződnek tenyésztett humán szebocitákban és humán FM-ekben is**

Kísérletes munkánk első lépésében Q-PCR és Western blot segítségével megállapítottuk, hogy a humán szebociták az eCB-ok felépítéséért (DAGL $\alpha$ , - $\beta$ , NAPE-PLD) és lebontásáért (FAAH és MAGL) felelős enzimeket is kifejezik *in vitro*. Ezen eredményeinket immunhisztokémia festésekkel *in situ* körülmények között is megerősítettük, habár ebben az esetben a DAGL $\alpha$  expressziója bizonytalan volt, különösen a metszeten belüli pozitív kontroll verejéktmirigyekkel való összehasonlítás fényében.

### **Az eCB felvétel a szebocitákban farmakológiailag gátolható**

A fenti eredmények alapján a humán szebociták valóban képesek lehetnek eCB-ok termelésére és lebontására. Tekintettel arra, hogy az EMT nagy valószínűséggel részt vesz ezen folyamatokban, a következő lépésben megvizsgáltuk, hogy vajon az eCB felvétel humán szebocitákban farmakológiailag gátolható-e. Kollaborációs partnereink méréseinek tanúsága szerint az EMT-gátló UCM707 (10  $\mu$ M, 15 perc) jelentősen csökkentette a radioaktívan jelölt [ $^3$ H]AEA intracelluláris koncentrációját, és ezzel egyidejűleg pedig megnövelte annak extracelluláris szintjét, azaz adataink arra utaltak, hogy humán szebocitákban az EMT funkcionálisan aktív, és farmakológiailag gátolható.

Fontos megemlíteni, hogy az AEA felvételének csökkenését a koncentráció grádiens csökkentésével elméletileg a FAAH UCM707 általi, nem-specifikus gátlása is eredményezhette. Ennek kizárására megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a FAAH aktivitása SZ95 szebocitákban két jól ismert EMT-gátló, nevezetesen a már említett UCM707 és a VDM11, valamint a referencia FAAH-gátló URB597 hatására. Megállapítottuk, hogy a sejtek FAAH aktivitása folyamatos, de viszonylag alacsony szintű, és azt sem az UCM707, sem a VDM11



nem volt képes érdemben csökkenteni, azaz a VDM11 valóban az EMT és nem a FAAH gátlása révén csökkentette a szebociták eCB-felvételét.

### ***A humán szebociták EMT-je elősegíti az eCB-ok transzportját azok lebontásának helyére***

Ezek után megvizsgáltuk, hogy az eCB transzport gátlása miként befolyásolja a ligandok koncentrációját. Kollaborációs partnereink folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriával (LC-APCI-MS) határozták meg a minták eCB tartalmát, melynek révén megállapítottuk, hogy az EMT-t specifikusan gátló VDM11 (10  $\mu$ M, 24 óra) szignifikánsan fokozta az AEA és az OEA szintjét, míg (véltetően a kis elemszám miatt) a 2-AG és a PEA szintjében bekövetkező növekedés nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

Tekintettel arra, hogy ezek szerint az EMT gátlása csökkenti az eCB-ok lebontását humán szebocitákon, eredményeink arra utalnak, hogy az EMT-t gátló VDM11 képes lehet fokozni a szebociták lokális eCB tónusát.

### ***Az EMT gátlószerei fokozzák a faggyúlipidek termelését, míg a FAAH gátlása nem befolyásolja azt***

Korábban kimutattuk, hogy a direkt eCB kezelés nagymértékben fokozza a szebociták faggyúlipid-termelését, ezért a következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy az EMT-t gátló VDM11 hogyan befolyásolja azt. A Nile Red jelölés eredményei szerint a nem citotoxikus koncentrációban alkalmazott EMT gátlószerek (VDM11: 5-10  $\mu$ M; AM404: 10  $\mu$ M) szignifikáns mértékben növelték a szebociták lipidszintézisét (48 óra), bár ezen hatások jócskán elmaradtak a direkt AEA-kezelés által kiváltott hatástól.

### ***A VDM11 nem növeli tovább az AEA lipidtermelést fokozó hatását***

A következőekben megvizsgáltuk, hogy a VDM11 és AEA együttes alkalmazása esetén hogyan változik a szebociták lipidtermelése. Megállapítottuk, hogy a VDM11 még az alkalmazott legnagyobb nem citotoxikus koncentrációban

sem volt képes tovább növelni az AEA lipogén hatását, ami azt jelzi, hogy a 30  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban az AEA hatása már elérte az elméleti maximumát, és nincs további reverz kapacitása.

### ***A VDM11 10 $\mu\text{M}$ -os koncentrációig nem befolyásolja a szebociták életképességét***

Azt követően, hogy a szebociták lipidtermelése megemelkedik, a sejtek differenciálódásának következő lépéseként a szebociták apoptózissal elhalnak. Tekintettel arra, hogy az előzőekben igazoltuk, hogy az EMT gátlása képes az SZ95 szebociták lipidtermelését megnövelni, a következő lépésben azt kívántuk megvizsgálni, hogy befolyásolja-e az apoptotikus/nekrotikus folyamatokat. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a VMD11 leghatékonyabb lipogén koncentrációja (10  $\mu\text{M}$ ) csak kis, nem szignifikáns csökkenést okozott a sejtek mitokondriális membránpotenciáljában, azaz a vizsgált időintervallumban (48 óra) egyértelmű pro-apoptotikus hatások nem alakultak ki.

### ***Az EMT-inhibitor VDM11 jelentős gyulladásgátló hatékonyságot mutat***

A VDM11 mérsékelt faggyúlipid-termelést növelő hatása elméletileg hasznos lehet pl. a különféle eredetű bőrszárazsággal járó kórképek kezelésénél. Mivel ezen betegségek gyakran járnak együtt bőrgyulladással (pl. az atópiás dermatitisz esetében), ezért megvizsgáltuk a VDM11 gyulladásgátló hatékonyságát is. Kimutattuk, hogy a VDM11 (10  $\mu\text{M}$ ) szignifikáns mértékben csökkentette a Toll-like receptor 4-et aktiváló lipopoliszacharid (LPS) kezelés gyulladáskeltő hatását, hiszen kivédte az IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 és TNF- $\alpha$  kifejeződésének mRNS szintű up-regulációját (Q-PCR, 24 óra), valamint csökkentette az IL-6 LPS-indukálta felszabadulásának mértékét is, míg az IL-8 felszabadulásra gyakorolt hatása nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet. ELISA méréseink során a TNF $\alpha$ , az IL-1 $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  koncentrációja a detekciós küszöb alatt maradt.

## DISZKUSSZIÓ

Az ECS nemcsak a humán bőr homeosztatikus állapotának fenntartásában nélkülözhetetlen, de fontos szerepe van az ezen szervet érintő különböző megbetegedések patomechanizmusában is. Munkacsoportunk korábbi és jelen tudományos munkáiban különös hangsúlyt fektetett arra, hogy jobban megismerje a „k(ut)annabinoid” rendszer szabályozó szerepét, különös tekintettel a nem-neuronális sejtekre. Jelen doktori értekezés keretein belül pedig azt vizsgáltuk meg alaposabban, hogy hogyan hat az eCB tónus modulációja a MC-ek, valamint a szebociták biológiai folyamataira.

### ***Az ECS szerepet játszik a bőrben található MC-ek biológiai folyamatainak szabályozásában***

Eredményeink elsőként bizonyítják, hogy a bőrben található MC-ek aktivációja, valamint rezidens progenitor sejtekből történő érése CB<sub>1</sub> szignalizáción keresztül szabályozott folyamat. Eredményeink szerint a homeosztatikus CB<sub>1</sub> jelátvitel vélhetőleg egymást erősítő közvetlen (elsődlegesen a MC-eken kialakuló) és közvetett (a HF epitéliumában termelődő SCF expressziójának szabályozásának köszönhetően másodlagosan létrejövő) hatások révén egyaránt képes a MC-ek érésének és degranulációjának gátlására. Ezen feltételezést látszik megerősíteni azon eredményünk is, amely szerint az SCF-t semlegesítő antitest alkalmazásakor a CB<sub>1</sub> gátlás MC progenitor sejtekre gyakorolt „érlelő” hatása jelentősen csökkent, de nem szűnt meg teljesen.

A fenti adatok tehát azt sugallják, hogy az eCB tónus a CB<sub>1</sub> homeosztatikus stimulációján keresztül szerepet játszik a HF epitéliumában termelődő SCF expressziójának szabályozásában. Ilyen módon a CB<sub>1</sub> szignalizáció gátlásával az SCF-t szabályozó „belső fék” megszűnhet, melynek következtében a citokin szintje megemelkedhet, ami végül elősegítheti a MC-ek rezidens progenitor sejtekből történő intrakután érési folyamatait.

Ezen túlmenően érdemes megjegyezni, hogy (bár ezt célzottan a jelen tanulmányban nem vizsgáltuk) eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a CB<sub>1</sub>-jelátvitel nemcsak a HF-kben, hanem az interfollikuláris epidermiszben is szabályozhatja az SCF kifejeződését. Eredményeink emellett tágabb értelemben arra is rávilágítanak, hogy milyen lényegesek az epiteliális-mezenchimális interakciók a MC-ek viselkedésének szabályozásában, és demonstrálják a rágcsáló és humán HF-k CTS-ében egyaránt megtalálható éretlen MC prekursorok jelentőségét, valamint azt, hogy ezen előalakok egy folyamatos eCB-kontroll által (is) szabályozott differenciálódási folyamat révén egyéb hatásokhiányában, „spontán” módon is képesek megélni.

A CB<sub>1</sub> szignalizációról korábban már bebizonyosodott, hogy képes a HF-k gyorsan proliferáló mátrix KC-áinak és egyéb nem-neuronális sejtpopulációk proliferációs és apoptotikus folyamatainak szabályozására. Jelen esetben azonban elsődlegesen a MC-ek érését és degranulációját befolyásolja. *In situ*, izolált HF-kön nyert adatainkkal összhangban *in vivo* eredményeink nemcsak tovább erősítették a CB<sub>1</sub> szignalizáció jelentőségét a bőrben található MC-ek esetében, de bizonyították a humán HF modell jelentőségét és relevanciáját ezen sejtek vizsgálatának kapcsán. Valóban, ezen miniszervek nemcsak fiziológiailag és klinikailag relevánsak a bőr MC-jeinek *in situ* körülmények közötti vizsgálatához, de ezen túlmenően költséghatékonyan fenntarthatóak, és viszonylag könnyen hozzáférhetőek is. Amellett, hogy lehetőséget nyújtanak bizonyos hatások kvantitatív, illetve kvalitatív módon történő vizsgálatára, az izolált HF-k alkalmasak a látott jelenségek háttérében álló mechanizmusok innovatív, újszerű (pl. *in situ* géncsendesítés, illetve blokkoló antitestek alkalmazása) vizsgálatára is, ami jelentősen kiszélesítette az *in situ* kísérletes módszerek palettáját. Eredményeink alapján tehát ez a modell jól kiegészítheti a MC-ek tanulmányozására szolgáló eddigi vizsgálati módszereket pl. allergiás és krónikus gyulladásos betegségek esetében.

Az ECS és MC-ek közötti lehetséges kapcsolat megértéséhez, kontextusba helyezéséhez természetesen számos további, az értekezésben nem érintett kérdést kell még tisztázni (pl. miért lokalizálódnak a MC-ek előszeretettel olyan szervekben/szövetekben [pl. a bőrben vagy a légutak nyálkahártyája alatt], amelyek közvetlen kapcsolatban állnak a külvilággal, vagy, hogy mi a pontos funkciójuk élettani [azaz nem gyulladásos] körülmények között). Az azonban bizonyos, hogy a most leírt, CB<sub>1</sub>-mediált szabályozás értékes terápiás eszköz lehet a MC-ek szám- és aktivitásbeli rendellenességei esetén (pl. allergiás betegségek, atópiás dermatitisz, masztocitózis vagy MC-es daganatok).

### ***Az eCB tónus modulációjának hatásai humán szebocitákon***

Legjobb tudomásunk szerint munkacsoportunk elsőként bizonyította, hogy az eCB enzimapparátus legfontosabb tagjai (pl. NAPE-PLD, DAGL $\alpha$  and  $\beta$ , MAGL and FAAH) nemcsak tenyésztett humán szebocitákon, de a humán bőr FM-eiben is expresszálódnak, habár a DAGL $\alpha$  kifejeződése (különösen a szöveti pozitív kontroll verejtékmirigyekkel összevetve) *in situ* nem volt teljesen meggyőző.

Kimutattuk azt is, hogy az eCB transzport funkcionálisan aktív és farmakológiailag gátolható humán szebocitákban; a VDM11 jelű EMT-inhibitor alkalmazásával pedig igazoltuk, hogy az EMT az eCB-ok és „eCB-szerű” molekulák lebontásában játszik szerepet ezeken a sejteken.

Ezzel párhuzamosan megvizsgáltuk különböző EMT-inhibitorok hatásait a szebociták életképességének, lipidszintézisének és immunválaszainak tekintetében. Megállapítottuk, hogy a VDM11 és AM404 nem-citotoxikus koncentrációban szignifikánsan megemelte a szebociták lipidszintézisét, habár ez a növekmény jelentősen elmaradt a közvetlen AEA-kezelés esetén általában tapasztalhatótól. Végezetül, a VDM11 szignifikáns mértékben csökkentette a Toll-like receptor 4-et aktiváló LPS kezelés gyulladáskeltő hatását. Ez különösen azon újabb adatok fényében figyelemreméltó eredmény, melyek szerint a FM-

ekből felszabaduló citokinek (pl. az IL-6) képesek elősegíteni a CD4<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup> naiv T sejtek differenciálódását T helper (Th) 17 sejtekké, hiszen így a FM-ek abnormális működése révén megváltozó citokintermelés olyan Th17-dominanciájú, gyulladásal kísért bőrbetegségek kialakulásában lehet jelentős, mint pl. a pikkelysömör.

Mindezen eredmények (különösen a disszertáció első felében tárgyalt MC-eken nyert adatok fényében) tehát arra utalnak, hogy az eCB-ok lebontásának farmakológiai gátlása révén kialakuló eCB-tónus-emelkedés további célzott vizsgálatokra érdemes terápiás stratégia lehet a bőr szárazsággal és gyulladásal kísért kórképeinek kezelésében.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Az endokannabinoid rendszer (ECS) bizonyítottan nagy jelentőséggel bír a bőr számos (kór)élettani folyamatának szabályozásában. Jelen munkánkban célul tűztük ki az endokannabinoid (eCB) tónus humán bőrre kifejtett hatásainak behatóbb vizsgálatát egyes ott megtalálható nem neuronális sejteken, név szerint hízósejteken (MC), valamint szebocitákon.

Eredményeink szerint a humán MC-ek kifejezik az 1-es típusú kannabinoid receptor ( $CB_1$ ) funkcionálisan aktív formáját. *In situ* körülmények között a homeosztatikus  $CB_1$ -jelátvitel blokkolásával az inverz agonista AM251 képes volt nemcsak ezen sejtek aktivációját, de rezidens progenitor sejtekből történő érési folyamatait is fokozni. A hatások (legalábbis részben) indirekt módon, a szőrtüszők epitéliumában termelődő össejtfaktor szintjének befolyásolása révén alakultak is. Eredményeink alapján tehát a  $CB_1$  a humán MC-ek érésének és aktivációjának fontos homeosztatikus kapuőre, így a receptor stimulációja ígéretes lehetőség lehet a fokozott MC számmal és aktivációval jellemezhető allergiás- és gyulladásos bőrbetegségek jövőbeli kezelésében.

Kísérleteink másik felében humán szebocitákat és faggyúmirigyeket vizsgálva megállapítottuk, hogy azokon az ECS enzimapparátusának számos tagja (NAPE-PLD, DAGL $\beta$ , FAAH és MAGL) megtalálható. Megállapítottuk azt is, hogy az anandamid felvételét gátló VDM11 mérsékelten növelte több eCB koncentrációját, valamint a faggyúlipid-termelést is, és képes volt a lipopoliszacharid által kiváltott gyulladásos válasz egyes elemeinek kivédésére.

Összefoglalva, eredményeink felvetik az eCB transzportot gátló szerek alkalmazásának lehetőségét a bőrszárazsággal és gyulladással járó bőrbetegségek kezelésében.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik doktori tanulmányaim során hozzájárultak mind szakmai, mind személyi fejlődésemhez, és akik nélkül ezen értekezés nem készülhetett volna el.

Mindenekelőtt köszönetet szeretnék mondani **prof. dr. Balla György** professzor úrnak, a Gyermekgyógyászati Klinika igazgatójának, valamint **prof. dr. Csernoch László** professzor úrnak, az Élettani Intézet vezetőjének, hogy a munkámhoz minden feltételt biztosítottak.

Őszinte hálával tartozom témavezetőmnek, **dr. Szabó Tamásnak**, valamint **prof. Bíró Tamás** egyetemi tanárnak határtalan motivációjukért, türelmükért és az évek során biztosított folyamatos támogatásukért.

Szeretném megköszönni kollaborációs partnereink felbecsülhetetlen segítségét is. Külön kiemelném **prof. Ralf Paus** és **dr. Koji Sugawara** kutatókat, akik közreműködése nélkül ezen doktori tézis nem valósulhatott volna meg.

Hálás köszönet illeti a labor és az intézet korábbi és jelenlegi dolgozóit, PhD és TDK hallgatóit önzetlen segítségükért. Közülük is kiemelném **dr. Oláh Attila**, **dr. Szöllősi Attila Gábor**, **dr. Aranyász Andrea**, **dr. Takács Erika**, **Markovics Arnold**, **Herczeg-Lisztos Erika**, **Kardosné Ambrus Lídia**, **dr. Szabó Imre Lőrinc**, **Szabó-Papp Judit**, **dr. Vasas Nikolett**, **Angyal Ágnes**, **Balogh Norbert**, **dr. Czifra Gabriella**, **dr. Tóth István Balázs**, és **dr. Borbíró István** legközvetlenebb munkatársaimat, akik mindig készek voltak velem megvitatni gondolataimat, eredményeimet és mindig hasznos tanácsokkal láttak el legjobb szakmai tudásuk szerint.

A munkám során nyújtott nagyszerű és elengedhetetlen technikai segítségükért **Hollósi Erika**, **dr. Varga Attiláné**, **Uzonyi Renáta**, **Bánhalminé Szilágyi Szilvia**, és **Furin Lilla** asszisztensnőknek szeretném hálámat kifejezni.

Legvégül, hálával és köszönettel tartozom szüleimnek és családomnak, akik lelkiileg és erkölcsileg is mellettem álltak ezekben az években. Nem tudom eléggé meghálálni barátomnak, Carlonak a nélkülözhetetlen támogatását és segítségét, aki a legnehezebb pillanatokban is kitartóan mellettem állt. Grazie!

---

A kutatás magyar („Lendület” LP2011-003/2015, TÁMOP-4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 „Nemzeti Kiválóság Program”, NKFIH 120552, 121360 és 125055, GINOP-2.3.2-15-2016-00015 „I-KOM Teaming”) és német (Deutsche Forschungsgemeinschaft-Cluster of Excellence, “Inflammation at interfaces” és Deutsche Forschungsgemeinschaft-FOR926) kutatói ösztöndíjak és programok támogatásával valósult meg.



# 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/305/2018.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Zákány Nóra  
Neptun kód: E24BBH  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10035915

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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: 6.448 (2017)
2. Sugawara, K., Bíró, T., Tsuruta, D., Tóth, I. B., Kromminga, A., **Zákány, N.**, Zimmer, A., Funk, W., Gibbs, B. F., Zimmer, A., Paus, R.: Endocannabinoids limit excessive mast cell maturation and activation in human skin.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (3), 726-738, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.11.009>  
IF: 12.047





**További közlemények**

3. Szabó, T., Ambrus, L., **Zákány, N.**, Balla, G., Bíró, T.: Regulation of TRPC6 ion channels in podocytes: implications for focal segmental glomerulosclerosis and acquired forms of proteinuric diseases.  
*Acta Physiol. Hung.* 102 (3), 241-251, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/036.102.2015.3.2>  
IF: 0.814
4. Ramot, Y., Sugawara, K., **Zákány, N.**, Tóth, I. B., Bíró, T., Paus, R.: A Novel Control of Human Keratin Expression: cannabinoid Receptor 1-Mediated Signaling Down-Regulates the Expression of Keratins K6 and K16 in Human Keratinocytes In Vitro and In Situ.  
*Peer J.* 1, e40, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.40>
5. Sugawara, K., **Zákány, N.**, Hundt, T., Emelianov, V., Tsuruta, D., Schäfer, C., Kloepper, J. E., Bíró, T., Paus, R.: Cannabinoid Receptor-1 Controls Human Mucosal-Type Mast Cell Degranulation and Maturation In Situ.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (1), 182-193, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.002>  
IF: 11.248
6. Csoma, H., **Zákány, N.**, Capece, A., Romano, P., Sipiczki, M.: Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: comparative genotypic and phenotypic analysis.  
*Int. J. Food. Microbiol.* 140 (2-3), 239-248, 2010.  
IF: 3.143

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 33,7**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 18,495**

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, 2018.09.13.