

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A kannabinoid szignalizáció szerepe a humán bőr egyes (kór)élettani folyamataiban

Dr. Oláh Attila

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016

Tartalom

1. Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke.....	5
2. Bevezetés	9
3. Irodalmi áttekintés	10
3.1. A bőr.....	10
3.1.1. Az emberi bőr felépítése.....	10
3.1.2. A bőr komplex barrierfunkciói	11
3.1.3. Az <i>atopias dermatitis</i> (AD)	14
3.1.4. A humán faggyúmirigyek (FM) biológiája	16
3.1.5. Az <i>acne</i>	18
3.1.6. A humán FM-ek modellje: az SZ95 humán szebocita sejtvonal	21
3.2. A(z endo)kannabinoid rendszer	23
3.2.1. Történeti áttekintés: Vadkenderhasználat az ókortól napjainkig.....	23
3.2.2. A növényi kannabinoidok (FK).....	24
3.2.3. A (–)-kannabidiol (CBD).....	25
3.2.4. Az endokannabinoid rendszer (ECS) felépítése	28
3.2.5. A TRP ioncsatornák családja.....	31
3.2.6. Az ECS általános élettani hatásai	32
3.2.7. A kannabinoidok és a bőr	33
3.2.7.1. A kannabinoidok és a bőr gyulladásos folyamatai	36
3.2.7.2. A kannabinoidok és a bőrfüggelékek	37
4. Célkitűzés.....	40
5. Anyagok és módszerek	41
5.1. A kísérletek során felhasznált kémiai ágensek áttekintése	41
5.2. Sejttenyésztés.....	41
5.2.1. A humán immortalizált SZ95 szebociták tenyésztése	41
5.2.2. A humán immortalizált (HPV-KER) és primer epidermális keratinociták (NHEK) tenyésztése.....	43
5.3. A szebociták intracelluláris lipidtartalmának meghatározása	44
5.3.1. Oil Red O festés.....	44
5.3.2. Fluoreszcens Nile Red jelölés.....	44
5.4. A szebocita lipidom vizsgálata	45
5.5. Az életképesség vizsgálata	46
5.6. Az apoptotikus folyamatok vizsgálata.....	46
5.7. A citotoxicitás/sejtnekrózis meghatározása	47
5.8. A proliferáció meghatározása (CyQUANT proliferációs assay).....	48
5.9. Reverz transzkripciót követő, kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció (Q-PCR)	49
5.10. Teljes genom microarray analízis.....	50
5.11. Immunfluoreszcens jelölés (IF)	51
5.12. Western blot.....	52
5.13. A citokinfelszabadulás vizsgálata (IL-6 és IL-8 ELISA)	54
5.14. A FAAH aktivitásának <i>in vitro</i> mérése	54
5.15. Szelektív géncsendesítés RNS interferencia technikával (RNSi).....	55

5.16.	Az intracelluláris 3'-5'-ciklikus adenzin-monofoszfát koncentráció meghatározása (cAMP ELISA)	55
5.17.	Patch-clamp mérések (teljes sejtes elrendezés)	56
5.18.	Fluoreszcens Ca^{2+} -mérés	57
5.19.	Teljes vastagságú humán bőr szervkultúra (hSOC)	58
5.19.1.	Minta-előkészítés és tenyésztés.....	58
5.19.2.	A faggyúlipid-tartalom meghatározása: Oil Red O festés	59
5.19.3.	A proliferáló sejtek arányának vizsgálata: Ki67 immunjelölés	59
5.20.	Az AD állatmodellje: kísérletek NC/Tnd egereken.....	60
5.21.	Statisztikai analízis	61
6.	Eredmények	62
6.1.	A CBD komplex „anti-acne” hatásokat mutat.....	62
6.1.1.	A CBD nem befolyásolja a bazális faggyúlipid-termelést, de kivédi az AEA lipidszintézist fokozó hatását	62
6.1.2.	A CBD „univerzális” liposztatikus hatást mutat	63
6.1.3.	A CBD nemcsak mennyiségi, hanem minőségi értelemben is normalizálja a lipidtermelést	64
6.1.4.	A CBD az életképesség befolyásolása nélkül anti-proliferatív hatást mutat.....	65
6.1.5.	A hosszútávú, illetve nagy dózisú CBD-kezelés csökkenti a sejtszámot és vele a bazális lipidtermelést is	67
6.1.6.	A CBD szebosztatikus (liposztatikus+anti-proliferatív) hatása ex vivo is kialakul... ..	68
6.1.7.	A CBD „univerzális” gyulladásgátló hatást mutat	69
6.1.8.	A CBD liposztatikus hatását nem „klasszikus” kannabinoid jelátvitel közvetíti	70
6.1.9.	A szebociták kifejezik a TRPV1, -2 és -4 ionotróp kannabinoid receptorokat	71
6.1.10.	A liposztatikus hatások kialakításáért a TRPV4 aktivációja felelős	73
6.1.11.	A CBD anti-proliferatív hatása TRPV4-függő, míg a gyulladásgátló aktivitás TRPV4-független úton alakul ki	78
6.1.12.	A CBD-kezelt szebociták microarray analízise számos lehetséges célgén szerepére világított rá	79
6.1.13.	A liposztatikus hatás hátterében az NR1P1 TRPV4-függő down-regulációja és az ERK1/2 MAPK kaskád szintén TRPV4-függő gátlása áll	83
6.1.14.	A CBD gyulladásgátló hatása a P65-NF- κ B útvonal „tribbles homolog 3” (TRIB3) általi gátlásának köszönhető	85
6.1.15.	A gyulladásgátló hatás kialakulásának hátterében a P65-NF- κ B útvonal $\text{A}_{2\text{A}}$ adenzin receptor $\rightarrow$ cAMP $\rightarrow$ TRIB3 $\uparrow$ általi gátlása áll.....	87
6.2.	A FAAH inhibíció jelentős gyulladásgátló hatás kialakulásához vezet <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> egyaránt	90
6.2.1.	A TLR aktiváció jelentősen fokozza FAAH kifejeződését és aktivitását humán epidermális keratinocitákon	90
6.2.2.	A FAAH-inhibitorok jelentős gyulladásgátló hatást fejtenek ki	92
6.2.3.	A FAAH-inhibitorok gyulladásgátló hatása $\text{CB}_{1/2}$ -mediált, „klasszikus” kannabinoid jelátvitel révén valósul meg.....	94
6.2.4.	A FAAH-gátlók még hosszabb távú kezelések során is a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazhatók.....	95
6.2.5.	A FAAH-inhibitorok kedvezően befolyásolják az NC/Tnd egerek bőrtüneteit.....	96
7.	Megbeszélés.....	98
7.1.	A FAAH mint lehetséges új célpont a bőrgyulladások kezelésében.....	98
7.2.	A CBD komplex anti-acne hatásai és a hátterükben húzódó jelátvitel.....	103

7.3. Záró gondolatok.....	112
8. Összefoglalás	113
9. Summary	114
10. Irodalomjegyzék	115
11. Tárgyszavak	133
12. Key words	134
13. Köszönetnyilvánítás	135
14. Függelék – Saját közlemények jegyzéke	136

1. Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke

2-AG: 2-arachidonoil-glicerol
(az egyik legismertebb endogén kannabinoid)

5-HT: 5-hidroxi-triptamin (szerotonin)

7-TM receptor: 7 transzmembrán doménnel rendelkező receptor

A_{2A}: adenosin 2A receptor

AD: *atopias dermatitis*

AEA: arachidonoil-etanolamin („anandamid”; az egyik legismertebb endogén kannabinoid)

AML: antimikrobiális lipid

AMP: antimikrobiális peptid

ARHGAP9: „*Homo sapiens Rho GTPase activating protein 9*” (az ERK2 endogén inhibitora)

BAPTA: 1,2-bisz-(o-aminofenoxi)-etán-N,N,N',N'-tetraecetsav

BiNGO: „*biological network gene ontology*” (microarray-k kiértékelésekor alkalmazott bioinformatikai eljárás, amely azt vizsgálja, hogy a változó gének között mely „*Gene Ontology*” kifejezések „dúsulnak föl”, azaz arról ad információt, hogy az adott gének milyen biológiai folyamatokban vehetnek részt)

BSA: szarvasmarha szérumalbumin

cAMP: 3'-5'-ciklikus adenosin-monofoszfát

CAMP: LL-37 katelicidin
(a szebociták által is termelt AMP)

C_{av}: feszültségfüggő Ca²⁺-csatorna

CB₁/CB₂: 1-es és 2-es kannabinoid receptor

CBC: kannabikromén

CBD: (–)-kannabidiol
(az egyik legismertebb nem-pszichotróp fitokannabinoid)

CBDV: kannabidivarin

CBE: kannabielzoin

CBG: kannabigerol

CBGV: kannabigerovarin

CBL: kannabiciklol

CBN: kannabinol

CBT: kannabicitrán

CD14: „*cluster of differentiation*” 14
(a bakteriális lipopoliszacharid felismerésében fontos koreceptor)

CE: koleszterol-észterek

CH: koleszterol

COX: ciklooxygenáz

CPZ: kapszazepin (TRPV1 antagonist)

CYP: citokróm P450 enzim

CSA: ciklosporin A (kalcineurin inhibitor)

D₂: dopamin receptor 2

DAGL α és **β :** diacilglicerol-lipáz- α és - β
(2-AG-t szintetizáló enzimek)

DC: dendritikus sejt

DG: digliceridek

DMSO: dimetil-szulfoxid

DNFB: 2,4-dinitrofluorobenzén

EC: extracelluláris

eCB: endokannabinoid

ECS: endokannabinoid rendszer

EDTA: etiléndiamin-tetraacetát

EGF: epidermális növekedési faktor

EGTA: etilén-glikol-tetraecetsav

ELISA: enzimkapcsolt immunassay

EMT: eCB membrántranszporter
(az eCB-ok sejtekbe történő felvételét elősegítő molekula)

ENT1: ekvibratív nukleozid transzporter 1
(az adenosin celluláris felvételét mediáló transzporter)

ERK1/2: extracelluláris szignál által regulált kináz 1 és 2 (a MAPK családba tartozó lipogén kinázok)

FAAH: zsírsavamid-hidroláz (az eCB-okat, főként az AEA-ot lebontó enzim)

FBS: embrionális szarvasmarha szérum

Fc: „*fragment crystallizable region*” (az antitestek konstans doménje)

FFA: szabadzsírsavak

FGFR: fibroblaszt eredetű növekedési faktor receptor

FK: fitokannabinoid

FLG: filaggrin

FM: faggyúmirigy

GABA_B: gamma-aminovajsav receptor B

GlyR: glicin receptor

GAPDH: glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

GF: GF109203X (a klasszikus és novel izoformákat egyaránt gátló, „általános” PKC-inhibitor)

Gö: Gö6976 (a klasszikus PKC izoformákat gátló PKC-inhibitor)

GPR18, -55, -92 és -119: G-protein kapcsolt receptor-18, -55, -92 és -119 (korábban „árva” receptorként ismert, de a közelmúltban eCB-érzékeny molekulaként azonosított, „novel” kannabinoid receptorok)

GSEA: „*gene set enrichment*” analízis (microarray analízisek során alkalmazott bioinformatikai eljárás, amely azt vizsgálja, hogy előre definiált, egy adott sejtélettani folyamathoz tartozó géneket tartalmazó génlisták génjei milyen gyakorisággal szerepelnek a microarray során változónak talált gének között, azaz arról ad információt, hogy egy adott csoportba tartozó gének közül többen és/vagy nagyobbbat változtak-e, mint ami a véletlen alapján várható lett volna)

GSK: GSK1016790A (ultrapotens, szelektív TRPV4 agonista)

HC: HC067047 (szelektív TRPV4 antagonist)

HEPES: 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav

hSOC: teljes vastagságú humán bőr szervkultúra

IC: intracelluláris

IGF-1: inzulinszerű növekedési faktor-1 (az *acne* patogenezisében fontos jelmolekula)

I-κB-α: „*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*” (az NF-κB család tagjainak aktivációját gátló molekula)

IL: interleukin

K: kontroll

K_{ATP}: ATP-érzékeny K⁺-csatorna

K_{Ca}1.1 (BK): Ca²⁺-aktivált, nagy konduktanciájú K⁺ csatorna (lehetséges kannabinoid célpont)

KdPT: lizin-d-prolin-treonin (az α-melanocita stimuláló hormonból származó gyulladásgátló hatású tripeptid)

KEB: komplex epidermális barrier

KIR: központi idegrendszer

KO: knock out

Kv: feszültségfüggő K⁺-csatorna

LA: linolsav (PPAR aktivátor lipogén ágens)

LC: Langerhans sejt

LOX: lipoxigenáz

LPS: γ-irradiált, *Escherichia coli* 026:B6 lipopoliszacharid (TLR4 aktivátor; a Gram-negatív fertőzések modellje)

LTA: lipoteichnoinsav (TLR2 aktivátor; a Gram-pozitív fertőzések modellje)

mAChR és nAChR: muszkarinos és nikotinos acetyl-kolin receptor

MAGL: monoacilglicerol-lipáz (az eCB-okat, főként a 2-AG-t lebontó enzim)

MAPK: mitogén-aktivált protein kináz (fontos lipogén kináz kaszkád)

mTOR: „*mammalian target of rapamycin*” (az *acne* patogenezisében kulcsfontosságú jelátviteli molekula)

NAM: negatív allosztérikus modulátor

NAPE-PLD: N-acil-foszfátidil-etanolamin specifikus foszfolipáz D (eCB-okat szintetizáló enzim)

Nav: feszültségfüggő Na⁺-csatorna

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NF-κB: „*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*” (egyebek mellett a gyulladásos folyamatok kialakításában fontos transzkripciósfaktorok)

NHEK: primer normál humán epidermális keratinocita

NIH: National Institutes of Health

NK: negatív kontroll

NL: neutrális lipidek (faggyúlipidek)

NLR: Nod-like receptor (patogén-asszociált molekuláris mintázatot felismerő receptorcsalád)

NO: nitrogén-monoxid

NR1P1: „*nuclear receptor interacting protein 1*” (RIP140); a zsírsejtek TG felhalmozását pozitívan reguláló kulcsgén

NTK: nem transzfektált kontroll

OX₁: orexin receptor-1

PAM: pozitív allosztérikus modulátor

PBS: foszfátpufferelt sóoldat

pk: posztkonfluens tenyészet

PLA₂: foszfolipáz A₂

PPAR: peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptor

PPIA: ciklofillin A (peptidil-prolil izomeráz A)

PTPN22: protein tirozin foszfátáz „nem protein” 22 (az eCB-ok szintézisében szerepet játszó enzim)

Q-PCR: reverz transzkripciót követő, kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció

PI3K: foszfoinozitol-3-kináz

PKA: protein kináz A

PKC: protein kináz C

PL: poláros lipidek

PLA₂: foszfolipáz A₂

RAMBA: retinsav metabolizmust blokkoló ágens(ek) (az *acne* jövőbeli kezelésében alkalmazható kísérleti szerek)

RLR: Rig-like receptor (patogén-asszociált molekuláris mintázatot felismerő receptorcsalád)

RNSi: RNS interferencia (szelektív géncsendesítés, siRNS transzfekció)

RR: ruténium vörös (általános TRP csatorna gátló)

SCR: a szelektív géncsendesítés során kontrollként alkalmazott, homológiát semmilyen ismert mRNS-sel sem mutató „scrambled” RNS konstrukció

SDS-PAGE: nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis

SHIP1: inozitol-foszfát 5' foszfátáz (az eCB-ok szintézisében szerepet játszó enzim)

SINK: „*p65-interacting inhibitor of NF-κB*” (a TRIB3 régebbi elnevezése)

siRNS: a szelektív géncsendesítés során alkalmazott kis, interferáló RNS konstrukció

str.: stratum

SQ: szkvalén

T: tesztoszteron

TASK-1 és -3: KCNK3 és -9 (2 pórusdoménes K⁺ csatornák; lehetséges kannabinoid célpontok)

TBP: teljes betegségpontszám

TC₅₀: az az illesztett görbe alapján becsült koncentráció érték, amelynél az életképesség a kontroll felére csökken

TG: trigliceridek

Th: „helper” T sejt

THC: (–)-*transz*- Δ^9 -tetrahydrokannabinol (a *Cannabis sativa* fő pszichotróp kannabinoidja)

THCV: (–)- Δ^9 -tetrahydrokannabivarin

TLR: Toll-like receptor (patogénekre jellemző molekuláris mintázatot felismerő receptorcsalád)

TNF- α : tumornekrózis faktor- α (gyulladásos citokin)

TREK-1: KCNK2 (mechanoszenzitív 2 pórusdoménés K⁺ csatorna; lehetséges kannabinoid célpont)

TRIB3: „*tribbles homolog 3*” (SINK); az NF- κ B útvonal endogén inhibitora

TRP: tranziens receptorpotenciálú kationcsatornák (főként kalciumra

permeábilis ioncsatorna szupercsalád, melynek egyes tagjai ionotróp kannabinoid receptorként is funkcionálhatnak)

TRPA, TRPC, TRPM, TRPML, TRPP és TRPV: a TRP csatornák „ankirin”, „kanonikus”, „melasztatin”, „mukolipin”, „policisztin”, illetve „vanilloid” alcsoportja

TSLP: „*thymic stromal lymphopoietin*” (az AD patogenezisében fontos keratinocita-eredetű citokin)

VDAC1: feszültségfüggő anioncsatorna-1 (a CBD egyik mitokondriális célpontja)

WE: viasz-észterek

WM: wortmannin (a PI3K kaszkád inhibitora)

WNT: „*Wingless-related integration site*” (a szebocita irányú differenciálódást gátló jelpálya)

ZM: ZM241385 (szelektív A_{2A} receptor antagonist)

2. Bevezetés

Laboratóriumunk évek óta foglalkozik az emberi bőr (kór)élettani folyamatainak különböző aspektusaival, ideértve egyebek mellett az epidermális keratinociták, a dendritikus sejtek, illetve a különféle bőrfüggelékek (faggyú- és verejtékmirigyek, valamint szőrtüszők) vizsgálatát. Ezen kísérleteink eredményei (a bőr élettanának mélyebb megismerésén túl) olyan nagy prevalenciával előforduló bőrbetegségek patomechanizmusának jobb megértéséhez járultak hozzá, mint pl. az *acne*, különféle szőrnövekedési rendellenességek (*hirsutismus*, különböző *alopecia* formák stb.) vagy az *atopias dermatitis* (AD).

Az endokannabinoid rendszer (ECS) és a különböző növényi kannabinoid vegyületek biológiai hatásainak vizsgálata az elmúlt közel harminc évben igen komoly érdeklődésre számot tartó tudományterület volt. A jelen értekezés alapját képező kutatás közvetlen előzményének két, munkacsoportunk által a közelmúltban publikált közlemény tekinthető. Ezekben (i) kimutattuk, hogy a humán faggyúmirigyek (FM) funkcionálisan aktív ECS-rel rendelkeznek, amely meghatározó módon befolyásolja a szebociták differenciálódását és faggyúlipid-termelését (Dobrosi és mtsai., 2008); és (ii) igazoltuk, hogy az endokannabinoidok (eCB) képesek befolyásolni az epidermális keratinociták proliferációját (Tóth és mtsai., 2011a).

Mindezen eredmények ismeretében két irányban folytattuk kísérleteinket. A FM-ek vonatkozásában azt vizsgáltuk meg, hogy egy, a klinikumban már évek óta biztonságosan alkalmazott, nem-pszichotróp növényi kannabinoid, a (-)-kannabidiol (CBD) miként befolyásolja a szebociták biológiai folyamatait, aminek az *acne* vagy éppen a „szárazbőr szindróma” kezelésében lehet jelentősége. Az epidermális keratinociták esetében pedig *in vitro* gyulladásmodellben vizsgáltuk az eCB-tónus szabályozásában kulcsfontosságú zsírsavamid-hidroláz (FAAH) enzimet, ami közelebb vihet a bőrgyulladások, így például az AD patogenezisének jobb megértéséhez és új terápiás megoldások kifejlesztéséhez.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A bőr

Behrens tanácsos fent idézett megállapításának papírra vetésekor Thomas Mann még nem tudhatta, hogy a megdöbbenőnek, megbotrántoztatónak szánt

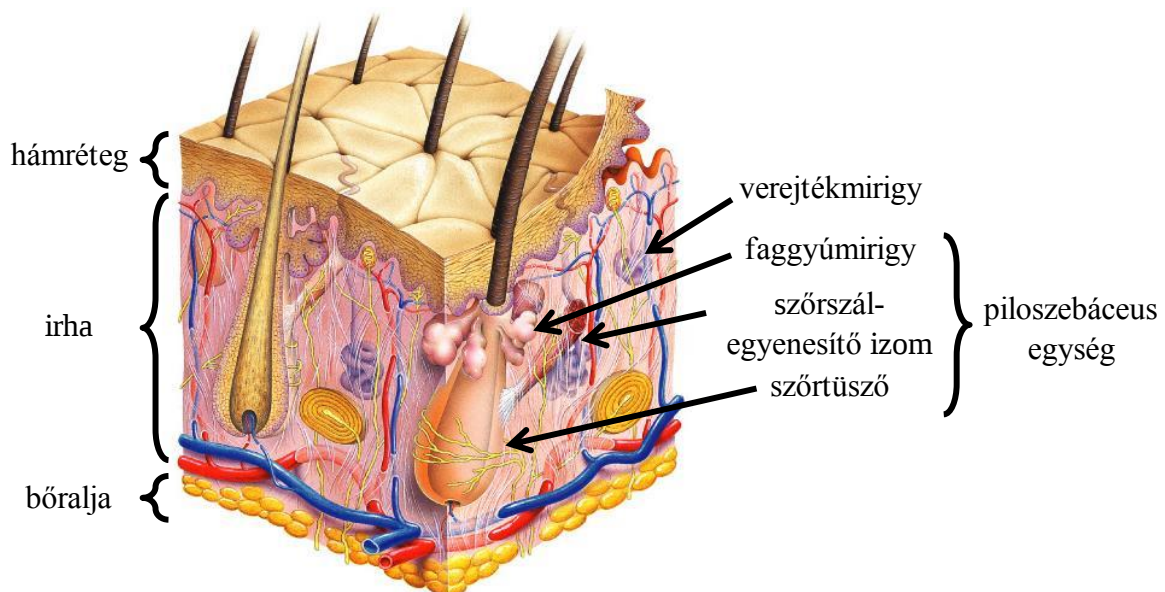
„Tehát a bőrről. Mit is beszéljek magának az érzékelő burkáról? A bőr a maga külső agyveleje... mert a központi idegrendszer, tetszik tudni, csupán a külső bőrréteg kissé átalakult képződménye...”

Thomas Mann: *A varázsheggy*

kijelentés mintegy 90 év múltán mennyire aktuális lesz. Valóban; az elmúlt évtizedek során az emberi bőr fokozatosan kitört a „passzív védvonal” fontos, ám kissé unalmas szerepéből, és ma már tudjuk, hogy kültakarónk különböző sejtjeinek nagyon is aktív, magas szinten koordinált együttműködése szükséges a bőr különböző feladatainak megszervezéséhez.

3.1.1. Az emberi bőr felépítése

Bőrünk az egyik legnagyobb szervünk; felülete elérheti a 1,5-2 m²-t, tömege pedig a testtömeg 15-20%-át is kiteheti (Csaba és Nemeskéri, 2002; Ross és mtsai., 2007). A bőr az öt érő sokrétű kihívásoknak speciális anatómiai és szövettani felépítése révén képes megfelelni.



1. ábra Az emberi bőr felépítése sematikusan (forrás: Jessica M. Taylor- Human Anatomy & Physiology Classroom Website: <http://ldtstudio.coe.uga.edu/course/view.php?id=111>; módosítva; letöltve: 2015. november 1.)

Legkülső rétegét, a hámréteget (epidermisz) döntően a belülről kifelé haladva szigorúan szabályozott módon egyre differenciálódó, végül pedig apoptotizáló keratinociták alkotják. A középső réteg, az irha (dermisz) gazdagon erezett, laza kötőszövetes réteg, míg a legbelső kompartmentet, a bőralját (szubkutisz, hipodermisz) zsírsejtek dominálják (Csaba és Nemeskéri, 2002; Ross és mtsai., 2007; **1. ábra**).

Bőrünk legfontosabb feladata, hogy a komplex epidermális barrier (KEB) létrehozásával elhatárolja és védelmezze testünket a külvilág változatos behatásaival szemben; emellett azonban számos további szenzoros, endokrin (*in situ* hormontermelés) és „egyéb” (raktározás, transzport, hőszabályozás és exokrin) funkciót is betölt (Csaba és Nemeskéri, 2002; Ross és mtsai., 2007; Bukowsky, 2010; Draelos és Pugliese, 2011). Tekintettel arra, hogy a bőr (kór)élettanának mélyreható áttekintése messze meghaladná jelen értekezés kereteit, most csak a KEB rövid bemutatására történik kísérlet.

3.1.2. *A bőr komplex barrierfunkciói*

Amint arról már szó esett, bőrünk talán legfontosabb feladata, hogy védelmet nyújtson a külvilágból érkező számos potenciális ártalommal szemben, legyen szó akár fizikai (pl. hőmérsékleti változások, mechanikai bántalom, UV sugárzás stb.), akár potenciálisan patogén mikrobák jelentette biológiai kihívásokról. Ez a védelem komplex fizikokémiai, immunológiai és (tágabb értelemben) mikrobiológiai barrierfunkciók révén alakul ki (összefoglalják: Elias és Feingold, 2006). Szemben a korábban elfogadott dogmával, ma már úgy gondoljuk, hogy a bőrünk által kifejtett védelem nem magyarázható kizárólag a speciális anatómiai felépítés által biztosított „passzív” védelemmel, hanem az itt megtalálható különböző sejtféleségek koordinált, aktív és reaktív együttműködése szükséges hozzá.

A KEB elsődleges védvonalát a *fizikokémiai barrier* képezi, ami döntően az epidermális keratinociták differenciálódásának eredményeként áll elő (Madison, 2003; Proksch és mtsai., 2008; Jensen és Proksch, 2009; Rawlings, 2010; Oláh és mtsai., 2012). Ezek a sejtek

fejlődésük során egy komplex, több elemében Ca^{2+} -függő jelátvitel által szabályozott folyamaton mennek keresztül, amíg eljutnak az osztódó sejteket tartalmazó *stratum basale*ből a *str. spinosum*on és a *str. granulosum*on keresztül a legkülső védvonalat létrehozó *str. corneum*ig¹. Ennek során differenciáltsági állapotuk függvényében megváltozik az általuk kifejezett citokeratin profil, különféle speciális fehérjéket és lipideket termelnek, végül pedig apoptotizálnak, elveszítik sejtmagjukat, és különleges extracelluláris mátrixba ágyazva, mint „tégla a habarcsban”, kialakítják testünk elsődleges védvonalát (Madison, 2003; Proksch és mtsai., 2008; Jensen és Proksch, 2009; Rawlings, 2010; Oláh és mtsai., 2012).

A folyamat során az egyik központi jelentőségű molekula a filaggrin (FLG), ami az epidermisz legkülső rétege, a *str. corneum* felé haladó sejtekben Ca^{2+} -aktivált peptidázok hatására képződik az előalakjából, hogy azután koordinálja számos további protein (citokeratinok és egyéb intermedier filamentumok stb.) aggregációját. A *str. corneum*ban a terminálisan differenciált hámsejtek egy speciális, nem vízdékes, elszarusodott proteinburokban („*cornified envelope*”) helyezkednek el, ami különféle Ca^{2+} -függő enzimek (transzglutaminázok) működésének eredményeként alakul ki döntően involucrinból és lorikrinból. Ez utóbbi molekulák a sejtek közötti kapcsolatokat biztosító egyéb fehérjékkel (korneodezmoszóma proteinek, kadherine, gap és tight junction fehérjék stb.) együtt stabilizálják a hámsejtek legkülső rétegét. Végezetül a FLG (és további fehérjék) proteáz-mediált lebontása nagy vízmegkötő képességű aminosavak felhalmozódásához vezet, ami alapvető jelentőségű a bőr megfelelő hidratáltságának fenntartásában (Madison, 2003; Proksch és mtsai., 2008; Jensen és Proksch, 2009; Rawlings, 2010; Oláh és mtsai., 2012).

A *fizikokémiai barrier* közkedvelt „tégla és habarcs” metaforájában a „habarcs” az intercelluláris „szigetelést” elősegítő speciális lipideket jelképezi, melyek szintén a differenciálódó hámsejtekben termelődnek. A keratinocitákban előbb lamelláris testeknek

¹ A tenyér és a talp bőrén a *str. corneum* és a *str. granulosum* között elkülöníthető még egy szövettani réteg, a *str. lucidum*.

nevezett lipideket tartalmazó granulumok halmozódnak fel, majd ezek a *str. granulosum* és a *str. corneum* határán exocitózissal a sejtközötti térbe ürülnek, vízhatlan védőréteget képezve a bőrben, és biztosítva annak enyhén savas pH-ját. Ezt a védelmet lipidomikai szempontból a bőrfelszínre ürülő faggyú teszi teljessé (Madison, 2003; Proksch és mtsai., 2008; Zouboulis és mtsai., 2008; Jensen és Proksch, 2009; Rawlings, 2010; Oláh és mtsai., 2012).

A bőr sejtei emellett számos bioaktív molekulát, ún. antimikrobiális peptideket (AMP) és lipideket (AML) is termelnek, melyek kulcsfontosságúak a védelem következő szintjeinek, az *immunológiai* és az ezzel szoros kölcsönhatásban álló *mikrobiológiai barrier*nek a kialakításában (Gallo és Huttner, 1998; Bardan és mtsai., 2004; Braff és Gallo, 2006; Niyonsaba és mtsai., 2009; Tóth és mtsai., 2011b).

Bőrünkön nemcsak egyéneként, de azon belül testtájanként is nagyon jellegzetesen eltérő mikrobaközösség található. A korábban általánosan elfogadott, „kommenzális” jellegű együttélési modell (mely szerint az együttélés előnyös a mikrobáknak és többé-kevésbé közömbös az emberi szervezetnek) napjainkra módosulni látszik. A korábban uralkodó álláspont szerint a bőrfelszínt benépesítő mikrobák elsősorban a *kolonizációs rezisztencia* révén fejtenek ki jótékony hatást, azaz a nem patogén flóra az élettér elfoglalásával és a tápanyagok felhasználásával kiszorítja a potenciálisan patogén törzseket. Az utóbbi évek felfedezéseinek fényében azonban egyre inkább olybá tűnik, hogy a mikrobióta-bőr kölcsönhatás a bőr élettani funkcióinak fenntartásában sokkal fontosabb, mint azt korábban feltételeztük; a kapcsolat pedig kommenzális együttélés helyett sokkal inkább egy dinamikus önszabályozó, szimbiotikus jellegű „párbeszéd”-ként érthető meg a bőr és a különféle mikrobák között (Gallo és Nakatsuji, 2011; Kranich és mtsai., 2011; Littman és Pamer, 2011). Ennek a „párbeszéd”-nek az egyik résztvevője az *immunológiai barrier*.

A bőr immunrendszerét számos kiváló összefoglaló közlemény tekinti át (Bos és Kapsenberg, 1993; Kupper és Fuhlbrigge, 2004; Béke és mtsai., 2015), amelyekből az

érdeklődő olvasó átfogó képet kaphat, így jelen értekezés csak néhány kulcspontra kiemelésére szorítkozik. Ezek között az első, hogy a bőr immunrendszere korántsem redukálható kizárólag a „professzionális” immunsejtekre (pl. hízósejtek, szöveti makrofágok, Langerhans sejtek [LC], különféle dendritikus [DC] és T sejtek stb.), hanem olyan, első pillantásra „ártatlan civilnek” tűnő sejtek is meghatározó jelentőségűek benne, mint az epidermális keratinociták vagy a faggyúmirigyek sejtjei, a szebociták. Ezek a sejtek ugyanis nemcsak a mikrobák jelenlétének felismerését lehetővé tevő mintázatfelismerő receptorokat (Toll-like [TLR], Nod-like [NLR] és Rig-like receptorok [RLR]) fejeznek ki, hanem citokin és kemokin expressziójuk révén képesek elindítani, fenntartani és szabályozni is a bőr gyulladásos folyamatait. Ráadásul a már említett AMP-ek és AML-ek révén maguk is aktív szabályozói a kommenzális/szimbiotikus flóra növekedésének (Bos és Kapsenberg, 1993; Kupper és Fuhlbrigge, 2004; Béke és mtsai., 2015).

3.1.3. Az atopias dermatitis (AD)

Az atopias dermatitist (AD-t; **2. ábra**) gyakran emlegetik „a” barrier betegséggént, hiszen ebben az esetben a KEB valamennyi építőelemének, azaz a *fizikokémiai*, az *immunológiai* és a *mikrobiológiai* barriernek a károsodása is megfigyelhető (Kubo és mtsai., 2012; Kuo és mtsai., 2013).



2. ábra Az atopias dermatitis jellemző klinikai képe

(forrás: <https://www.aad.org/dermatology-a-to-z/diseases-and-treatments/a---d/atopic-dermatitis>; letöltve: 2015.10.30.)

Ez a különösen a fejlett ipari országokban gyakori (becslések szerint a gyermekek 15-30%-át és a felnőttek 2-10%-át érinti; Bieber, 2008), krónikus bőrgyulladással jellemezhető megbetegedés az életkor előrehaladtával gyakran társul *ételallergiával*, *allergiás rhinitisszel* és *asthma bronchiale*val („atopias menetelés”; Spergel, 2010).

Patogenezise a mai napig sem tisztázott teljes mértékben. A két fő paradigma az „*outside-in*” („kintről be”) és az „*inside-out*” („bentről ki”) hipotézis (Boguniewicz és Leung, 2011). Az első szerint a betegség kiinduló lépése a fizikokémiai barrier (pl. FLG mutáció miatti) károsodása, ami lehetővé teszi patogén, illetve fakultatív patogén mikrobák (pl. *Staphylococcus aureus* törzsek) kolonizációját és penetrációját a bőr mélyebb rétegei felé, ahol azok jellegzetes, Th₂ polarizációjú immunválaszt indukálnak. Ez pedig (véltetőleg a termelődő citokinek révén), hozzájárul a fizikokémiai barrier további leépüléséhez. Ezzel szemben a „bentről ki” elmélet a bőr immunrendszerének kisiklását tartja elsődlegesnek (Kuo és mtsai., 2013; Wilson és mtsai., 2013).

Bár az AD-es ördögi körben ennek a „tyúk vagy tojás” típusú kérdésnek az eldöntésére egyelőre még várnunk kell, az bizonyos, hogy az epidermális keratinociták központi szereplői a folyamatnak. Egyfelől a fizikokémiai barrier felépítése elképzelhetetlen élettani hámsejtfunkciók nélkül, másfelől pedig a keratinociták által termelt citokinek - különösképpen a „*thymic stromal lymphopoietin*” (TSLP) - rendkívül fontosak az AD-ben kialakuló immunválasz Th₂ irányú polarizálásában, illetve a barrier károsodásához közvetlenül is nagyban hozzájáruló, kénzó viszketés kiváltásában (Kuo és mtsai., 2013; Wilson és mtsai., 2013).

Mindez tehát azt jelenti, hogy a hámsejtek immunológiai folyamatainak és az ezeket szabályozó jelátviteli rendszereknek a mélyebb megismerése közelebb vihet az AD patogenezisének jobb megértéséhez, és így a jelenleg elérhetőnél hatékonyabb, valódi oki terápia kifejlesztésének a reményével kecsegtet. Ezért jelen tanulmány keratinocitákra

fókuszáló részében egy ilyen lehetséges szabályozó, a 3.2. *alfejezetben* részletesen bemutatandó *endokannabinoid rendszer* működésének és hámsejtekre gyakorolt hatásainak mélyebb megértésére tettünk kísérletet.

3.1.4. A humán faggyúmirigyek (FM) biológiája²

A faggyúmirigyek (FM) a bálnák és delfinek kivételével valamennyi emlősállat bőrében megtalálható miniszervek (Montagna, 1963). Emberben a tenyerek és talpak kivételével az egész testen előfordulnak. Általában a szőrtüszőkhöz kapcsolatosan helyezkednek el, és velük, valamint a szőrszál-egyesítő izommal funkcionális egységet („*piloszebáceus egység*”) alkotnak³ (Thody és Shuster, 1989; Csaba és Nemeskéri, 2002; Ross és mtsai., 2007; Tóth és mtsai., 2011b). A FM-ek mérete és denzitása testtájanként jelentős eltérést mutat. Benfenati és Brillanti korai munkája nyomán tudjuk, hogy középkorú férfiak esetén a FM-ek száma az arcon és a fejbőrön a legnagyobb; denzitásuk itt elérheti a 876 db/cm²-t is, míg máshol ez a szám 100 vagy esetenként 50 alatti. Az élet folyamán a számuk jellemzően nem változik, aktivitásuk azonban jelentősen módosul (Benfenati és Brillanti, 1939; Gelmetti, 2014; Tsatsou és Zouboulis, 2014).

A FM-ek elsődleges feladata a neutrális lipidekben gazdag, összetételében jelentős fajspecifitást mutató faggyú termelése. Ezt a különleges szekrétumot emberben döntően trigliceridek (TG; 45%), viasz-észterek (WE; 25%), szkvalén (SQ; 12%), szabadzsírsavak (FFA; 10%), koleszterol (CH; 2%) és koleszterol-észterek (CE; 4%), valamint digliceridek (DG; 2%) alkotják. Az itteni lipidek egy része (pl. a WE-ek vagy a SQ) teljesen faggyú-

² Jelen értekezés keretében terjedelmi okokból nincs mód a téma teljes mélységű feldolgozására. A fejezetben idézett kiváló áttekintő közlemények mellett a FM-ek és az *acne* iránt komolyabban érdeklődőknek feltétlenül érdemes elolvasni a FM-ek (pato)fiziológiájának valamennyi aspektusát felölelő, nagyszerű hiánypótló művet, a Christos C. Zouboulis, Andreas D. Katsambas és Albert M. Kligman szerkesztésében 2014-ben megjelent „*Pathogenesis and treatment of acne and rosacea*” című könyvet.

³ Újabban felmerült egy ennél is kiterjedtebb, a verejtékmirigyet is magában foglaló egység, a „*szőrklaszter*” fogalmának bevezetése is (Poblet és mtsai., 2015).

specifikus, és a testben máshol nem vagy csak nagyon rövid életidővel fordul elő (Pappas, 2014)⁴.

A holokrin szekréció révén végbemenő faggyútermelés során a sejtek előbb lipideket halmoznak fel a citoplazmájukban, majd apoptotizálnak és membránjaik széttöredeznek. A folyamat eredményeként a lipidekben gazdag sejtörmelék (a faggyú) a bőrfelszín felé ürül (Thody és Shuster, 1989; Csaba és Nemeskéri, 2002; Ross és mtsai., 2007). Az állatvilágban ez a folyamat kulcsfontosságú a bunda impregnálásában, és esetenként bizonyos feromonok révén hozzájárul a territórium kijelöléséhez, valamint a szexuális viselkedés szabályozásához (összefoglalják: Zouboulis és mtsai., 2008). Mindezen funkciók azonban emberben sokáig alárendelt jelentőségűnek tűntek, hiszen, bár a bőr lipidjeinek jelentős részét a FM-ek termelik, ezek szerepe a fizikokémiai, valamint immunológiai barrier kialakításában hosszú ideig ismeretlen volt (Kligman, 1963). Éppen ezért a humán FM-ekre sokáig jószerivel haszontalan „evolúciós reliktumként” gondoltak; egy fejlődéstani maradványként, ami egy „élő fosszília múlttal, de jövő nélkül” (Kligman, 1963). Mára már ismert, hogy a FM-ek már az intrauterin életben is kiemelten fontosak a magzati bőr védelmében, posztnatálisan pedig a bőrfelszín lipidjeinek háromdimenziós elrendeződéséért felelősek, ami hozzájárul a fizikokémiai barrier integritásának fenntartásához. Emellett jelentősek a bőr fényvédelmében, (a verejtékmirigyekkel együttműködve) a hőszabályozásban vagy az antioxidánsok transzportjában is. Hatással vannak a szőrnövekedésre, autonóm endokrin szervecskék (expresszálják a szteroidszintézishez szükséges enzimeket, és képesek androgén hormonok *in situ* termelésére), valamint őssejtraktárként is funkcionálnak (összefoglalják: Zouboulis és mtsai., 2008). Ráadásul sejtjeik, a sebociták immunkompetens sejteknek tekinthetőek, hiszen számos patogén-asszociált molekuláris mintázatot felismerő receptor (pl. TLR2, -4, -6, CD14)

⁴ Az arányok csak hozzávetőleges pontosságúak; az ezt vizsgáló kutatók jelentős donor és módszer-specifikus eltéréseket találtak méréseik során. Emellett az is megjegyzendő, hogy egyes lipidek élettani körülmények között is nagymértékben hidrolizálódnak a kommenzális/szimbiotikus flóra tagjai által, így a testfelszínre jutó faggyú összetétele a lokális mikrobiótától is nagyban függ (Pappas, 2014).

kifejezésével nemcsak érzékelik a potenciálisan veszélyt jelentő patogéneket, hanem gyulladásos citokinek (pl. interleukin [IL]-6, IL-8, tumornekrózis faktor [TNF]- α stb.) termelésével fontos szerepet játszanak a lokális gyulladásos folyamatok elindításában és fenntartásában. AMP-ek (pl. LL-37 katelicidin [CAMP], β -defenzinek stb.) és AML-ek (pl. szapiénsav, palmitinsav [C16:1], olajsav [C18:1], laurilsav [C12:0]⁵ stb.) termelésével pedig maguk is aktívan kiveszik a részüket a bőr és a mikrobióta egyensúlyának fenntartásából (összefoglalják: Zouboulis és mtsai., 2008; Nagy és Kemény, 2014; Zouboulis és Makrantonaki, 2014). A FM-ek vitathatatlan klinikai jelentőségét azonban az adja, hogy az egyik legnagyobb prevalenciájú bőrbetegség, a kizárólag az emberre jellemző *acne* kialakulása is hozzájuk köthető (Zouboulis és mtsai., 2008; Zouboulis és Dessinioti, 2014a).

3.1.5. Az *acne*

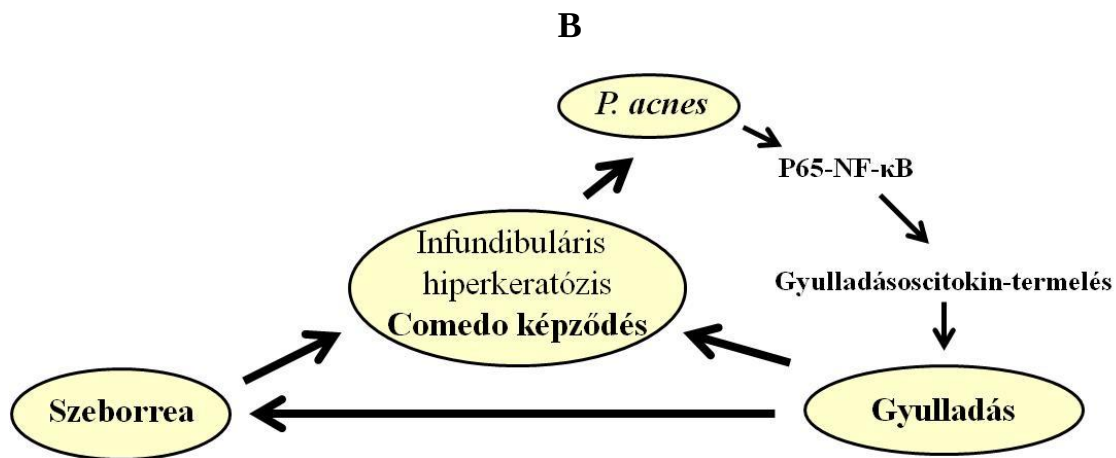
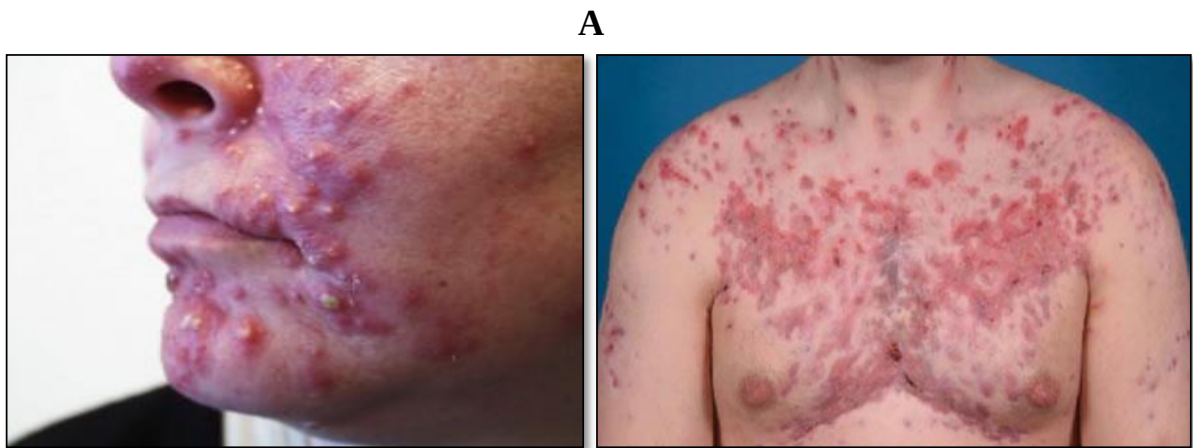
Az *acne* (pattanásosság, „zsírtüszeg”) az egyik legnagyobb prevalenciájú emberi bőrbetegség (a fiatalkori *acne* előfordulása 80% körüli), amely hosszabb-rövidebb ideig szinte mindenkit érint valamilyen formában (Zouboulis és mtsai., 2008; Kurokawa és mtsai., 2009; Zouboulis és mtsai., 2014a).

„Haj, úrfi, az bizony a bőrnek egy rettenetes elfajzása... Az egyetlen gyógyír rá a varangyos béka mája, azt kötőzd szorosan a torkodra, s állj holdtölte idején meztelenül angolnahalak kivájt szemével telő hordóba...”

J. K. Rowling:
Harry Potter és a Főnix Rendje

Már az ókori görög és római orvosok is ismerték (az „*acne*” szó egyébként maga is görög eredetű) és egyebek mellett mézzel, ásványvízzel, szappanokkal és kéntartalmú kenőcsökkel javasolták kezelni (Zouboulis, 2014). Bár nem tekinthető közvetlenül életet veszélyeztető betegségnek, mégis különösen a súlyosabb és/vagy látható testfelszínre lokalizálódó formák jelentős pszichés terhet róhatnak a betegekre, ami akár igen komoly másodlagos lelki betegségek (szorongás, depresszió, legrosszabb esetben akár szuicid készlettség) kialakulásához vezethetnek (Saitta és mtsai., 2011a; Saitta és mtsai., 2011b).

⁵ Ez utóbbinak tudománytörténeti szempontból érdekes magyar vonatkozása is van, felfedezője ugyanis (még prágai vegyészként) a később az 1848-49-es szabadságharc zseniális hadvezéréként ismertté vált, méltatlanul vitatott megítélésű Görgei Artúr tábornok volt (<http://mult-kor.hu/cikk.php?id=13743>).



3. ábra Az acne súlyos formáinak klinikai képe (A)
és patogenezisének sematikus áttekintése (B)

(A: forrás: <http://clickhowto.com/how-to-deal-with-acne/> és <http://www.primehealthchannel.com/acne-conglobata-pictures-causes-prognosis-and-treatment.html>; letöltve: 2015.10.30.)

Az *acne* kóroktana a mai napig sem tisztázott teljes mértékben, bár tény, hogy az elmúlt években jelentős előrelépés történt a betegség kialakulásához vezető patogenetikai lépések megismerésében és megértésében. A „klasszikus” megközelítés szerint a folyamat első lépése a „valamilyen okból” fokozódó mennyiségű és ezzel párhuzamosan megváltozó összetételű faggyú termelése, azaz a szeborrea. A faggyú összetételében bekövetkező változások (pl. csökkent esszenciáliszsírsav-tartalom, fokozott lipidperoxidáció, csökkent E-vitamin koncentráció stb.) elősegítik az infundibuláris hiperkeratózis és ezzel a comedok kialakulását (Tsatsou és Zouboulis, 2014). A pangó faggyúban felszaporodó *Propionibacterium acnes* törzsek ezután gyulladásos folyamatok elindulásához vezetnek, amik egyebek mellett a lokális IL-1 α termelés megnövekedése révén hozzájárulnak a hiperkeratinizáció fokozódásához,

illetve fokozzák a lipidtermelést is, önmagát erősítő ördögi körré zárva az *acne* patogenezisének egyes lépéseit (Dessinioti, 2014), és kialakítva a jellegzetes klinikai megjelenést (**3. ábra**). A „modern” felfogás ezzel szemben a gyulladásos folyamatok elsődleges fontosságát húzza alá, és a további lépéseket ezek következményeként értelmezi (Zouboulis és Dessinioti, 2014a).

Az mindenesetre bizonyos, hogy az *acne* kialakulása összefügg bizonyos életmódbeli sajátosságokkal („nyugati típusú”, sok tejet és magas glikémiás indexű tápanyagokat tartalmazó étrend), illetve hormonális változásokkal (magas androgénszint) (Zouboulis és Makrantonaki, 2014). Ezek mellett a genetikai predispozíció szerepe sem elhanyagolható, hiszen számos gén polimorfizmusa és mutációja vezethet *acneszerű* léziók kialakulásához (pl. a fibroblaszt eredetű növekedési faktor receptor-2 [FGFR2] funkciónyerékes mutációja [Apert szindróma], a mucin 1 glikoprotein, a TNF- α , az IL-1 α és a citokróm P450 [CYP]-1A1 polimorfizmusai stb.) vagy éppen az *acne* kialakulásával szembeni védettséghez (inzulinszerű növekedési faktor-1 [IGF-1] deficiencia [Laron szindróma]) (Melnik, 2014). Meglepő módon azonban a közhiedelemmel ellentétben az *acne* dohányzással való összefüggése nem egyértelmű (Rigopoulos és Korfitis, 2014).

A patogenezis leírásához hasonlóan az *acne* kezelése kapcsán is számos kihívással küzdünk. A jelenlegi szakmai irányelvek a betegség súlyosságához igazodó, személyre szabott terápiás ajánlásokat tesznek, melyek során topikális és szisztémás antibiotikum kezelés, anti-androgén terápia, valamint azelainsav, benzoil-peroxid, illetve topikális és szisztémás izotretinoin (13-*cisz*-retinsav) kezelés képezheti a terápia gerincét (Zouboulis és Liakou, 2014), szükség esetén lokális keratolízissel, mikrodermabrázióval, cryoterápiával, lokális gyulladásgátlók vagy esetleg fototerápia alkalmazásával kiegészítve (Kaminsky, 2014; Xiang és Gollnick, 2014). A különféle terápiás lehetőségek közül hatékonysága és sokoldalúsága (csökkenti a lipogenezist és a kivezetőcső hiperkeratinizációját, gátolja a

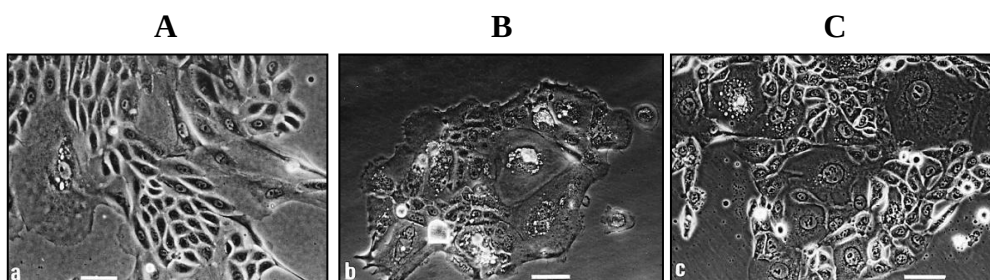
gyulladásos folyamatokat, valamint visszaszorítja a *P. acnes* növekedését) miatt kiemelkedik az izotretinoin, amely túlzás nélkül a leghatékonyabb *anti-acne* szernek tekinthető. Sajnálatos módon azonban (elsősorban szisztémás) alkalmazásakor számos, esetenként igen súlyos mellékhatás (pl. anémia, neutropénia, trombocitopénia, májkárosodás, teratogenitás, pszichés problémák stb.) kialakulásának lehetőségével kell számolni (Kurokawa és mtsai., 2009; Katsambas és Dessinoti, 2014).

Mindezek alapján érthető, hogy a hatékony, lehetőség szerint a betegség minél több patogenetikai aspektusát egyidejűleg kedvezően befolyásoló és egyszersmind a most elérhetőknél kedvezőbb mellékhatásprofillal rendelkező, valamint a szebociták homeosztatikus funkcióit nem károsító kezelési módok felderítése miért áll napjaink *acne*- és FM-irányú kutatásainak homlokterében.

3.1.6. *A humán FM-ek modellje: az SZ95 humán szebocita sejtvonal*

A FM-ek (kór)élettanának mélyebb megismerését az elmúlt évtizedek során nagyban hátráltatta, hogy vizsgálatukra nem állt rendelkezésre megbízható, a betegség teljes komplexitását leképező állatmodell⁶; a primer humán szebociták izolálása és tenyésztése pedig rendkívül nehézkes folyamat, ráadásul a sejtek nem is tarthatók fenn néhány passzáznál tovább tenyészetben (Xia és mtsai., 1989; Mirshahpanah és Maibach, 2007; Zouboulis és mtsai., 2008; Tóth és mtsai, 2011b). Éppen ezért a szebociták biológiájának megismerésében valóságos forradalmat jelentett, amikor 1995-ben Christos C. Zouboulis és munkatársai egy 87 éves nőbeteg arcbőréből izolált primer szebocitákat SV-40 vírus „nagy T”-antigénjével stabilan transzfektálva létrehozták az első humán immortalizált szebocita sejtvonalat, melyet SZ95-nek neveztek el (Zouboulis és mtsai., 1999).

⁶ Ennek oka a FM-ek fentiekben már tárgyalt nagyfokú fajspecifitása. A jelenlegi modellek (pl. a Motoyoshi-féle nyúlfül-comedo modell; Motoyoshi, 1983) csak a betegség egyes aspektusait (pl. a comedo képződést) képesek (úgy-ahogy) modellezni.



4. ábra A SZ95 sebociták típusos morfológiája még hosszú tenyésztést követően is fennmaradt (Zouboulis és mtsai., 1999)

(A) A donor primer sebocitái a transzfekció előtt (második passzázs). (B) Az SZ95 sebociták első passzázs a transzfekció után. (C) Az SZ95 sebociták morfológiája az 50. passzázs követően.

Bár a sejtvonal aneuploid, mégis igen stabilan őrzi a primer sebociták fenotípusos (4. ábra) és funkcionális sajátosságait (antigénexpressziós-profil, a lipidom összetétele stb.); immundeficiens egerekbe xenotranszplantálva pedig *in vivo* képes volt ismét FM-szerű képződményekké differenciálódni (Lo Celso és mtsai., 2008)

Az SZ95 sebociták 1995-ös létrehozásuk óta számos tanulmányban szolgáltatott értékes információkat a humán FM-ekről (Zouboulis és mtsai., 1999; Zouboulis és mtsai., 2008; Tóth és mtsai., 2011b). Az azóta eltelt időben két további humán FM-eredetű sejtvonalat is sikerült előállítani (az SZ95-nél alkalmazott módszerrel immortalizált *SEB1*, illetve a Humán Papillómavírus E6 és E7 antigénekkal transzfektált *Seb-E6E7* sejteket). Az ezeken nyert eredmények többségükben egybecsengtek az SZ95 sebociták alkalmazása során találtakkal, újra megerősítve ezzel a modell relevanciáját (Zouboulis és Dessinioti, 2014b).

Mindezen eredmények és adatok fényében a humán sebociták biológiájának jobb megértésére irányuló kísérleteinket munkacsoportunk már a múltban is a legjobban karakterizált sejtmoddell, az SZ95 sebociták felhasználásával végezte (Dobrosi és mtsai., 2008; Tóth és mtsai., 2009), és jelen kísérleteink során is ezen sejteket választottuk elsődleges modellünknek. Vizsgálatainkat az *in vivo* és klinikai relevancia növelésére teljes vastagságú humán bőr szervkultúrával (hSOC) egészítettük ki, ami az állatmodellek már említett sajnálatos hiányában (Mirshahpanah és Maibach, 2007) a humán FM-ek jelenleg elérhető

leginkább „*in vivo*-szerű” modellje a pre-klinikai vizsgálatok szintjén (Lu és mtsai., 2007; Tiede és mtsai., 2009; Hinde és mtsai., 2013).

3.2. A(z *endo*)kannabinoid rendszer

3.2.1. Történeti áttekintés: Vadkenderhasználat az ókortól napjainkig

Megannyi ránk maradt írott emlék tanúskodik arról, hogy a vadkendert (*Cannabis sativa*) már az ókorban is számos kultúrában használták előszeretettel gyógyító, „rekreációs” vagy éppen spirituális célzattal.

„Te pedig végy drága fűszereket, híg mirhát ötszáz síkfűsért, jóillatú fahéjat fél ennyit, kétszáz ötvenért, és illatos kalmust is kétszáz ötvenért. Kásiát pedig ötszázért, a szent síkfűs szerint, és egy hin faolajt... Az Izráél fiainak pedig így szólj: Szent kenetnek olaja legyen ez nekem, a ti nemzetségeitekénél is.”
2. Móz. 30,23-25, 31.

Valóban; a Távol-Kelettől az Asszír birodalmon át az ókori Görögországig számos helyen van nyoma annak, hogy a „klasszikus” felhasználási módok (pl. kötélverés) mellett a vadkender különleges, hangulati életre, realitáskontrollra vagy fájdalomérzetre gyakorolt hatásait is kiaknázták, valamint számos betegség és kórállapot (pl. sebek vagy galandférgesség) kezelésében is előszeretettel alkalmazták (Sula, 1975; Mechoulam, 1986; Butrica, 2002). Olyan elmélet is van, mely szerint a bibliai *szent kenet* egyik alkotója is a vadkender volt: ezen elképzelés szerint a „*kaneh-bosim*” (קנה-בשם) egyszerű fordítási hiba miatt lett „illatos kalmus”-ként, azaz gyakorlatilag cukornádként azonosítva, hiszen a „*kaneh*” nemcsak nádat, hanem kendert is jelenthet (Sula, 1975)⁷.

Akárhogy is, az kétségtelen, hogy az emberek a világ számos pontján észrevették, hogy a vadkender különböző módokon történő fogyasztását sajátos élettani (pl. analgetikus hatások stb.) és pszichés reakciók követhetik (ellazultság érzése, elmélkedésre való hajlam, esetenként szorongás stb.). Ezen hatások részletekbe menő tanulmányozása az 1900-as évek második felében, a növényből készült kábítószeres (marihuána, hasis) elterjedésével párhuzamosan

⁷ Bár valóban izgalmas elképzelés, a rend kedvéért meg kell jegyeznünk, hogy az ószövetség-szakértők döntő többsége nem osztja ezt a nézetet.

bontakozott ki; hátterük tudományos igényű magyarázatára azonban egészen a XX. század végéig várni kellett.

3.2.2. A növényi kannabinoidok (FK)

A „különleges” élettani hatásokért felelős molekulák, azaz a „fito-” vagy növényi kannabinoidok (FK)⁸ közül elsőként a kannabinolt (CBN) sikerült izolálni a XIX. század végén⁹. Ezt az 1930-as -40-es években követte előbb a CBN szerkezetének feltérképezése, majd a vegyület szintézise, végül pedig (döntően a méltatlanul elfeledett Roger Adams erőfeszítéseinek eredményeként) újabb FK-ok (a (-)-kannabidiol [CBD], illetve a tetrahidrokannabinol [THC]) azonosítása (áttekinti: Pertwee, 2006). Érdekes módon mindezen eredmények csaknem két évtizeden át szinte visszhangtalanok maradtak, mígnem a Raphael Mechoulam vezette munkacsoportnak a korábbiaknál pontosabban sikerült leírnia előbb 1963-ban a CBD, majd 1964-ben a THC (egész pontosan a „(-)-transz- Δ^9 -tetrahidrokannabinol”) kémiai struktúráját (Mechoulam és Gaoni, 1965a és b). Ezen kezdeti lépéseket követően a múlt század második felében számos további FK leírására került sor a vadkenderben, így napjainkra az ismert vegyületek száma meghaladja a százat (Russo, 2011); sőt, a közelmúltban a *Cannabis sativa* sejtmagi¹⁰ és kloroplasztisz genomjának (Vergara és mtsai., 2015) szekvenálására is sor került, ami újabb lendületet adhat a FK kutatásoknak.

„Klasszikus”¹¹ FK-oknak a *Cannabis sativa*ból izolálható, közös prekursorokból származó terpeno-fenol vegyületeket nevezzük, melyeket szerkezetük finomabb sajátosságai

⁸ Érdekes módon a FK-ok növényben játszott szerepe a mai napig sem tisztázott. Jelenleg a legvalószínűbb feltételezés az, hogy egyes FK-ok a mitokondriális funkciók negatív regulálásával nekrózist okoznak (Morimoto és mtsai., 2007; Shoyama és mtsai., 2008), de ez, különösen a FK-ok nagy számának ismeretében meglehetősen elnagyolt, kevésbé kielégítő elméletnek tűnik.

⁹ Tudománytörténeti szempontból érdekes, hogy a Pallas 1893-as kiadású, magyar nyelvű nagylexikona már ismeri és néven nevezi a *Cannabis sativa* „hathatós gyantájának” egyes alkotóit, a „mérges” „tetanokannabin”-t és az „altató” „kannabin”-t, melyek alkoholos kivonatát (ópium helyett) altatásra javasolja használni.

¹⁰ Ezzel kapcsolatban bővebb információ a <http://csativa.elasticbeanstalk.com/> honlapon érhető el.

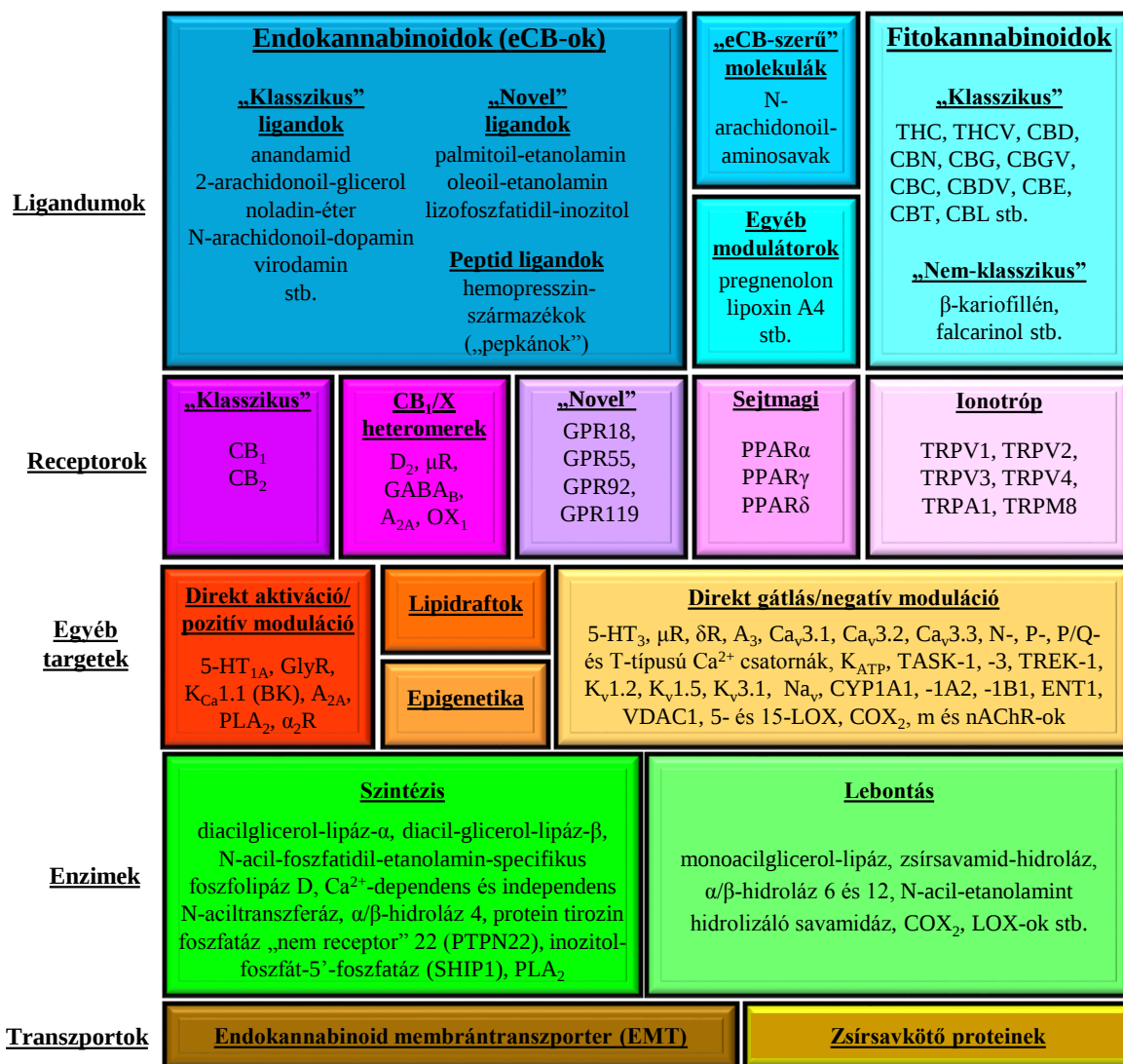
¹¹ A vadkenderen kívül számos más, zömmel a *Brassica*-félék közé tartozó növény, így például a káposzta esetében is sikerült „kannabinoid hatású” vegyületeket (pl. β -kariofillén) kimutatni, azonban ezek pontos karakterizálása még gyerekcipőben jár, szerkezetük pedig különbözik a „klasszikus” FK-okétól (összefoglalják: Gertsch és mtsai., 2010).

alapján (legalább) 11 további alcsoportba oszthatnak (Fellermeier és mtsai., 2001; ElSohly és Slade 2005; Gertsch és mtsai., 2010). Valamennyien erősen lipofil molekulák, ezért, bár egyes kutatók már az 1980-as évek elején felvetették, hogy biológiai aktivitásuk akár receptor-mediált is lehet (Howlett és Fleming, 1984), az 1980-as évek derekán az volt az uralkodó álláspont, hogy idegrendszeri (hallucinogén, euforizáló, analgetikus, antikonvulzív stb.) és egyéb (immunszuppresszív, termoregulatív, hörgőtágító, szemnyomáscsökkentő stb.) hatásaik hátterében egész egyszerűen a célsejtek membránperturbációja áll (Martin, 1986). Amikor azonban az 1990-es évek elejére leírták a két „klasszikus” kannabinoid receptort, a CB₁-et (Devane és mtsai., 1988) és a CB₂-t (Munro és mtsai., 1993), megsokszorozódott a tudományos érdeklődés a terület iránt. Ennek nyomán napjainkra kiderült, hogy a FK-ok számos egyéb receptor és celluláris célpont működésének befolyásolására képesek. A teljesség igénye nélkül ilyenek lehetnek egyes tranziens receptorpotenciálú (TRP) kationcsatornák (Clapham, 2009; Caterina, 2014), bizonyos szerotonin, adenzin és adrenerg receptorok, CYP enzimek, mitokondriális transzporterek stb. (összefoglalják: Mackie és mtsai., 2008; Yamaori és mtsai., 2010; **5. ábra**). A fenti farmakológiai promiszkuitás ismeretében könnyen érthetővé válik, hogy a FK-ok biológiai hatásai mögött többnyire nem egyetlen, hanem adott esetben egy egész sereg célmolekula aktivitásának az adott FK-ra jellemző, karakterisztikus befolyásolása áll.

3.2.3. A (–)-kannabidiol (CBD)

A THC mellett a CBD a második legszélesebb körben vizsgált FK. „Népszerűségét” alapvetően annak köszönheti, hogy meglehetősen nagy mennyiségben fordul elő a vadkenderben, és alkalmazása nem vezet pszichotróp hatások kialakulásához, sőt képes kivédeni a THC ilyen irányú mellékhatásait anélkül, hogy csökkentené annak kívánatos fájdalomcsillapító, görcsoldó vagy éppen tumorelles aktivitását. A kutatások emellett hamar rámutattak arra is, hogy az önmagában adagolt CBD-nak is számos kedvező (egyebek mellett

antipszichotikus, szorongásoldó, antikonvulzív és immunmoduláns) hatása van (Ameri, 1999; Zuairi és mtsai., 2006a és 2006b; Bitencourt és mtsai., 2008; Morgan és mtsai., 2010; Booz, 2011; Burstein és mtsai., 2015; Welty és mtsai., 2015). Mindezek fényében nem meglepő, hogy jelenleg is számos klinikai vizsgálat tárgyát képezi a CBD esetleges további jótékony hatásainak felderítése (az USA-ban tervezett, éppen zajló, illetve már befejezett klinikai vizsgálatokról a <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=cannabidiol> honlapon érhető el további, naprakész információ).



5. ábra Az (endo)kannabinoid rendszer felépítése és kölcsönhatásai (Mackie és mtsai., 2008; Di Marzo, 2008; Liu és mtsai., 2008; Aboud és mtsai., 2013; Raboune és mtsai., 2014; Maccarrone és mtsai., 2015; és Pertwee, 2015 alapján; a rövidítések magyarázatát lásd a szövegben)

A CBD ráadásul igen jól tolerálható, hiszen egy, a 2000-es évek közepén végzett humán klinikai vizsgálat tanúsága szerint még *per os* 1280 mg/nap maximális dózisban egy hónapig adagolva sem váltott ki említésre méltó mellékhatásokat (Zuardi és mtsai., 2006b). A Sativex[®] nevű gyógyszer egyik aktív hatóanyagaként pedig évek óta alkalmazzák *sclerosis multiplex* kezelésében – szintén igen kedvező mellékhatásprofilal (Pertwee, 2006). A CBD biztonságosságát és sokoldalúságát az is jól mutatja, hogy súlyos, terápiarezisztens gyermekkori epilepsziaformák (*Lennox-Gastaut* és *Dravet-szindróma*) kezelésében a közelmúltban fázis 3 klinikai vizsgálati szakaszba jutott Epidiolex[®] márkanév alatt, és az eddigi adatok tanúsága szerint az igen jelentős rohamfrekvencia-csökkenés mellett csak minimális mellékhatások (étvágycsökkenés, álmoság) alakultak ki (ezzel kapcsolatban bővebb, naprakész információ a <http://www.gwpharm.com/Epidiolex.aspx> honlapon található).

A CBD kedvező hatásainak hátterében meglehetősen szerteágazó célpontspektrum húzódik. Az elmúlt években sikerült kimutatni, hogy aktivál több TRP csatornát, valamint az 5-HT_{1A} szerotonin és az A_{2A} adenosin receptorokat, és gátolja egyebek mellett a GPR55, TRPM8, 5-HT₃ vagy a μ opioid receptorokat (Bisogno és mtsai., 2001; Russo és mtsai., 2005; Kathmann és mtsai., 2006; De Petrocellis és mtsai., 2008; Pertwee, 2008; Qin és mtsai., 2008; Akopian és mtsai., 2009; Ross, 2009). Mindezek mellett képes egyes gyulladásos kulcsenzimek (ciklooxygenázok és lipoxigenázok) gátlására, valamint a foszfolipáz A₂ (PLA₂) aktivitásának fokozására is (Pertwee, 2008).

Meglepő módon az irodalom nem egységes a CB₁-en és CB₂-n kifejtett hatásait illetően. Az uralkodó nézet szerint a CBD ezen receptorok potens antagonistája (Thomas és mtsai., 2007) vagy negatív allosztérikus modulátora (NAM) (Laprairie és mtsai., 2015). Mások szerint ugyanakkor nem is kötődik hozzájuk (Straus, 2000) vagy legalábbis szintetikus

enantiomeréhez, a (+)-kannabidiolhoz képest jóval kisebb a receptoraffinitása (Bisogno és mtsai., 2001).

A CBD hatásainak sokszínűségét és egyben a kannabinoid szignalizáció összetettségét jól példázza, hogy mindezen biokémiai adatok dacára Pucci és munkatársai nemrégiben arról számoltak be, hogy hámsejteken a CBD a CB₁ *aktiválásával* gátolja azok differenciálódását (Pucci és mtsai., 2013). Hasonlóképpen, Stanley és munkatársai humán mezenterialis artériákat vizsgálva jutottak arra a következtetésre, hogy a CBD NO-mediált vazorelaxáns hatását a CB₁ közvetíti (Stanley és mtsai., 2015). Ez utóbbi eredmények értelmezéséhez a kulcsot minden valószínűség szerint a Bisogno és munkatársai által közölt adatok adhatják meg, melyek szerint a CBD képes az endogén kannabinoidok lebontásában szerepet játszó bizonyos molekulák, a következő fejezetekben részletesebben is bemutatásra kerülő zsírsavamid-hidroláz (FAAH) és az endokannabinoid membrántranszporter (EMT) gátlására, ami az endogén kannabinoidok koncentrációjának lokális megnövekedését vonhatja maga után (Bisogno és mtsai., 2001). Ily módon a hámsejteken és ereken leírt CB₁-aktiváció minden valószínűség szerint indirekt, „*entourage*” hatás eredményeként alakul ki.

3.2.4. Az endokannabinoid rendszer (ECS) felépítése

Már az első FK-aktivált receptorok azonosítását követően felmerült a gondolat, hogy evolúciós értelemben igen kevésbé valószínű, hogy az emberi test külön receptorokat fejezzon ki pusztán csak a vadvadkender speciális hatóanyagainak érzékelésére, így az 1980-as évek végétől intenzív kutatások indultak el a lehetséges endogén ligandok azonosítására. Ezen vizsgálatokat rövid időn belül siker koronázta: a Raphael Mechoulam vezette munkacsoport 1992-ben azonosította az első endogén ligandot, az „anandamid”-nak¹² elnevezett arachidonoil-etanolamint (AEA; Devane és mtsai., 1992), majd 1995-ben a megtalálta a

¹² A hagyományos elnevezés érdekessége, hogy a szanszkrit „ānanda” (आनन्द) szóból származik, ami az újjászületési ciklusok végén bekövetkező tökéletes, „üdvözült” boldogságot jelenti (forrás: [https://en.wikipedia.org/wiki/%C4%80nanda_\(Hindu_philosophy\)](https://en.wikipedia.org/wiki/%C4%80nanda_(Hindu_philosophy))).

második „belső” kannabinoidot, a 2-arachidonoil-glicerolt (2-AG) is (Mechoulam és mtsai., 1995). Napjainkra már tudjuk, hogy a különféle kannabinoid receptorok, azok endogén ligandjai, az „endokannabinoidok” (eCB-ok)¹³ és az ez utóbbiak felépítéséért és lebontásáért felelős enzim- és transzporter apparátus egy komplex jelátviteli hálózattá állnak össze, melyet összefoglaló néven „endokannabinoid rendszer”-nek (ECS) nevezünk (5. ábra; összefoglalják: Demuth és Molleman, 2006; Mackie és mtsai., 2008; Pertwee és mtsai., 2010; Abood és mtsai., 2013; Maccarrone és mtsai., 2015; Pertwee, 2015).

A rendszer összetettségét jól jelzi, hogy a fentebb említett 2-AG-on és AEA-on kívül számos további, arachidonsavból (AA) származó „klasszikus” (pl. noladin-éter, virodamin stb.) és nem AA-eredetű „novel” (pl. palmitoil-etanolamin, oleoil-etanolamin stb.) ligandum, valamint „eCB-szerű molekula” (N-acil-aminosavak) leírására került már sor (Mackie és mtsai., 2008; Di Marzo, 2008; Raboune és mtsai., 2014; Pertwee, 2015). A klasszikus eCB-ok többnyire „szükség esetén” a membránokból kihasítódva szintetizálódnak, majd a sejtekbe minden valószínűség szerint facilitált diffúzióval¹⁴ történő felvételüket követően gyorsan lebontásra kerülnek (Mackie és mtsai., 2008; Di Marzo, 2008).

A lipofil ligandok és allosztérikus receptormodulátorok (pl. a pregnenolon; Pertwee, 2015) mellett az utóbbi időkben egyre több adat szól amellett, hogy a CB₁ és CB₂ aktivitását fehérje természetű ligandok (pl. a hemoglobin α láncából származó CB₁ antagonistá hemopresszin [Bénard és mtsai., 2012], illetve az ennek hasításával létrejövő oligopeptidek, a „pepkán”-ok; Bauer és mtsai., 2012; Hofer és mtsai., 2015; Pertwee, 2015) is befolyásolhatják. Ez utóbbiak ráadásul azért is roppant érdekesek, mert van közöttük olyan (pl. a 12 aminosavból álló „pepkán-12”), ami képes negatív és pozitív allosztérikus

¹³ Érdekes módon a jelenleg ismert FK-ok és eCB-ok között nincs elsőre szembetűnő szerkezeti hasonlóság. Az AEA és a 2-AG egyes vizes oldatban mutatott konformációi (pl. az AEA „U-alak” konformációja) esetén azonban felfedezhetőek a THC szerkezetéhez hasonló motívumok, és ilyenkor a molekulák mérete is hasonlóvá válik. Mindezek alapján egyes kutatók feltételezik, hogy ezek a speciális konformációk állhatnak az átfedő receptorspektrum hátterében (áttekinti: Fišar, 2009).

¹⁴ Bár számos adat szól a tudományos közéletben tényként kezelt létezése mellett, mind ez ideig nem sikerült azonosítani az eCB-ok transzmembrán szállítását végző molekulát (Chicca és mtsai., 2012).

modulátorként (PAM) is fellépni, hiszen a CB₁-en NAM-ként, míg a CB₂-n PAM-ként viselkedik, aminek a jövőbeli célzott, kedvező mellékhatásprofilú¹⁵ ECS-alapú terápiás megközelítések fejlesztésekor nagy jelentősége lehet.

A fent említett ligandok közül mind ez ideig csak a legkorábban felfedezett néhány eCB szintézisében és lebontásában részt vevő enzimeket ismerjük részleteiben. A 2-AG szintéziséért döntően a diacilglicerol-lipáz (DAGL)- α és $-\beta$ felelős, míg az AEA-ot főként az N-acil-foszfatidil-etanolamin-specifikus foszfolipáz D (NAPE-PLD) termeli. Lebontásukat rendre a monoacilglicerol-lipáz (MAGL), illetve a zsírsavamid-hidroláz (FAAH) végzi, de az AEA esetében bizonyos esetekben alternatív enzimek (pl. a ciklooxygenáz [COX]-2) szerepe is jelentőssé válhat (Mackie és mtsai., 2008).

A kannabinoid szignalizáció vizsgálatát a ligandok sokszínűsége mellett a meglehetősen széles receptorális spektrum is megnehezíti, hiszen a metabotróp (pl. CB₁, CB₂, GPR55 stb.) receptorok mellett ionotróp (egyes TRP csatornák) és intranukleáris (peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptorok [PPAR-ok]) aktivitását is befolyásolhatják különféle eCB-ok és FK-ok (5. **ábra**; Mackie és mtsai., 2008; Di Marzo, 2008; Abood és mtsai., 2013; Raboune és mtsai., 2014; Maccarrone és mtsai., 2015; Pertwee, 2015). Számos közülük ráadásul gyakran „elfogult” agonistaként viselkedik, azaz ugyanazon receptor esetében a különféle ligandok eltérő másodlagos jelpályák aktiválódását okozhatják („*biased agonism*”; Hudson és mtsai., 2010). Emellett a CB₁ receptorról ismert, hogy hajlamos más 7 transzmembrán doménnel rendelkező receptorokkal (pl. μ opioid receptor, D₂ dopamin receptor, A_{2A} adenosin receptor stb.) dimerizálódni, ami mindkét résztvevő jelátvitelét alapjaiban módosítja (5. **ábra**; Mackie és mtsai., 2008; Lazzerini és mtsai., 2012). Ha mindehhez hozzávesszük, hogy elméleti megfontolások alapján a lipid természetű ligandok befolyásolhatják a membránok

¹⁵ Amint arról a 3.2.6. *alfejezet*ben részletesen is szó esik majd, a központi idegrendszerben expresszáldó CB₁ a fő felelős a kannabinoidok pszichotróp hatásaiért, míg a döntően a periférián előforduló CB₂-nek (sok egyéb más mellett) inkább gyulladásgátló hatást tulajdonítanak; így a CB₁-et gátló (vagy legalábbis nem aktiváló), de a CB₂ aktivitást fokozó szerek gyógyszerfejlesztési szempontból igen izgalmas molekulák lehetnek.

lipidraftszerkezetét, illetve, hogy egyes kannabinoidok számos ioncsatorna (feszültségfüggő kalcium és kálium csatornák, feszültségfüggő anioncsatorna-1 [VDAC1] stb.), enzim (pl. CYP-ek, lipoxigenázok [LOX] és COX₂) és transzporter (pl. ekvibratív nukleozid transzporter 1 [ENT1]) aktivitását módosítják (Mackie és mtsai., 2008; Di Marzo, 2008; Abood és mtsai., 2013; Raboune és mtsai., 2014; Maccarrone és mtsai., 2015; Pertwee, 2015); valamint, hogy az AEA és egyes FK-ok CB₁-függő módon komplex epigenetikai változásokat is okoznak (Paradisi és mtsai., 2008; Pasquariello és mtsai., 2009; Pucci és mtsai., 2013), azonnal világossá válik, miért ennyire összetettek a különféle kannabinoid vegyületek élettani hatásai (5. ábra).

3.2.5. A TRP ioncsatornák családja

Amint arról az előbbiekben már szó esett, a növényi és endogén kannabinoidok egy része képes bizonyos TRP csatornák aktiválására is (Caterina, 2014), újabb eredmények szerint pedig ezek a molekulák lehetnek az „eCB-szerű” N-acil-aminosavak elsődleges célpontjai (Raboune és mtsai., 2014). A Bernd Nilius által találóan csak „*Truly Remarkable Protein*”-eknek nevezett TRP ioncsatorna szuperfamilia tagjai 6 transzmembrán doménnel rendelkező alegységekből felépülő, egymással homo- vagy esetenként heterotetramer formában funkcionális csatornát képező molekulák adják. Ezek többnyire nem-szelektív, de leginkább Ca²⁺-ra permeábilis ioncsatornák, bár vannak köztük Na⁺-ra, illetve Mg²⁺-ra specifikusak is. Az emberben előforduló formáikat strukturális sajátásaik alapján jelenleg hat alcsoportba (A: ankirin; C: kanonikus; M: melasztatin; ML: mukolipin; P: policisztin; V: vanilloid) sorolják, melyeknek napjainkig összesen 28 tagját¹⁶ azonosították. Élettani és kórélettani jelentőségüket¹⁷ csak mostanában kezdjük mélyebben megérteni (Clapham, 2009; Moran és mtsai., 2011; Clapham és mtsai., 2015), de egyre több adat mutat arra, hogy a

¹⁶ Ezek egyike a TRPC2 emberben pszeudogén, azaz a fehérje nem expresszálódik (Clapham, 2009).

¹⁷ Ennek részletes tárgyalása messze túlmutat a jelen disszertáció keretein; az érdeklődő olvasó azonban naprakész képet kaphat a TRP csatornákkal kapcsolatos eredményekről egyebek mellett az *IUPHAR Guide to Pharmacology* honlapján (<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=78>).

„klasszikusan” ismert idegrendszeri érzőfunkciók (pl. fájdalomérzés, viszketés, hőérzékelés) mellett a bőr és a bőrfüggelékek biológiájának számos aspektusában (barrierfunkciók, szőrnövekedés, faggyútermelés, gyulladásos folyamatok, melanintermelés stb.) is fontos szerepet játszanak (részletesen áttekintik: Moran és mtsai., 2011; Oláh és mtsai., 2012; Tóth és mtsai., 2014).

3.2.6. Az ECS általános élettani hatásai

Jelen értekezés keretei között terjedelmi okokból természetesen nem lehet cél az ECS valamennyi élettani hatásának részletekbe menő bemutatása, hiszen egyes elemei az emberi szervezet szinte valamennyi szervében, szövetében megtalálhatóak¹⁸. Legfontosabb, leginkább karakterizált hatásai részint a központi idegrendszerhez (KIR)¹⁹, részint pedig az immunrendszerhez kötődnek, de a csont- és zsírsavanyagcserén, vérnyomáson és inzulintermelésen át a spermatogenezisig számos élettani folyamatra hatást gyakorol (összefoglalják: Mackie és mtsai., 2008; Abood és mtsai., 2013; Maccarrone és mtsai., 2015).

A KIR-ben az eCB-ok jellemzően retrográd neurotranszmitterként közvetlenül, valamint az asztrocitákon hatva indirekt módon is modulálják a szinaptikus jelátvitelt (Mackie és mtsai., 2008; Kőszeghy és mtsai., 2015), és ezen keresztül szabályozzák egyebek mellett a hangulatot²⁰, az étvágyat vagy éppen a fájdalomérzést (Mackie és mtsai., 2008). Az ECS másik jól karakterizált hatóköre az immunrendszer, ahol jellemzően az immunválasz kóros „túlfutását” megakadályozó gyulladásgátló, illetve anti-allergiás hatásokat tulajdonítanak neki

¹⁸ Az ECS központi, ubikviter jelentőségét jól jelzi, hogy bizonyos tagjai valamennyi eukarióta szervezetben megtalálhatóak. Érdekes módon a rendszer filogenetikai vizsgálata arra enged következtetni, hogy a ligandok a „klasszikus” receptorokhoz képest a törzsfajlás során „korábban” alakultak ki, ami a „nem-klasszikus” eCB jelátvitel evolúciós jelentőségét emeli ki (Elphick és Egertová, 2005; McPartland és mtsai., 2006).

¹⁹ Az ECS központi jelentőségét jól jelzi, hogy a KIR-ben a CB₁ az egyik leggyakoribb G-protein kapcsolt receptor (Herkenham és mtsai., 1990; Pagotto és mtsai., 2006).

²⁰ Az ECS „hangulatjavító” hatását egy nemrégiben publikált populációgenetikai tanulmány is megerősíti. Eszerint az egyes nemzeteken belül a „nagyon boldog” emberek aránya szorosan korrelál a FAAH „rs324420 A” allél előfordulásával, ami az enzim csökkent aktivitása miatt fokozott eCB-tónust eredményez (Minkov és Bond, 2016).

(Di Marzo, 2008; Mackie és mtsai., 2008; Abood és mtsai., 2013; Maccarrone és mtsai., 2015).

Ezen hatások kialakításában az egyik legfontosabb tényező az eCB-tónus mértéke, amit a sejtek környezetében aktuálisan jelenlévő eCB-ok mennyiségének szabályozásával a felépítő és lebontó enzimek aktivitása határoz meg. Jelen tudásunk szerint ezek között az AEA-ot lebontó zsírsavamid-hidroláz (FAAH) tűnik legjelentősebbnek²¹. Az enzim működésének gyümölcseként a gyulladásgátló AEA-ból egy potens gyulladásos mediátor, az AA képződik, így voltaképp a FAAH-aktivitás központi „döntéshozó” a pro- és anti-inflammatorikus hatások egyensúlyának beállításában (Di Marzo, 2008; Mackie és mtsai., 2008). Épp ezért egyáltalán nem meglepő, hogy a FAAH gátlása számos, főként kóros gyulladásos folyamatokkal jellemezhető betegség és kórállapot kezelésében merült már fel lehetőségként (áttekintik: Di Marzo, 2008; Maccarrone és mtsai., 2015).

3.2.7. *A kannabinoidok és a bőr*

Az ECS különböző tagjait természetesen a (humán) bőrben is kimutatták már. Jelen ismereteink szerint bőrünk legjelentősebb eCB termelői az epidermális keratinociták és a pilosebáceus egység két tagja (a szőrtüszők és a FM-ek), azonban kisebb mennyiségben más sejtek és struktúrák (pl. verejtékmirigyek, érzőidegek) is képesek AEA és 2-AG termelésére. Igazolást nyert az is, hogy számos sejtféleség expresszál különböző kannabinoid receptorokat, a felszabadított eCB-ok hatásai pedig rendkívül széleskörűek (Telek és mtsai., 2007; Dobrosi és mtsai., 2008; Czifra és mtsai., 2012; részletesen áttekintik Bíró és mtsai., 2009; Kupzyk és mtsai., 2009; Caterina, 2014; Maccarrone és mtsai., 2015; **6. ábra**).

A teljesség igénye nélkül napjainkra bebizonyosodott, hogy az eCB-tónus fokozódása jelentős fájdalom- és viszketéscsillapító, valamint gyulladásgátló hatással rendelkezik. Az

²¹ Természetesen a tónust a termelés és lebontás *egyensúlya* szabja meg, így tehát a lebontó enzimek mellett a felépítésben részt vevők is fontos élettani szabályozói a kialakulásának. Tekintettel azonban arra, hogy jelenleg nem rendelkezünk a felépítő enzimek aktivitását fokozó farmakonokkal, a tónus növelésére csak a lebontó enzimek gátlószereit használhatjuk.

aktiválódása áll (Tóth és mtsai., 2011a). A tény, hogy a lokálisan termelt eCB-ok befolyásolják az epidermális keratinociták osztódását és differenciálódását, természetesen már önmagában is valószínűsíti, hogy az eCB-tónusnak szerepe lehet az epidermális barrier kialakításában. Ezt a feltételezést tovább erősíti, hogy a CB₁ és a CB₂ expressziója, illetve a FAAH és EMT aktivitása is rétegfüggő módon változik az epidermiszben (Maccarrone és mtsai., 2003; Pucci és mtsai., 2011). A kérdés részletes vizsgálatát Roelandt és munkatársai végezték el a közelmúltban. CB₁ és CB₂ KO egerek epidermális barrierjének regenerálódását tanulmányozva arra a meglepő következtetésre jutottak, hogy a két receptor (legalábbis egyrben) ellenkező irányban befolyásolja a folyamatot: a CB₁^{-/-} egerek esetében lelassult, míg a CB₂^{-/-} állatok esetén felgyorsult a barrier mechanikus sértést követő regenerálódása (Roelandt és mtsai., 2012). Az eredményekkel összefüggésben azt is kimutatták, hogy a CB₂^{-/-} egerek esetén fokozott volt a lamelláris testek szekréciója, míg a CB₁^{-/-} állatok esetén epidermális lipid-dezorganizáció volt megfigyelhető (Roelandt és mtsai., 2012).

Érdekes módon a két klasszikus kannabinoid receptor ellentétes hatásai nem példa nélküliek a bőrben. Hasonló funkcionális antagonizmust mutattak ki több tanulmány szerzői dermális fibroblasztok esetében is. Palumbo-Zerr és munkatársai *sclerodermában* szenvedő betegek fibroblasztjaiban csökkent FAAH expressziót mutattak ki (Palumbo-Zerr és mtsai., 2012). Ezzel összhangban más munkacsoportok azt találták, hogy a FAAH farmakológiai és molekuláris biológiai gátlása CB₁-mediált jelátvitellel rontotta a bleomycin-indukálta fibrózis tüneteit egerekben (Marquart és mtsai., 2010). Ezzel szemben a CB₂ aktivációja *sclerodermás* betegekből származó fibroblasztokon anti-fibrotikus hatásúnak bizonyult (Lazzerini et al., 2012), a CB₂^{-/-} egerek pedig érzékenyebbek voltak a bleomycin-indukálta fibrózisra, mint vad típusú társaik (Akhmetsina és mtsai., 2009). A képet tovább „színezi”, hogy a pro-fibrotikus hatást ráadásul a CB₁ nem is önállóan, hanem az A_{2A} adenosin receptorral funkcionális egységet alkotva fejtette ki, és a páros bármely tagjának gátlása felfüggesztette a

hatást (Lazzerini és mtsai., 2012), ami felveti az eCB szignalizáció megfelelő irányú modulációjában rejlő terápiás potenciál esetleges jövőbeli kiaknázásának lehetőségét *sclerodermában*. Ez már csak azért is rendkívül kecsegtető iránynak ígérkezik, mert az ECS befolyásolása a fibrotikus komponens mellett a *scleroderma* gyulladásos tüneteire is jótékony hatást gyakorolhat. Bár e téren tapasztalható némi ellentmondás az irodalomban (összefoglalják: Bíró és mtsai., 2009 és Kupzyk és mtsai., 2009), a rendelkezésre álló adatok döntő többségének tanúsága szerint ugyanis az ECS igen jelentős gyulladásgátló hatást fejt ki a bőrben.

3.2.7.1. A kannabinoidok és a bőr gyulladásos folyamatai

Bár ezt a koncepciót hízósejteken nyert korábbi eredményeink is jelentős mértékben megerősítették (Sugawara és mtsai., 2012), az ECS gyulladást korlátozó aktivitásának talán legelegánsabb bizonyítékát Meliha Karsak és munkatársai szolgáltatták, amikor 2007-ben a *Science*-ben közölt tanulmányukban kimutatták, hogy a $CB_1^{-/-}/CB_2^{-/-}$ kettős KO egerek esetében drámaian megnőtt az *allergiás kontakt dermatitis* esélye vad típusú alomtársaikhoz, illetve az egyszeres KO állatokhoz képest. Ezen cikk rendkívüli jelentősége abban áll, hogy elsőként írta le, hogy az epidermális keratinociták károsodott eCB szignalizációja fokozott gyulladásos kemokin felszabaduláshoz vezet, ami a professzionális immunsejtek toborzásával elindítja és fenntartja az allergiás jellegű bőrgyulladást. A tanulmány bemutatta azt is, hogy a FAAH expresszió kiütése és a következményesen fokozódó eCB-tónus (a THC kezeléshez hasonlóan)²² hatékonyan csökkentette a 2,4-dinitrofluoro-benzénnel (DNFB) kiváltott gyulladás tüneteit (Karsak és mtsai., 2007). Ezek szerint tehát (elméletileg) a keratinocitákra ható eCB-tónus közvetlen vagy közvetett növelése a gyulladásos folyamatok egyik lehetséges

²² Rendkívül érdekes, hogy egy, a közelmúltban megjelent közlemény tanúsága szerint a THC gyulladásgátló hatása $CB_1^{-/-}/CB_2^{-/-}$ kettős KO egerekben is kialakul, ami egyértelműen kiemeli a „nem-klasszikus” kannabinoid jelátvitel fontosságát a FK-ok anti-inflammatorikus aktivitásának közvetítésében (Gaffal és mtsai., 2013b). Ez különösen annak fényében fontos, hogy egy másik publikációban Tubaro és munkatársai számos FK esetében írtak le jelentős gyulladásgátló hatékonyságot topikális alkalmazást követően (Tubaro és mtsai., 2010).

kiindulópontjának, a hámsejtek citokin- és kemokintermelésének a közvetlen gátlásával valódi oki terápiát kínálva, minden korábbi felülmúló hatékonysággal lehetne képes enyhíteni számos különféle bőrgyulladás tüneteit. Ezen elgondolással összhangban Leonti és munkatársai azt találták, hogy egy növényi eredetű CB₁-specifikus inverz agonista, a falcarinol, gyulladásos citokin-felszabadulást váltott ki humán keratinocitákból, megerősítve, hogy a „védő” eCB tónus felfüggesztése valóban gyulladásos irányba „tolja el” a keratinociták biológiai viselkedését (Leonti és mtsai., 2010). Hasonlóképpen, keratinocita-specifikus CB₁^{-/-} egerekben Gaffal és munkatársai a DNFB-vel indukált kontakt hiperszenzitivitási reakció fokozódását és elhúzódását figyelték meg (Gaffal és mtsai., 2013a), és ők mutatták ki azt is, hogy a keratinocitákon expresszált CB₁ receptor aktivációja enyhítette a fluoreszcein-izotiocianáttal kiváltott AD-szerű bőrgyuladást egerekben (Gaffal és mtsai., 2014).

A fenti, egérmodellekben nyert eredmények egyöntetűen arra utalnak, hogy az epidermális keratinocitákon kialakuló homeosztatikus eCB-tónusnak központi jelentősége van a gyulladásos folyamatok korlátozásában, így feltételezhető, hogy a tónust elsődlegesen szabályozó enzim, a FAAH expressziójának és aktivitásának fokozódása hozzájárulhat a gyulladás kialakulásához, a „homeosztatikus” FAAH aktivitás helyreállítása pedig képes lehet kivédeni ezen hatásokat. A fenti megfontolások szem előtt tartásával ezért kísérleteink ECS-re fókuszáló részében a FAAH gyulladásban játszott szerepét vettük górcső alá humán keratinocitákon.

3.2.7.2. A kannabinoidok és a bőrfüggelékek

Bár korábbi adatok már utaltak rá (Ständer és mtsai., 2005), végül munkacsoportunk eredményei alapján bizonyosodott be, hogy az epidermális keratinocitákhoz hasonlóan a humán bőr függelékei is funkcionálisan aktív ECS-rel rendelkeznek. Kimutattuk, hogy a rendszer egyes tagjai megtalálhatóak a verejtékmirigyek, a szőrtüszők és a FM-ek sejtjein is,

és alapvetően befolyásolják azok működését (Telek és mtsai., 2007; Dobrosi és mtsai., 2008; Czifra és mtsai., 2012). Igazoltuk, hogy az ECS számos tagja (a CB₁ és CB₂ metabotróp, valamint a TRPV1, -2, -3 és -4 ionotróp kannabinoid receptorok, több eCB-okat felépítő és lebontó enzim, illetve endogén ligandok) megtalálható a humán verejtékmirigyekben. NCL-SG3 humán verejtékmirigy eredetű sejteket (Lee és Dessi, 1989; Wilson és mtsai., 1994; Bovell és mtsai., 2008) vizsgálva pedig azt találtuk, hogy eCB-kezelésük CB₁ és CB₂ receptor független módon fokozta azok lipidtermelését. Ennek a jelenségnek (a nyilvánvaló kozmetológiai vonatkozásokon túl) a termoregulációban lehet jelentősége: a verejték lipidtartalmának és ezzel viszkozitásának ECS-mediált növelése ugyanis elméletileg fontos tényező lehet a folyadékcsapp szétterülésének elősegítésében és a korai (tehát hőleadás szempontjából haszontalan) legördülés elleni védelemben (Porter, 2001; Czifra és mtsai., 2012). Ilyen módon eredményeink alapján nem elképzelhetetlen, hogy az ECS a periférián a lokális hőszabályozás egyfajta autonóm eszköze lehet.

Érdekes módon a fenti elgondolással összhangban álló megfigyeléseket tettünk humán szőrtüszők vizsgálatakor is. Azt tapasztaltuk ugyanis, hogy mind a CB₁²³, mind pedig az ionotróp kannabinoid receptorként is funkcionáló, hőérzékeny²⁴ TRPV1 és TRPV3 aktiválásakor csökkent a szőrszálak növekedése, a hajciklus²⁵ pedig a regresszív katagén, azaz „szörvesztő”, így elméletileg hőleadást elősegítő irányba tolódott el (Bodó és mtsai. 2005; Telek és mtsai., 2007; Borbíró és mtsai., 2011).

Bár a fentebb tárgyaltak jelentős mértékben hozzájárultak a bőr ECS-ének jobb megismeréséhez, jelen dolgozat szempontjából a legfontosabb ilyen vonatkozású eredmény

²³ Meglepő módon az AEA-dal és a THC-vel szemben a 2-AG alkalmazása nem váltott ki katagén regressziót. A jelenség okát munkacsoportunk nem vizsgálta részletesebben, de az újabb irodalmi adatok fényében feltételezhető, hogy a korábbiakban már említett „elfogult” agonizmus állhat a háttérben.

²⁴ Érdekes módon valamennyi eddig ismert ionotróp kannabinoid receptorként funkcionáló TRP csatorna egyben jellegzetes hőmérsékleti tartományokra reagáló „hőérzékelő” receptor is. A TRPV1 és -3 aktivitása egyaránt a „meleg” (>41°C, illetve >33°C) hőtartományokban fokozódik (Clapham, 2009; Moran és mtsai., 2011; Caterina, 2014).

²⁵ A szőrtüszők ismétlődő növekedési („anagén”), regressziós („katagén”) és kvázi nyugalmi („telogén”) fázisokból felépülő, az egész élet folyamán fennmaradó életciklusa (Langan és mtsai., 2015; Won és mtsai., 2015).

az, hogy a szőrtüszők és verejtékmirigyek mellett a FM-ek működését is befolyásolja az ECS. Munkacsoportunk a közelmúltban kimutatta, hogy a sebociták termelői és célpontjai is az eCB-oknak, melyek valószínűleg auto- és parakrin reguláció révén fontos szerepet játszanak a bazális faggyúlipid-termelés fenntartásában. Eredményeink szerint ugyanis a CB₂ szelektív gécscsökkentése (azaz az autokrin/parakrin „pro-lipogén” hurok megtörése) jelentősen csökkentette a lipogenezist SZ95 sebocitákon. A másik oldalról közelítve a kérdést, a sejtek eCB-kezelése pedig a CB₂ receptor → ERK1/2 MAPK → PPAR γ útvonal aktiválásával drámaian fokozta a neutrálislipid-szintézist, ami felvetette az eCB diszreguláció lehetséges szerepét az *acne* kialakulásában (Dobrosi és mtsai., 2008).

Bár ezen eredmények egyértelműen igazolták, hogy az ECS fontos szabályozó szereppel bír a humán FM-ekben, semmilyen adat sem állt rendelkezésre a FK-ok esetleges hatásait illetően, ezért a fenti eredmények ismeretében kísérleteink másik iránya a FK-ok, közelebbről pedig elsőként a CBD FM-ekre gyakorolt hatásainak megismerésére irányult.

4. Célkitűzés

A fentiek fényében jelen kísérleteink során a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Milyen hatást gyakorol a nem-pszichotróp FK CBD a humán szebociták biológiai folyamataira, és az esetleges hatásokat milyen jelátviteli útvonal(ak)on keresztül fejtí ki?
2. Milyen szerepet játszik a FAAH a humán epidermális keratinociták gyulladásos folyamatainak szabályozásában?

5. Anyagok és módszerek

5.1. *A kísérletek során felhasznált kémiai ágensek áttekintése*

A kísérletek során alkalmazott vegyszerek összefoglalását az **1. táblázat** tartalmazza. Az oldószerek esetleges aspecifikus hatásainak kizárására minden anyagból ezerszeres töménységű törzsoldatot készítettünk. A gyártó javaslata alapján -20°C-on vagy 4°C-on tárolt törzsoldatokból közvetlenül a kezelés előtt készítettük el a szükséges koncentrációkat a sejtek tápoldatában ezerszeres hígítást alkalmazva. Vizsgálataink során kontrollként minden esetben az anyagok oldószerével ezerszeres hígításban kezelt sejteket használtunk.

5.2. *Sejtenyésztés*

5.2.1. *A humán immortalizált SZ95 sebociták tenyésztése*

Kísérleteink során a humán FM-ekből származó immortalizált SZ95 sejteket (Zouboulis és mtsai., 1999) Sebomed™ Basal Medium-ban (Biochrom, Berlin, Németország) tenyésztettük, amelyet 10 (V/V)% hővel inaktivált embrionális szarvasmarha szérummal (FBS; Life Technologies Magyarország Kft., Budapest, Magyarország), 1 mM CaCl₂-dal (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország), 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktorról (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), valamint 50 IU/ml penicillinnel és 50 µg/ml streptomycinnel (mindkettő Teva, Debrecen, Magyarország) egészítettünk ki. A tápoldat végső Ca²⁺ koncentrációja így megközelítőleg 1,25 mM volt („normál Ca²⁺-tartalmú médium”). Azokban az esetekben amikor (az extracelluláris Ca²⁺ szerepének tisztázására) „alacsony Ca²⁺-tartalmú médium”-ban végeztük kísérleteinket, az oldatkészítés során elhagytuk a CaCl₂ szupplementációt, megközelítőleg 0,25 mM-ra állítva be ezzel a végső Ca²⁺-koncentrációt.

1. táblázat *A kísérletek során alkalmazott kémiai ágensek áttekintése*

Név (rövidítés)	Megjegyzés	Oldószer ²⁶	Gyártó
AM251	CB ₁ inverz agonista	Abszolút alkohol	Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)
AM630	CB ₂ antagonist	Dimetil-szulfoxid (DMSO)	Cayman Chemical Company
AMG 9810	TRPV1 antagonist	DMSO	Sigma-Aldrich
Anandamid (AEA)	eCB	Abszolút alkohol	Cayman Chemical Company
Arachidonsav (AA)	Gyulladásos lipidmediátor	Abszolút alkohol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
CBD	FK	Abszolút alkohol (<i>in vitro</i>), illetve DMSO (<i>ex vivo</i>)	Cayman Chemical Company
Ciklosporin A (CSA)	Kalcineurin (protein foszfatáz 2B) inhibitor	DMSO	Sigma-Aldrich
GF109203X (GF)	Általános PKC inhibitor	DMSO	Sigma-Aldrich
Gö6976 (Gö)	A „klasszikus” PKC izoformák gátlószere	DMSO	Calbiochem (Nottingham, Egyesült Királyság)
GSK1016790A (GSK)	Ultrapotens TRPV4 agonista	DMSO	Sigma-Aldrich
H89	PKA inhibitor	Szűrt desztillált víz	Sigma-Aldrich
HC067047 (HC)	TRPV4 antagonist	DMSO	Maybridge Ltd. (Cambridge, Egyesült Királyság)
Kapszazepin (CPZ)	TRPV1 antagonist	DMSO	Sigma-Aldrich
Linolsav (LA)	PPAR aktivátor	Abszolút alkohol	Sigma-Aldrich
Ruténium vörös (RR)	Általános TRP csatorna antagonist	DMSO	Sigma-Aldrich
<i>Staphylococcus aureus</i> lipoteichoinsav (LTA)	TLR2 aktivátor (a Gram-pozitív fertőzések modellje)	Szűrt desztillált víz	Sigma-Aldrich
Tacrolimus (Protopic®)	Kalcineurin (protein foszfatáz 2B) inhibitor	Speciális ásványolaj, paraffin, propilén-karbonát, vazelin és viasz tartalmú formuláció	Astellas Pharma US Inc. (Northbrook, IL, USA)
Tesztoszteron (T)	Androgén hormon	DMSO	Sigma-Aldrich
URB597	FAAH inhibitor	DMSO	Sigma-Aldrich
WOBE440	FAAH inhibitor (Nicolussi és mtsai., 2014a)	DMSO (<i>in vitro</i>), illetve aceton és olívaolaj 4:1 arányú keveréke (<i>in vivo</i>)	Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittell (Bielefeld, Németország)
WOBE479	FAAH inhibitor (Nicolussi és mtsai., 2014a)	DMSO (<i>in vitro</i>), illetve aceton és olívaolaj 4:1 arányú keveréke (<i>in vivo</i>)	Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittell
Wortmannin (WM)	Foszfoinozitol-3 kináz (PI3K) inhibitor	DMSO	Calbiochem
ZM241385 (ZM)	A _{2A} adenosin receptor antagonist	DMSO	Tocris Bioscience (Bristol, Egyesült Királyság)
γ-irradiált, <i>Escherichia coli</i> 026:B6 lipopoliszacharid (LPS)	TLR4 aktivátor (a Gram-negatív fertőzések modellje)	Szűrt desztillált víz	Sigma-Aldrich

²⁶ Az abszolút alkohol és a DMSO a VWR International Kft.-től (Debrecen, Magyarország) származott, míg az acetont és az olívaolajt a Biotox Sciences (San Diego, CA, USA) biztosította.

A tápoldatot kétnaponta lecseréltük, és a sejteket a 60-70%-os konfluenciaszint elérésekor passzáltuk, megelőzve ezzel a tenyészetek konfluencia-indukált differenciálódását. A tenyésztést 5% CO₂ tartalmú, párasított légtérben, 37°C-on végeztük.

5.2.2. *A humán immortalizált (HPV-KER) és primer epidermális keratinociták (NHEK) tenyésztése*

A Humán Papillómavírus E6 antigénnel immortalizált (HPV-KER; Szegedi és mtsai., 2012; Polyánka és mtsai., 2013) és a primer humán epidermális keratinocitákat (NHEK) szérumentes EpiLife médiumban (Life Technologies Magyarország Kft.) tenyésztettük, melyet 1 (V/V)% „Human Keratinocyte Growth Supplement”-tel (Life Technologies Magyarország Kft.), 1 (V/V)% antibiotikum (penicillin-streptomycin keverék; PAA Laboratories GmbH., Pasching, Ausztria) és 0,5 (V/V)% antimikotikum oldattal (Fungizone® Antimicotic; Life Technologies Magyarország Kft.) egészítettünk ki.

A humán bőrmintákat sebészeti beavatkozáson áteső, bőrgyógyászati szempontból egészséges donoroktól nyertük, akik bőrmintáik kutatási célú felhasználásához a megfelelő tájékoztatást követően írásos beleegyezésüket adták. A mintavételt és a szövetek, sejtek felhasználását a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal engedélyezte (*protokollszám: DE OEC RKEB/IKEB 3724-2012; ügyiratszám: IX-R-052/01396-2/2012*), a kutatás mindenben a Helsinki Deklaráció szellemében, annak irányelveit a gyakorlatba ültetve zajlott.

A NHEK-k izolálására enzimátikus emésztést (2,4 IU/ml diszpáz [Roche Diagnostics, Berlin, Németország] egy éjszakán át 4°C-on) követően dermo-epidermális szeparáció, majd rövid (20 perc, 37°C) 0,05%-os tripszines kezelés [Sigma-Aldrich]) révén került sor. A NHEK-k és a HPV-KER sejtek tenyésztését 5% CO₂ tartalmú, párasított légtérben, 37°C-on végeztük. A médiumot minden második napon lecseréltük, és a konfluencia-indukálta differenciálódás megelőzésére a sejteket a 70-80%-os konfluenciaszint elérésekor passzáltuk.

A NHEK-k izolálását és tenyésztését *Hollósi Erika, Furin Lilla és Uzonyi Renáta* asszisztensnők végezték.

5.3. *A szebociták intracelluláris lipidtartalmának meghatározása*

5.3.1. *Oil Red O festés*

A lipidtartalom vizsgálata során elsőként Oil Red O festésnek vetettük alá a szebocitákat. A sejteket üveg fedőlemezen tenyésztettük, és a jelzett módon kezeltük. Ezután a fedőlemezeket kétszer mostuk foszfátpufferelt sóoldattal (PBS: 115 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7,4; mindkettő a Sigma-Aldrich-tól), majd a sejteket 4%-os (g/100 ml) paraformaldehiddel (Sigma-Aldrich) fixáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően újabb két mosás következett PBS-sel és egy 60 (V/V)%-os izopropanollal (Sigma-Aldrich), amit a frissen készített Oil Red O oldattal (3 mg/ml; 60 [V/V]% -os izopropanolban oldva) történő festés követett (20 perc, 37°C-on). Újabb PBS-sel történő mosás után a sejtmagokat hematoxilinnel (Sigma-Aldrich) jelöltük 20 másodpercen keresztül. Az így megfestett sejteket vizes bázisú fedőmédiummal (Dako, Glostrup, Dánia) fedtük, majd fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

5.3.2. *Fluoreszcens Nile Red jelölés*

A lipidtermelés szemikvantitatív vizsgálatához fluoreszcens Nile Red jelölést alkalmaztunk. A sejteket speciális, fluorimetriás mérésekhez használatos („black well/clear bottom”) 96 lyukú lemezre (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) szélesztettük 2.000 (6 napos kezelések), illetve 20.000 sejt/lyuk denzitásban (24 és 48 órás kezelések), majd elvégeztük a megfelelő kezeléseket. A felülúszó eltávolítása után 100 µl PBS-ben oldott Nile Red oldatot (Sigma-Aldrich) mértünk a sejtekre 1 µg/ml végkoncentrációban, majd 20 percen keresztül 37°C-on inkubáltuk őket. Az egyes lyukak fluoreszcencia intenzitását

FlexStation™ II³⁸⁴ vagy FlexStation 3 készülék (Molecular Devices, San Francisco, CA, USA) segítségével detektáltuk.

Ismert, hogy a Nile Red excitációs és emissziós spektruma változik a lipidközeg polaritásának függvényében, így a szebociták citoplazmájában felhalmozódó, jórészt neutrális lipidekkel kitöltött vakuólumok elkülöníthetővé válnak a membránokat döntő többségben alkotó poláros lipidektől. Az eltérő gerjesztési és detektálási hullámhosszok kihasználásával (neutrális lipidek excitáció/emisszió: 485/565 nm; poláros lipidek excitáció/emisszió: 540/620 nm) lehetőségünk nyílt a kétféle lipidtartalom párhuzamos detektálására (Alesta és mtsai., 2006). Mivel a szebociták terminális differenciációját jelző citoplazmatikus lipidakkumuláció során a sejtek neutrális lipideket halmoznak fel (Zouboulis és mtsai., 1999) ezen lipidek mérésével betekintést nyerhettünk a differenciálódás folyamatába, emellett a poláros lipideket mintegy belső kontrollként használhattuk, hiszen mennyiségük leginkább a sejtszámmal korrelált. Minden kezelést legalább négy ismétléssel végeztünk, a kapott eredményeket pedig a kontroll százalékában, átlag±SEM formában adtuk meg.

5.4. A szebocita lipidom vizsgálata

A lipidom vizsgálatát (egy korábban optimalizált protokollt követve; Camera és mtsai., 2010) olasz kollaborációs partnereink (*Emanuela Camera, Matteo Ludovici és Mauro Picardo*) végezték. Ennek során a jelzett módon kezelt szebocitákat tripszines emésztést követően megszámloltuk, majd a felülúszó eltávolítását követően a mintákat szárazjégen továbbítottuk. A lipidek szeparálása és analízise „*rapid resolution reverse phase high performance liquid chromatography*” (RR-RP-HPLC) és „*time of flight*” tömegspektrometria (ToF-MS) segítségével történt. A relatív lipidtartalom meghatározására az egyes alosztályokba (TG-ek, DG-ek, WE-ek, FFA-ak, SQ, CH és CE-ek) tartozó lipidek mennyiségének összeadásával került sor.

5.5. Az életképesség vizsgálata

Az életképesség vizsgálatakor kolorimetriás MTT-assay-t alkalmaztunk. A módszer lényege, hogy a sárga színű 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid (MTT; Sigma-Aldrich) az élő sejtek mitokondriumaiban elhelyezkedő mitokondriális dehidrogenázok hatására lila színű formazán kristállyá alakul át, mert az enzimek hasítják a kiindulási vegyületben található tetrazólium gyűrűt. A sejteket 96 lyukú lemezekre szélesztettük 2.000 (6 napos kezelések), illetve 20.000 sejt/lyuk denzitásban (8, 24, 48 és 72 órás kezelések), majd a megfelelő anyagok különböző koncentrációival kezeltük őket. Ezt követően a tenyésztő oldat eltávolítása után minden lyukba 100 µl, 0,5 mg/ml végkoncentrációjú PBS-ben oldott MTT oldatot pipettáztunk, majd 37°C-on 2 órán át inkubáltuk a sejteket. Ezután az MTT oldatot eltávolítottuk és minden lyukhoz 100 µl „MTT szolubilizáló oldatot” (81 [V/V]% 2-propanol, 9 [V/V]% 1 M HCl, 10 [V/V]% Triton X-100; [mind Sigma-Aldrich]) adtunk, majd tizenöt percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket közepesen intenzív rázatás mellett. A sejtekben keletkező formazán kristályokat ezen eljárás segítségével feloldottuk, mennyiségüket pedig kolorimetriás úton határoztuk meg 565 nm-en a korábban már említett FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével. Az ily módon mért abszorbancia arányos az élő sejtek számával. Minden kezelést legalább négy ismétléssel végeztünk, az adatokat a kontroll százalékában, $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában adtuk meg. A HPV-KER sejtek esetén a TC_{50} érték (a kontroll jelintenzitás 50%-ához tartozó hatóanyag koncentráció) meghatározásához a görbe illesztését az *Origin Pro Plus 6.0* szoftver (Microcal, Northampton, MA, USA) „*Exponential Decay 1*” illesztőfunkciójával végeztük.

5.6. Az apoptotikus folyamatok vizsgálata

A mitokondriális membránpotenciál csökkenésének detektálása a korai apoptotikus folyamatok kimutatásának egyik szenzitív módszere (Green és Reed, 1998; Susin és mtsai., 1998; Dobrosi és mtsai., 2008; Tóth és mtsai., 2009 és 2011a). Kísérleteink során ezért az

esetleges apoptotikus folyamatok vizsgálatára a mitokondriális membránpotenciál fluorimetriás mérését végeztük el MitoProbe™ DilC₁(5) Assay Kit (Life Technologies) segítségével. A kísérlet során alkalmazott festék (1,1',3,3',3',3'-hexametil-indodikarbocianinjodid; a továbbiakban „DilC₁(5)”), a mitokondriális membránpotenciál nagyságának függvényében halmozódik fel a sejtek mitokondriumaiban, ezért a korai apoptotikus jeleket mutató sejtekben csökkent fluoreszcencia intenzitást detektálhatunk. A szebocitákat és a keratinocitákat 20.000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük a Nile Red meghatározás során már említett („black well/clear bottom”) 96 lyukú lemezekre (Greiner Bio-One), majd a jelzett módokon kezeltük őket. A felülúszó eltávolítása után a sejteket 30 percig inkubáltuk 37°C-on DilC₁(5) munkareagenssel (50 µl/lyuk), ahol a festéket 1:200 arányban hígítottuk Sebomed™ Basal Mediumban. Az inkubáció végeztével 100 µl/lyuk PBS-sel kétszer mostuk a sejteket, a fluoreszcencia intenzitást pedig 630 nm-es hullámhosszon gerjesztve és 670 nm-en detektálva mértük FlexStation™ II³⁸⁴ vagy FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével. Minden kezelést négy ismétléssel végeztünk, a relatív fluoreszcenciát a kezeletlen kontroll százalékában, átlag±SEM formában adtuk meg.

5.7. *A citotoxicitás/sejtnekrózis meghatározása*

A különféle kezelések esetleges citotoxicitásának vizsgálatát fluoreszcens SYTOX Green (Life Technologies) jelöléssel végeztük. A festék csak a nagymértékben sérült, dezintegrálódott plazma-, illetve magmembránokon keresztül képes bejutni a sejtmagba, ahol azután a duplaszálú DNS-hez kötődik, míg az ép plazmamembránnal rendelkező sejtek esetében a festék a sejtmagon kívül marad. Mindez tehát azt jelenti, hogy a nekrózist szenvedett sejtek esetében magas fluoreszcencia intenzitást detektálhatunk, míg az ép membránnal rendelkező sejtek esetében ez az érték alacsonynak adódik. A sejteket 96 lyukú („black well/clear bottom”) lemezekre (Greiner Bio-One) szélesztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban, majd a megfelelő anyagok különböző koncentrációival kezeltük őket. Ezt

követően a felülúszót eltávolítottuk, majd a sejteket Seamed™ Basal Mediumban hígított SYTOX Green (Life Technologies) reagenssel (végkoncentráció 1 µM) 30 percig inkubáltuk, 37°C-on (50 µl/lyuk). Az inkubációt követően a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd FlexStation™ II³⁸⁴ vagy FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével 490 nm-en gerjesztve, 520 nm-en detektáltuk a fluoreszcencia intenzitást. Minden kezelést négy ismétléssel végeztünk, a relatív fluoreszcencia intenzitást a kezeletlen kontroll százalékában, átlag±SEM formában adtuk meg.

Az SYTOX Green, illetve az apoptózis vizsgálatához használt DilC₁(5) festék eltérő gerjesztési és detektálási spektrumának, valamint a festési protokollok nagyfokú hasonlóságának köszönhetően az apoptotikus folyamatokat, illetve a sejtnekrózist lehetőségünk nyílt ugyanabban a mintában megvizsgálni, a két festéket egyszerre adva a munkaoldatunkhoz. Laboratóriumunk korábbi kísérletei során egyértelműen bebizonyosodott, hogy a festékek egy időben történő használata semmilyen különbséget sem okoz a csak egyetlen festéket tartalmazó munkaoldattal elvégzett mérésekhez képest (Géczy és mtsai., 2012), ezért kísérleteink során a SYTOX Green, illetve a DilC₁(5) jelölést egyszerre végeztük.

5.8. *A proliferáció meghatározása (CyQUANT proliferációs assay)*

A faggyúmirigysejtek proliferációjának vizsgálatát CyQUANT proliferációs assay segítségével végeztük. A módszer a DNS-tartalom mérésén keresztül ad közvetlen információt a sejtszámról, mely így az MTT-vel ellentétben valóban a proliferációt és nem mitokondriális aktivitást mér. Ennek megfelelően a jel kontrollhoz viszonyított emelkedése az élősejt-szám növekedését, míg csökkenése proliferációs blokkot, illetve élősejtszám-csökkenést jelezhet. A sebocitákat 96 lyukú („black well/clear bottom”) lemezekre (Greiner Bio-One) szélesztettük 5.000 sejt/lyuk denzitásban, és a jelzett módokon kezeltük őket. Ezt követően a felülúszót eltávolítottuk, majd a lemezeket a mérésig -80°C-on helyeztük el, ami permeabilizálta a sejteket. Ezután a kit részét képező, desztillált vízzel 20-szorosára hígított

„20x lysis buffer stock solution”-ban hígítottunk „CyQUANT GR stock solution”-t (1:400). A lemezekre wellenként 200-200 µl munkaoldatot mértünk, majd öt percig szobahőn fénytől védve inkubáltuk őket. Végül a wellék fluoreszcencia intenzitását FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével detektáltuk (excitáció: 480 nm; emisszió: 520 nm). A relatív fluoreszcencia egység formájában mért intenzitásértékeket a kezeletlen kontroll százalékában adtuk meg. Minden kezelést legalább négy ismétléssel végeztünk, a kapott eredményeket pedig a kontroll százalékában, átlag±SEM formában adtuk meg.

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

A reverz transzkripciót követő, kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakciót ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) vagy Stratagene Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA) segítségével, 5' nukleáz assay használatával végeztük.

2. táblázat A Q-PCR kísérletek során felhasznált primerek és próbák áttekintése

Célmolekula	Assay ID
TRPV1	Hs00218912_m1
TRPV2	Hs00275032_m1
TRPV4	Hs00222101_m1
TRPA1	Hs00175798_m1
TRPM8	Hs00375481_m1
A_{2A}	Hs00169123_m1
„tribbles homolog 3” (TRIB3)	Hs01082394_m1
„nuclear receptor interacting protein 1” (NRIP1)	Hs00942766_s1
FAAH	Hs00155015_m1
IL-1α	Hs00174092_m1
IL-1β	Hs00174097_m1
IL-6	Hs00985639_m1
IL-8	Hs00174103_m1
TNFα	Hs00174128_m1
Ki67	Hs01032443_m1
„Rho GTPase activating protein 9” (ARHGAP9)	Hs00261256_m1
LL-37 katelicidin	Hs00189038_m1
PPIA	Hs99999905_m1
GAPDH	Hs99999904_m1
18S RNS	Hs99999901_s1

A teljes RNS-t TRIzol (Life Technologies) felhasználásával izoláltuk, majd a gyártó protokolljának megfelelően (az esetleges genomi DNS szennyezés eliminálására) DNáz kezelést végeztünk. Ezt követően a teljes RNS 1 µg-jából kiindulva a szebocita minták esetén 15 IU AMV reverz transzkriptázt, 1 IU rekombináns RNasin ribonukleáz inhibitor és 0,025 µg/µl random primert (mind Promega, Madison, WI, USA), míg a

keratinocita minták esetén „High Capacity cDNA Kit”-et (Life Technologies Hungary Kft.) felhasználva állítottunk elő cDNS-t. A PCR amplifikációs reakciót TaqMan primerekkel és próbákkal végeztük. Belső kontrollként a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), a 18S riboszomális RNS (18S RNS), illetve a peptidil-prolil izomeráz A (ciklofillin A, [PPIA]) expresszióját határoztuk meg (Life Technologies; **2. táblázat**). Minden reakciót három technikai ismétléssel végeztünk. A relatív expressziót a jelzett belső kontroll kifejeződésére vonatkoztatva a Δ CT módszert alkalmazva $\text{átlag} \pm \text{SD}$ alakban adtuk meg. Azokban az esetekben, ahol a génexpresszió kezelés hatására történő esetleges változásait kívántuk nyomon követni, a $\Delta\Delta$ CT módszert alkalmaztuk, amely során a megfelelő belső kontrollra történő normálást követően a relatív expressziót a kezeletlen kontroll esetében tapasztalható relatív expresszióra is normáltuk.

5.10. Teljes genom microarray analízis

A génexpresszió CBD-kezelés során bekövetkező változásainak vizsgálatát, valamint az adatok feldolgozását és bioinformatikai kiértékelését, azaz a *gene set enrichment* (GSEA; Mootha és mtsai., 2003; Subramanian és mtsai., 2005)²⁷ és *Biological Networks Gene Ontology* (BiNGO)²⁸ analízis, valamint a biológiailag releváns módon változó expressziót mutató gének listájának elkészítését külső cégek (*ChromoMed Kft.*, Budapest, Magyarország és *Abiomics Kft.*, Budapest, Magyarország; <http://www.abiomics.eu>) végezték el.

A kísérletek során 3 független kontroll és CBD-kezelt (10 μ M; 24 óra) mintapár összehasonlítására került sor Human Whole Genome Oligo Microarray[®] (44K) (Agilent Technologies) segítségével. A teljes RNS tartalom izolálására a gyártó protokollját követve TRIzolal (Life Technologies) került sor. Az izolált RNS minőségének ellenőrzése Agilent 2100 Bioanalyzer platform (Agilent Technologies) és Nanodrop-1000 spektrofotométer

²⁷ További részletes, naprakész információk a Broad Institute honlapján (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) találhatóak.

²⁸ Részletes ismertetés a „The Gene Ontology Consortium” és a „The Sequence Ontology Project” honlapján (<http://www.geneontology.org/> és <http://www.sequenceontology.org/>) található.

(Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) segítségével történt. A génexpresszióban bekövetkező változást akkor tekintettük biológiailag relevánsnak, ha minimum kétszeres, mindhárom esetben azonos irányba mutató változás volt detektálható, és a korrigált, globális *P* érték 0,05-nél kisebbnek adódott.

A microarray-k adatai a *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) „*Gene Expression Omnibus*” (Edgar és mtsai., 2002) publikus adatbázisában elhelyezésre kerültek, és „GSE57571” hozzáférési szám alatt szabadon kutathatóak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE57571>).

5.11. Immunfluoreszcens jelölés (IF)

Az SZ95 szebocitákat 24 lyukú tenyésztőedényekbe helyezett steril fedőlemezekre szélesztettük, és nagyjából 60%-os konfluencia szint eléréséig tenyésztettük. A sejteket acetonnal fixáltuk nedveskamrában, szobahőmérsékleten (5 perc). A permeabilizálást és az aspecifikus kötőhelyek blokkolását 0,6 (V/V)% Triton X-100-at és 1 g/100 ml szarvasmarha szérumalbumint (BSA) (mindkettő Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS oldattal végeztük (30 perc szobahőn, nedveskamrában). A sejteket ezután 4 órán át inkubáltuk 37°C-on a megfelelő molekulák ellen nyúlban termeltetett és blokkoló oldatban hígított elsődleges antitestekkel (3. táblázat).

3. táblázat Az IF jelölések során alkalmazott elsődleges antitestek áttekintése

Célmolekula	Faj	Hígítás	Gyártó
TRPV1	nyúl	1:500	Sigma-Aldrich
TRPV4	nyúl	1:500	Alomone Labs, Jeruzsálem, Izráel
TRPV2	nyúl	1:500	AbCam, Cambridge, Egyesült Királyság
TRPA1	nyúl	1:500	
TRPM8	nyúl	1:500	
A ₂ A	nyúl	1:500	

Ezután a fedőlemezeket háromszor mostuk PBS-ben, majd 60 percen keresztül inkubáltuk 37°C-on kecskében termeltetett, Alexa Fluor® 488-cal konjugált, nyúl immunglobulin Fc-szakasza elleni másodlagos antitesttel (1:200 arányban PBS-ben hígítva;

Life Technologies). Végül ismét háromszori PBS-es mosást követően, a mintákat 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) fluoreszcens magfestőt tartalmazó Vectashield fedőmédiummal (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) lefedtük, majd a sejtekről egy Nikon Eclipse E600 típusú fluoreszcens mikroszkóp (Nikon, Tokió, Japán) segítségével felvételeket készítettünk (excitáció/emisszió: 488/519 nm [Alexa Fluor® 488] és 360/460 nm [DAPI]). Negatív kontrollként az elsődleges antitest kihagyásával megfestett fedőlemezeinket használtuk.

5.12. Western blot

A jelzett módokon kezelt, illetve kezeletlen sejttényészeteket jéghideg PBS-ben mostuk, majd lízis pufferben (20 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-[2-aminoetil]-benzénszulfonil-fluorid és proteáz inhibitor keverék 1:100 arányú hígításban kiegészítve 1 tabletta/10 ml PhosSTOP™ reagenssel; pH 7,4; mind a Sigma-Aldrich-tól) homogenizáltuk, és jégen ultrahangos feltárást (szonikálást) végeztünk. A minták proteintartalmának meghatározása módosított BCA protein „assay”-vel történt (Pierce, Rockford, IL, USA). Ezután a minták proteintartalmát (kísérlettől függően) 1-2 mg/ml-re állítottuk be, majd nátrium-dodecil-szulfát (SDS) mintapufferben (10 [V/V]% glicerín, 2 [V/V]% SDS, 62 mM Tris, 20 mM ditiotritol, 0,002 [V/V]% brómfenolkék és 5 [V/V]% β-merkaptóetanol; mind Sigma-Aldrich) 10 percig forrásban lévő vízben főztük. Az így elkészült mintákból a szebocitás kísérletekben azonos mennyiségeket (20-60 µg) vittünk fel 7,5%-os poliakrilamid (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) gélre, majd 100 V konstans feszültséget alkalmazva SDS-PAGE-t végeztünk, míg a keratinocita mintákat 10% Mini Protean TGX gélekre (Bio-Rad) vittük fel (28 µg/well). Az elválasztott fehérjéket ezt követően Trans-Blot® Turbo™ készülék segítségével (Bio-Rad) nitrocellulóz membránra (Bio-Rad) transzferáltuk, majd a membránokat a **4. táblázatban** felsorolt, 5 g/100 ml tejport tartalmazó PBS-ben hígított elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-os hőmérsékleten.

4. táblázat *A Western blot kísérletek során alkalmazott antitestek áttekintése*

Célmolekula	Faj	Hígítás	Gyártó
TRPV1	nyúl	1:200	Sigma-Aldrich
TRPV4	nyúl	1:200	Alomone Labs
TRPV2	nyúl	1:200	AbCam
TRPA1	nyúl	1:200	
TRPM8	nyúl	1:200	
A_{2A}	nyúl	1:200	
TRIB3	nyúl	1:200	
NRIP1	nyúl	1:200	Novus Biologicals LLC (Littleton, Co, USA)
FAAH	nyúl	1:250	
p-P65	nyúl	1:1000	
β-tubulin	nyúl	1:1000	
ERK1/2 MAPK	nyúl	1:1500	
p-ERK1/2 MAPK	egér	1:1500	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, Germany)
p-I-κB-α	egér	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
β-aktin	nyúl	1:1000	Bio-Rad

Az inkubáció után a membránokat 30 percig PBST (1 [V/V]% Tween-20 [Sigma-Aldrich] tartalmú PBS oldat) oldatban mostuk, majd bárányban termeltetett egér, illetve kecskében termeltetett nyúl immunglobulin Fc-szakasza elleni, tormaperoxidázzal (HRP) konjugált kecske másodlagos antitesttel (Bio-Rad) inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten (hígítás: 1:1000, 5 g/100 ml tejporth tartalmazó PBS oldatban). Az immunjeleket minden esetben kemilumineszcens SuperSignal® West Pico, illetve Femto Chemiluminescent Substrate kit (Pierce) segítségével tettük láthatóvá, KODAK Gel Logic 1500 Imaging System (Eastman Kodak Company, NY, USA) készülék felhasználásával. A kapott immunjelek digitális rögzítését *Kodak MI 4.0.5* (Eastman Kodak Company) szoftverrel végeztük. A sávok szemikvantitatív denzitometriás analízisére *ImageJ 1.49v* program segítségével került sor (NIH, Bethesda, MD, USA). Ahol az ábrákon jelezve van, ott az egyenlő mintafelvétel ellenőrzésére „stripping puffer”-ben (1,5 g/100 ml glicin, 0,1 g/100 ml SDS, 1 [V/V]% TWEEN-20, pH 2,2; Sigma-Aldrich) történő intenzív mosást követően a membránokat β-aktin, illetve β-tubulin ellenes antitestekkel is inkubáltuk, majd a fentebb leírtaknak

megfelelően elvégzett Western blotot követően az egyes sávok optikai denzitását előbb a mintafelviteli kontrollra normáltuk.

Az ERK1/2 és p-ERK1/2, valamint a FAAH Western blotok egy részének technikai kivitelezéséért *Ambrus Lídiát* és *Uzonyi Renátát* illeti köszönet.

5.13. *A citokinfelszabadulás vizsgálata (IL-6 és IL-8 ELISA)*

A citokinfelszabadulás vizsgálatának technikai kivitelezésében *Ambrus Lídia* és *Szabó-Papp Judit* nyújtott segítséget.

A standardizált módon (400.000 sejt 1,5 ml tápoldatban, 35 mm átmérőjű Petri-csészékben) szélesztett sejteket a jelzett módokon kezeltük 24 órán keresztül. Ezt követően a felülúszókat begyűjtöttük, és a további felhasználásig -80°C-on tároltuk, majd OptEIA kitek segítségével, a gyártó protokollját követve meghatároztuk a felszabadult IL-6 és IL-8 mennyiségét (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA).

5.14. *A FAAH aktivitásának in vitro mérése*

A FAAH-aktivitás mérését kollaborációs partnereink (*Simon Nicolussi* és *Jürg Gertsch*) végezték. A radioaktívan jelölt [etanolamin-1-³H]-AEA (60 Ci/mmol) az American Radiolabeled Chemicals Inc.-től (St. Louis, MO, USA), a Tris•HCl és az etilén-diamin-tetraacetát (EDTA) a Sigma-Aldrichtól, míg az Ultima Gold liquid scintillation cocktail a Perkin Elmertől (Schwerzenbach, Svájc) származott.

A FAAH enzimaktivitása az NHEK és HPV-KER sejtekben a radioaktívan jelölt [etanolamin-1-³H]-AEA hidrolízisének mérésével történt a korábban optimalizált protokoll szerint (Maccarrone és mtsai., 1998; Maccarrone és mtsai., 1999; Maccarrone és mtsai., 2001; Oddi és mtsai., 2005; Nicolussi és mtsai., 2014b).

5.15. Szelektív géncsendesítés RNS interferencia technikával (RNSi)

Az SZ95 szebocitákat Petri-csészékben tenyésztettük, majd az 50-70%-os konfluencia elérésekor a tápoldatot szérummentes OptiMem médiumra (Life Technologies) cseréltük, és a sejteket 40 nM humán TRPV1-, TRPV2-, illetve TRPV4-, valamint NRIP1 és TRIB3-specifikus, duplaszálú, kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal transzfektáltuk Lipofectamine® 2000 (Life Technologies) transzfekciós reagens segítségével (5. táblázat).

Kontrollként a sejteket Stealth RNAi Negative Control „medium” (Life Technologies) duplaszálú siRNS-sel transzfektáltuk, ami semmilyen ismert mRNA szekvenciájával sem mutat homológiát („scrambled” siRNS, „SCR”).

5. táblázat Az RNSi kísérletek során alkalmazott siRNS konstruktok áttekintése

Célmolekula	Konstrukt azonosító	Rövidítés
TRPV1	HSS111304	siV1a
	HSS111306	siV1b
TRPV2	HSS122144	siV2a
	HSS122145	siV2b
TRPV4	HSS126973	siV4a
	HSS126974	siV4b
NRIP1	HSS112045	siNRIP1a
	HSS112046	siNRIP1b
TRIB3	HSS184051	siTRIB3a
	HSS184052	siTRIB3b

A géncsendesítés hatékonyságát a transzfekciót követően naponta ellenőriztük Western blot és Q-PCR segítségével. Kísérleteinket a génexpresszió minimális szintje mellett (jellemzően a második-harmadik napon) végeztük.

5.16. Az intracelluláris 3'-5'-ciklikus adenzin-monofoszfát koncentráció meghatározása (cAMP ELISA)

Az SZ95 szebocitákat 1 órán át kezeltük CBD-lal (10 µM) vagy oldószerrel (1 [V/V]% abszolút etanol), majd a gyártó által javasolt protokollt követve a sejteket 10⁷ sejt/ml-es denzitásban lizáltuk, és Parameter Cyclic AMP Assay (R&D Systems Inc., Minneapolis, Kanada) segítségével vizsgáltuk. A kapott eredmények kiértékeléséhez a MyAssays Ltd.

(Haywards Heath, Egyesült Királyság) *on-line* elérhető elemző alkalmazását használtuk (<http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay>).

5.17. Patch-clamp mérések (teljes sejt elrendezés)

A CBD-kezelés elektrofiziológiai hatásait vizsgáló patch-clamp kísérletek elvégzéséért *Pál Balázst*, a Debreceni Egyetem, ÁOK, Élettani Intézet Neurobiológiai munkacsoportjának tagját illeti köszönet, míg a GSK hatásainak vizsgálatára a „*Laboratory for Ion Channel Research*”-ben (KU Leuven) került sor; ez utóbbi kísérleteket *Tóth István Balázs* és *Thomas Voets* végezték.

A teljes sejt elrendezésben készült mérések kivitelezésére Axopatch 200A erősítő és Clampex 10.0 szoftver (Molecular Devices), illetve EPC-10 erősítő és Patchmaster szoftver (HEKA Elektronik, Ludwigshafen, Németország) segítségével került sor. A CBD által kiváltott membránáramok mérésekor a kísérletek normál Ringer oldatban (NaCl: 140; KCl: 5; glükóz: 10; 4-[2-hidroxietil]-1-piperazin-etánszulfonsav [HEPES]: 10; CaCl₂: 2; MgCl₂: 1 és nátrium-piruvát: 1; mind mM-ban; pH 7,2; Sigma-Aldrich) zajlottak. A patch pipetták K-glükonát (120), NaCl (5), HEPES (10), etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA) (2), CaCl₂ (0,1), Mg-ATP (5), Na₃-GTP (0,3) és Na₂-foszfokreatinin (10; mind mM-ban; pH 7,3; Sigma-Aldrich) voltak töltve. A tartópotenciál -60 mV volt. A transzmembrán áramok mérésére a sejtek membránpotenciálját 2 másodpercenként 400 ms-os ciklushosszal -100 és +100 mV között változtatva került sor.

A TRPV4 áramok rögzítésekor a külső oldat 150 mM NaCl-ot, 6 mM CsCl-ot, 5 mM CaCl₂-ot, 1 mM MgCl₂-ot, 10 mM HEPES-t és 10 mM glükózt tartalmazott, és NaOH segítségével 7,4-es pH-ra volt pufferelve. A pipettaoldat 100 mM aszpartátot, 20 mM CsCl-ot, 1 mM MgCl₂-ot, 0,08 mM CaCl₂-ot, 4 mM Na₂ATP-t, 10 mM 1,2-bisz(o-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsavat (BAPTA) és 10 mM HEPES-t tartalmazott (mind a Sigma-Adrichtól). Ez utóbbi pH-ja CsOH-dal (Sigma-Adrich) 7,2-re volt beállítva, ami

mindösszesen megközelítőleg 100 mM Cs-aszpartát végkoncentrációt jelentett a pipettaoldatban. A tartópotenciál 0 mV volt. A transzmembrán áramok mérésére a sejtek membránpotenciálját 2 másodpercenként 400 ms-os ciklushosszal -120 és +100 mV között változtatva került sor.

5.18. *Fluoreszcens Ca^{2+} -mérés*

A CBD Ca^{2+} -homeosztázisra gyakorolt hatásainak vizsgálatához Fluo-4 AM jelölést használtunk. A Fluo-4 egy Ca^{2+} -érzékeny fluoreszcens festék, ami a hozzákapcsolt „AM” (acetoxi-metilészter) csoportnak köszönhetően képes bejutni a sejtekbe, ahol nem-specifikus észterázok lehasítják az „AM” részt, csapdába ejtve ezzel a Fluo-4-et a sejt belsejében. A Fluo-4-nek szabad Ca^{2+} jelenlétében jelentősen megnő a fluoreszcencia intenzitása, amit a mérés során detektálhatunk.

A szebocitákat 96 lyukú („black well/clear bottom”) lemezekre (Greiner Bio-One) szélesztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban. A mérés során a felülúszó eltávolítása után egyszer mostuk a sejteket 100 μl /lyuk Hank oldattal (136,75 mM NaCl, 5,56 mM glükóz, 5,36 mM KCl, 4,17 mM NaHCO_3 , 1,26 mM CaCl_2 , 0,34 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,44 mM KH_2PO_4 , 0,81 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mM HEPES; pH 7,2), melyet BSA-val (Sigma-Aldrich; végkoncentráció: 0,1 g/100 ml) és a nem-specifikus transzporterek által mediált Fluo-4 „szivárgás” elkerülésére probeneciddel (Life Technologies; végkoncentráció: 2,5 mM) egészítettünk ki. Azokban az esetekben, amikor névlegesen kalciummentes Hank oldatot készítettünk („ Ca^{2+} -mentes Hank oldat”), a CaCl_2 -ot ekvimoláris mennyiségű glükózzal pótoltuk.

A mosást követően Fluo-4 AM-et tartalmazó Hank oldattal (100 μl /lyuk; végkoncentráció: 1 μM) töltöttük fel a sejteket (30 perc, 37°C), majd újabb három mosási lépés következett (100 μl /lyuk Hank oldat vagy Ca^{2+} -mentes Hank oldat). Végül a sejtekre 150 μl /lyuk Hank oldatot vagy Ca^{2+} -mentes Hank oldatot mértünk, és újabb 30 percig

inkubáltuk őket 37°C-on, ami alatt előkészítettük a vizsgálni kívánt koncentrációkhoz képest négyszeres töménységű kezelőoldatokat tartalmazó lemezt. Ezt követően FlexStation™ II³⁸⁴, illetve FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével „Flex” módban végeztük el a mérést (excitáció: 490 nm; emisszió: 520 nm) szobahőmérsékleten (20-22°C). Ennek során 3-5 percen keresztül rögzítettük az egyes lyukakban detektálható fluoreszcencia intenzitást (az egyes mérésekre nagyjából 1,2 másodperces időközökkel került sor). A mérés harmincötödik másodpercében a készülék az előre beállított programnak megfelelően 50 µl kezelőoldatot mért a sejtekre, így először egy 35 másodperces (kezelés előtti) alapjelet rögzíthettünk, aminek az átlagértékét a kiértékelés során minden esetben kivontuk a mért értékekből, ezzel azonos alapvonalra normalizálva és könnyen összehasonlíthatóvá téve méréseinket. Minden kezelést legalább 3 ismétléssel végeztünk, és a relatív fluoreszcencia intenzitást a 35 másodperces alapjellel korrigálva, átlag±SEM alakban ábrázoltuk.

5.19. Teljes vastagságú humán bőr szervkultúra (hSOC)

A hSOC kísérleteket lübecki kollaborációs partnereink (*Koji Sugawara, Jennifer Kloepper és Ralf Paus*) végezték. A kísérletek a Lübecki Egyetem Intézményi Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával (*engedélyszám: 06-109*), a Helsinki Deklaráció irányelveinek betartásával történtek. A donorok a megfelelő tájékoztatást követően írásban hozzájárultak bőrmintáik kutatási célú felhasználásához.

5.19.1. Minta-előkészítés és tenyésztés

A 4 mm átmérőjű, teljes vastagságú „punch” biopsziák 4, bőrgyógyászati szempontból egészséges női donor (átlagéletkor: 56 év) kar, illetve fejbőréből körkésekkel (pfm medical ag, Köln, Németország) kerültek eltávolításra. A bioptátumok fenntartása szérumentes, 2 mM L-glutaminnal (Life Technologies), 10 ng/ml hidrokortizonnal (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml inzulinnal (Sigma-Aldrich) és 1% antibiotikum/antimikotikum keverékkel (PAA

Laboratories GmbH) kiegészített William's E médiumban (Biochrom), a folyadék-levegő interfázisban történt a korábban leírtak szerint 37°C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó, párasított légterben (Lu és mtsai., 2007; Tiede és mtsai., 2009; Hinde és mtsai., 2013).

5.19.2. A faggyúlipid-tartalom meghatározása: Oil Red O festés

A megfelelő kezeléseket követően a folyékony nitrogén segítségével cryomatrixba (Thermo Shandon Limited; St. Leon-Rot; Németország) ágyazott mintákból 6 µm vastagságú metszetek készültek Oil Red O jelölésre. Desztillált vízzel történő mosást követően a fagyasztott metszetek 60% izopropanolban (Sigma-Aldrich) voltak inkubálva, majd frissen készített, izopropanolban oldott 0,3%-os Oil Red O oldattal voltak jelölve. A sejtmagfestés hematoxilinnel (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Németország) történt, végül pedig a metszetek vizes bázisú beágyazó médiummal lettek lefedve (DAKO). A képanalízis *ImageJ 1.49v* szoftver segítségével készült (NIH).

5.19.3. A proliferáló sejtek arányának vizsgálata: Ki67 immunjelölés

A proliferáció vizsgálatára Ki67 immunjelölés szolgált. A megfelelő kezeléseket követően a metszetek egérben termeltetett, humán Ki67 ellenes elsődleges antitesttel voltak jelölve (Green Diluentben [DAKO] 1:20 arányban hígítva; DAKO) egy éjszakán át 4°C-on. Másodlagos antitestként rodaminnal konjugált, kecskében termeltetett, egér immunglobulin Fc-szegmens ellenes antitest alkalmazására került sor (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.; Suffolk, Egyesült Királyság; 1:200 arányú hígításban Green Diluentben [DAKO], 45 percen keresztül szobahőn). A magfestés DAPI (1 µg/ml; 1 perc szobahőn) jelöléssel történt, majd a metszetek Fluoromount (Southern Biologies, Tallahassee, FL, USA) fedőmédiummal lettek fedve. A képek rögzítésére BZ-8100 fluoreszcens mikroszkóppal (Biozero, Keyence, Itasca, IL, USA) került sor. A sejtmagok jelölése DAPI-val (Vector Laboratories) történt. A

sejtszámok vizsgálatára csoportonként 2 metszeten került sor; az egyes metszetek egymástól mért távolsága legalább 50 µm volt.

5.20. *Az AD állatmodellje: kísérletek NC/Tnd egereken*

A kísérleteket a *BioTox Sciences* (BTS; San Diego, CA, USA) cég munkatársai végezték. A kísérleti tervet, valamint az állatok fenntartását és kezelését az Intézményi Állatjóléti és Felhasználási Bizottság (IACUC) felügyelte (*engedélyszám: 1109-05*). A kísérletek és az állatok fenntartási körülményei megfeleltek a BTS állatjóléti szabályainak, és mindenben a „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition. National Academy Press, Washington, DC, 2010*” irányelveit követték.

A tanulmányban 8-9 hetes hím NC/Tnd (korábban NC/Nga-ként ismert; Jung és mtsai., 2011) egerek vizsgálatára került sor csoportonként 8-9 egérrel, két részletben²⁹. Ezen egerek speciális, patogénmentes tenyésztési körülmények között tünetmentesek, azonban „hétköznapi” allergénekkal történő találkozást követően a humán AD-re klinikai és szövettani szempontból nagyon emlékeztető, viszkető bőrgyulladás alakul ki bennük. Ennek részeként egyébek mellett hiper- és parakeratózis, akantózis, magas lézionális CD4/CD8 T-sejt arány, makrofág infiltráció, hízósejt degranuláció és emelkedett szérum IgE szint figyelhető meg (Jung és mtsai., 2011; Tanaka és Matsuda, 2011).

Esetünkben az AD-szerű elváltozások kiváltása standardizált poratka kivonatokkal (15.000 AU/ml *Dermatophagoides pteronyssinus* és *D. farinae*) segítségével történt (Hollister-Stier Laboratories, Spokane, WA, USA). Az állatok a teljes betegségpontszám (TBP) alapján lettek véletlenszerűen csoportosítva úgy, hogy minden csoportban a kiindulási átlagos pontszám 1 körül legyen. A TBP megállapítására a nyak alsó, illetve a hát felső részének vizsgálatával került sor egy 0-tól 3-ig terjedő szubjektív skála (0: tünetmentes; 1:

²⁹ A kísérletsorozatban más anyagok vizsgálatára is sor került, azonban ezen eredmények a folyamatban lévő szabadalmi védelmi eljárás miatt sem a publikációban, sem a jelen dolgozatban nincsenek bemutatva.

enyhe tünetek; 2: közepesen súlyos tünetek; 3: súlyos tünetek) segítségével, melynek során a bőrpír, az ödémaképződés/papuláció, illetve a váladékozás, pörkképződés és vérzés fennállása/súlyossága volt a vizsgálódás tárgya a nyak alsó és a hát felső felén. Az állatok ezt követően 30 napon keresztül voltak naponta egyszer vivőanyaggal (aceton és olívaolaj 4:1 arányú keveréke), illetve FAAH-inhibitorokkal (WOBE440 és WOBE479; mindkettő 1 g/100 ml koncentrációban topikálisan a vizsgálati területre adagolva) kezelve. Pozitív kontrollként tacrolimus kezelés (a korábban már említett speciális vivőanyagban 0,1 g/100 ml koncentrációban, szintén topikálisan adagolva) hatékonyságának vizsgálatára került sor. A TBP és a teljes fülvastagság mérésére hetente kétszer, a jelzett időpontokban került sor. Az adatok átlag $\pm$ SEM alakban kerülnek bemutatásra.

5.21. Statisztikai analízis

Az adatokat az *IBM SPSS Statistics 19* (SPSS Inc., Armonk, NY, USA), illetve *Origin Pro Plus 6.0* szoftver (Microcal) segítségével, Student-féle párosított (patch-clamp analízis), illetve kétoldalú, kétmintás *t*-próbával (páros összehasonlítások) vagy egyutas ANOVA-t követő Bonferroni és Dunnett *post hoc* tesztekkel (többszörös összehasonlítás) vizsgáltuk, és a $P < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikáns különbségnek. A variancia homogenitását Levene teszttel vizsgáltuk. Amennyiben ez inhomogenitást jelzett, a Bonferroni helyett Games-Howel tesztet végeztünk. A grafikonokat *Origin Pro Plus 6.0* szoftver (Microcal) segítségével ábrázoltuk.

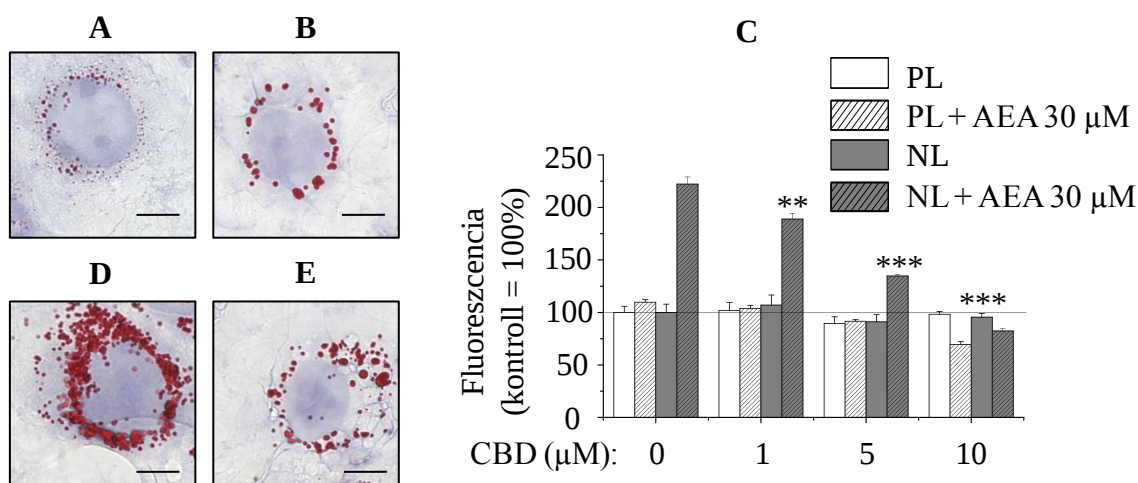
6. Eredmények

6.1. A CBD komplex „anti-acne” hatásokat mutat

Kísérleteinket a *Bevezetésben*, az *Irodalmi áttekintésben* és a *Célkitűzésekben* részletezett megfontolásoknak megfelelően a CBD humán faggyúmirigysejtekre gyakorolt biológiai hatásainak felderítésével kezdtük meg.

6.1.1. A CBD nem befolyásolja a bazális faggyúlipid-termelést, de kivédi az AEA lipidszintézist fokozó hatását

Amint arról az előzőekben már szó esett, korábbi eredményeink alapján fény derült arra, hogy a humán FM-ek funkcionálisan aktív ECS-rel rendelkeznek, aminek kulcsszerepe van a szebociták differenciációjának és ezen keresztül lipidtermelésének szabályozásában (Dobrosi és mtsai., 2008). Ennek megfelelően kísérleteink kezdetén arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a CBD miként befolyásolja a sejtek lipidtermelését.



7. ábra A CBD normalizálja az AEA-dal indukált neutrálislipid-szintézist, de nem befolyásolja a bazális faggyúlipid-termelést

(A, B, D, E) Tenyészteteinket 24 órán keresztül kezeltük (A: kontroll; B: CBD 10 μ M; D: AEA 30 μ M; E: AEA 30 μ M + CBD 10 μ M), majd Oil Red O festést végeztünk. A piros festődést mutató területek a szebociták plazmájában látható lipidcseppek, a magfestéshez hematoxilint (*kék*) használtunk, a kalibrációs egyenes hossza 10 μ m. C) Tenyészteteinket 24 órán keresztül kezeltük, majd fluoreszcens Nile Red jelölést végeztünk. PL: poláros lipidek. NL: neutrális lipidek. A kapott értékeket átlag $\pm$ SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. **, *** $P < 0,01$, illetve 0,001 a kizárólag AEA-dal kezelt csoporthoz képest. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Megállapítottuk, hogy szemben az eCB-ok esetén tapasztaltakkal, a CBD nem befolyásolta a sebociták bazális lipidtermelését (7/A-C **ábra**). Érdekes módon azt is megfigyeltük, hogy a CBD dóziszfüggő módon képes volt teljes mértékben kivédeni az AEA lipidszintézist fokozó hatását (7/C-E **ábra**), miközben a sejtszámmal korreláló poláros lipidek szintjében nem okozott érdemi változást. Tekintettel arra, hogy az *acne* kialakulásának egyik kulcslépése a kórosan fokozott faggyútermelés megjelenése, eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a CBD alkalmazása „*anti-acne*” hatású lehet.

6.1.2. A CBD „univerzális” liposztatikus hatást mutat

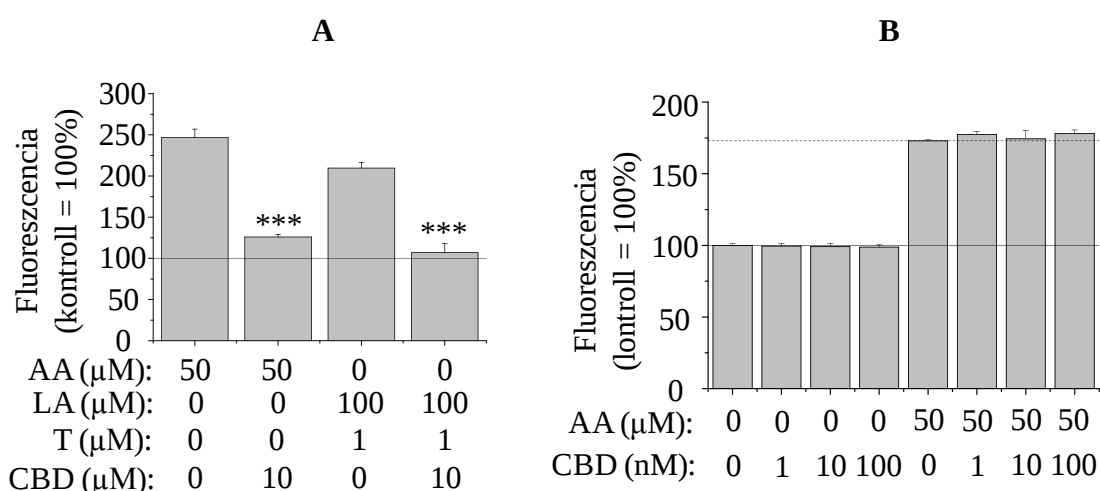
Míthogy a CBD-ról ismert, hogy az AEA lipogén hatását közvetítő CB₂ receptoron NAM-ként/inverz agonistaként viselkedhet (Thomas és mtsai., 2007; Laprairie és mtsai., 2015), előző kísérletünket tovább gondolva a következőkben azt vizsgáltuk meg, hogy a CBD által kiváltott liposztatikus hatás csak az eCB AEA-dal szemben alakul ki (azaz vélhetőleg a CB₂-gátlás számlájára írható), vagy pedig egy általános, a „klasszikus” kannabinoid rendszertől független lipidszintézist normalizáló aktivitással állunk szemben. A kérdés eldöntésére megismételtük előző kísérletünket olyan lipogén ágensek (AA, valamint linolsav [LA] és tesztoszteron [T] kombinációja) alkalmazásával, amelyekről ismert, hogy az ECS-től független útvonalakon fejtik ki hatásukat³⁰.

Megállapítottuk, hogy a CBD 10 µM-os koncentrációban tökéletesen kivédte mind az AA, mind a LA+T kombináció zsírosító hatását (8/A **ábra**), ami arra engedett következtetni, hogy mechanizmusa nem CB₂ receptor-kapcsolt, azaz eredményeink szerint a CBD „univerzális” (az ECS-től független) liposztatikus hatást mutatott.

Mivel irodalmi adatok utalnak arra, hogy egyes kannabinoid vegyületek koncentrációfüggő módon homlokegyenest ellenkező élettani hatásokat válthatnak ki egyes

³⁰A LA+T kombináció valószínű elsődleges célpontjai a PPAR-ok (Makrantonaki és mtsai., 2007), míg az AA hatásai a novel protein kináz C δ izoforma aktiválásához kötődnek (Géczy és mtsai., 2012).

rendszerekben (Rey és mtsai., 2012), ezért megvizsgáltuk azt is, hogy a CBD alacsony, nanomoláris koncentrációi miként befolyásolják a lipidtermelést. Megállapítottuk, hogy a CBD az 1-100 nM-os koncentrációtartományban nem befolyásolta sem a bazális, sem pedig az AA-val indukált lipidtermelést (**8/B ábra**). Ez arra utal, hogy biológiai aktivitásának irodalmi adatok alapján ismert bifázisos kinetikájával a szebociták lipidszintézisére gyakorolt hatások esetén nem kell számolnunk.



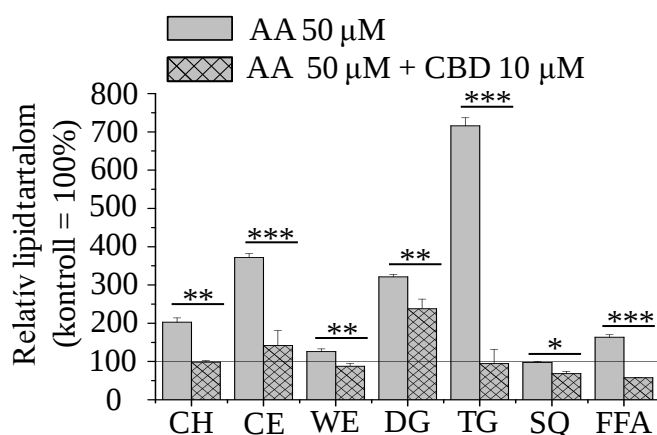
8. ábra A CBD alacsony mikromoláris koncentrációban univerzális liposztatikus hatást mutat

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

6.1.3. A CBD nemcsak mennyiségi, hanem minőségi értelemben is normalizálja a lipidtermelést

Tekintettel arra, hogy az *acne* patogenezise során nemcsak mennyiségi, hanem minőségi változásokon is keresztülmegy a faggyútermelés (Picardo és mtsai., 2009; Ottaviani és mtsai., 2010; Zouboulis és mtsai., 2014b), a CBD celluláris lipidhomeosztázisra kifejtett hatásainak feltárását célzó fenomenológiai vizsgálataink zárásaként a szebocita lipidomra gyakorolt hatásokat vettük górcső alá. Megállapítottuk, hogy a CBD nemcsak kvantitatív, hanem kvalitatív értelemben is normalizálja az AA-val indukált *acnet*, illetve szeborreát modellező faggyúlipid-túltermelést (**9. ábra**). Ezek az eredmények ismét amellet szoltak, hogy a CBD

anti-acne hatásokat mutathat; így a következőkben megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolja az *acne* patogenezisében fontos szerepet játszó további szebocita-specifikus faktorokat.



9. ábra A CBD kvalitatív értelemben is normalizálja a faggyúlipid-termelést

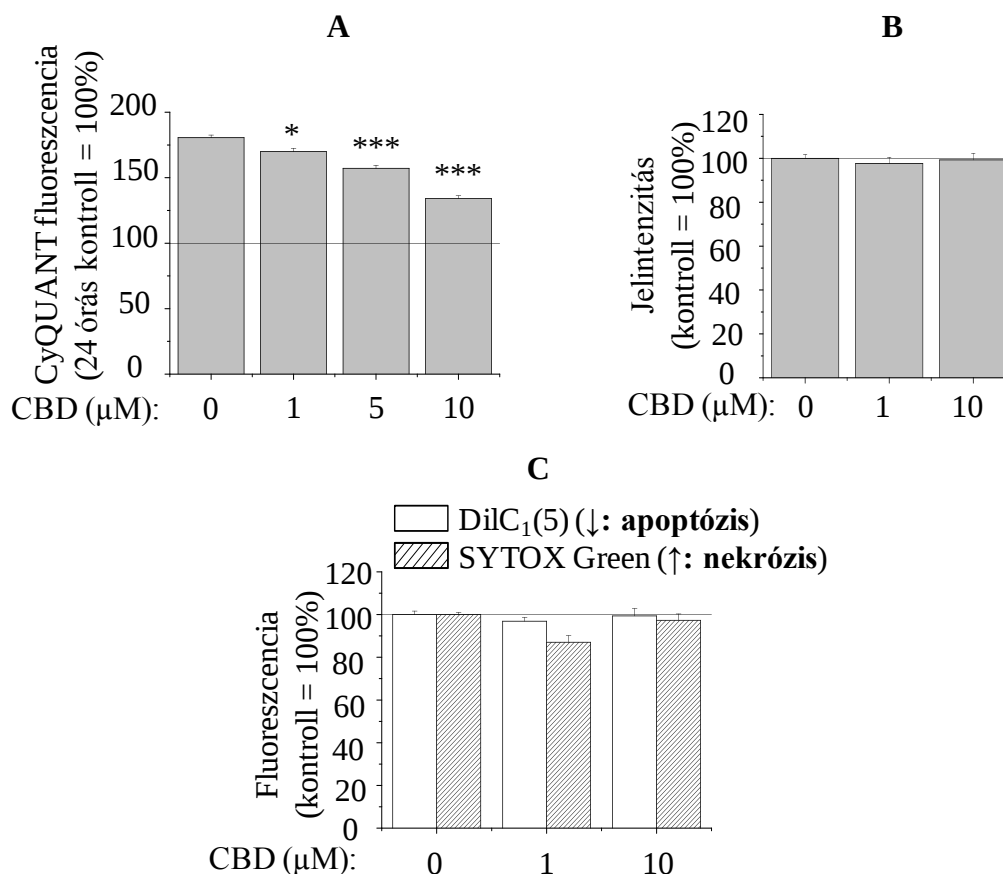
A ~60%-os konfluenciáig tenyésztett sejteket 24 órán keresztül kezeltük, majd az egyes lipidcsoportok mennyiségi vizsgálatára *Anyagok és módszerek* fejezetben leírtaknak megfelelően RR-RP-HPLC-ToF/MS analízis révén került sor. Az eredményeket átlag $\pm$ SD alakban (N=3) a kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. CH: koleszterol; CE: koleszterol-észterek; WE: viasz-észterek; DG: digliceridek; TG: trigliceridek; SQ: szkvalén; FFA: szabadzsírsavak. *, **, *** $P < 0,05, 0,01, 0,001$.

6.1.4. A CBD az életképesség befolyásolása nélkül anti-proliferatív hatást mutat

Amint arról az *Irodalmi áttekintés*ben is szó esett, az *acne*hoz vezető szeborrea kialakulásában (a holokrin szekréciós mechanizmus miatt) az individuális szebociták fokozott lipidtermelésén túl a sejtek proliferációja is meghatározó jelentőségű: a proliferáció csökkentése ilyen módon önmagában is nagy hatékonysággal lehet képes mérsékelni *in vivo* a faggyútermelést (Kurokawa és mtsai, 2009; Layton, 2010; Schneider és Paus, 2010). Ezen elméleti megfontolásoktól vezérelve kísérleteink következő lépéseként megvizsgáltuk a CBD sejtszámra gyakorolt hatásait, és kimutattuk, hogy dóziszfüggő módon csökkentette a szebociták proliferációját az 1-10 μ M-os koncentrációtartományban (10/A ábra).

Természetesen az ábrán látott proliferáció csökkenés (pontosabban: a sejtszámnak az adott napi kezeletlen kontrollhoz képesti lassabb növekedése) elméletileg nemcsak a sejtosztódás lassulása/gátlása miatt, hanem direkt citotoxicitás következményeként is kialakulhat. Ennek kizárására MTT-assayt és kombinált DilC₁(5)-SYTOX Green jelölést

végeztünk. Megállapítottuk, hogy (a Nile Red jelölés során kapottakkal összhangban; **7/B ábra**) az 1-10 μM -os koncentrációban alkalmazott CBD nem volt hatással a sejtek életképességére (48 órás kezelések, MTT-assay; **10/B ábra**), és nem indukált korai, sejtszámváltozással még nem járó apoptotikus/nekrotikus folyamatokat sem (24 órás kezelések, DilC₁(5)-SYTOX Green jelölés; **10/C ábra**).

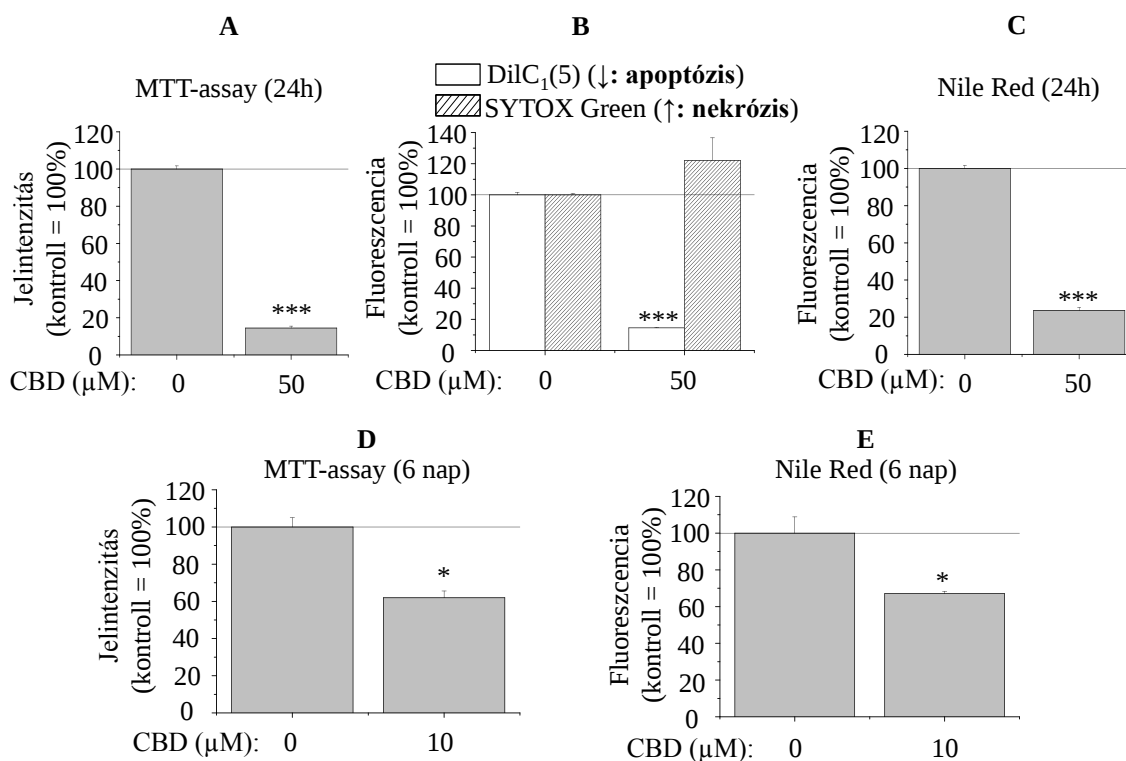


10. ábra A CBD 1-10 μM -os koncentrációban alkalmazva nem befolyásolja a szebociták életképességét

(A) Tenyészteinket 72 órán keresztül kezeltük, majd CyQUANT proliferációs assay-t végeztünk. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt 24 órás kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. *, *** $P < 0,05$, 0,001 a 72 órás kontrollhoz képest. (B) Tenyészteinket 48 órán keresztül kezeltük, majd MTT-assay-t végeztünk. A kapott értékeket átlag $\pm$ SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. (C) Tenyészteinket 24 órán keresztül kezeltük, majd DilC₁(5)-SYTOX Green jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag $\pm$ SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

6.1.5. A hosszútávú, illetve nagy dózisú CBD-kezelés csökkenti a sejtszámot és vele a bazális lipidtermelést is

A következőkben vizsgálatainkat magasabb koncentrációtartományok és hosszabb időtartamú kezelések irányába is kiterjesztettük. Megállapítottuk, hogy a rövidtávú, nagy dózisú (24 óra, 50 μ M) CBD kezelés csökkentette a sejtek életképességét és apoptózist indukált (**11/A-B ábra**), valamint – feltehetően a sejtszámcsökkenés következtében – lipidtermelés-csökkenéshez is vezetett (**11/C ábra**). Hasonlóképpen az alacsonyabb dózisú, de elhúzódó (10 μ M, 6 nap) CBD kezelés szintén negatívan befolyásolta a sejtek életképességét és faggyúlipid-termelését (**11/D-E ábra**).



11. ábra A rövidtávú, nagy dózisú, illetve az elhúzódó, kisebb koncentrációban alkalmazott CBD-kezelés is csökkenti a szebociták életképességét és bazális faggyúlipid-termelését

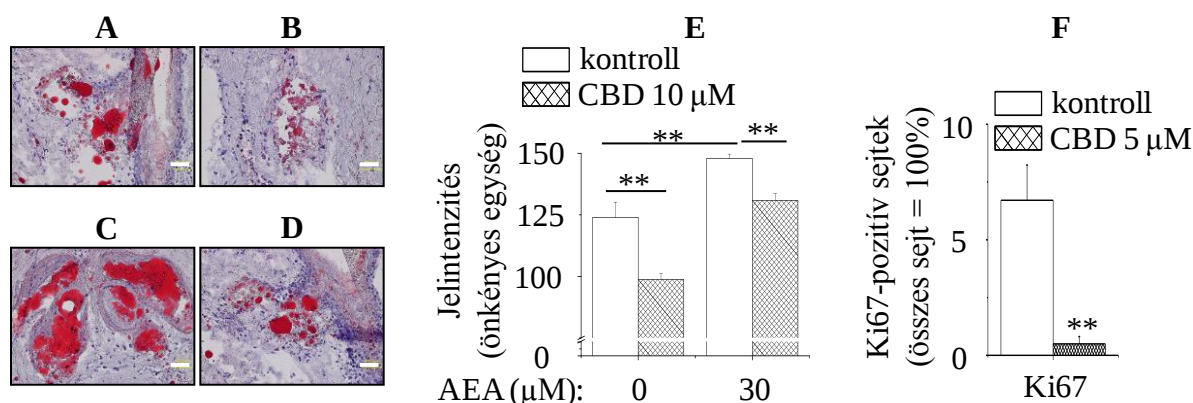
Tenyészeteinket 24 (A-C) órán át, illetve 6 napon keresztül (D-E) kezeltük, majd MTT-assay-t (A, D), DilC₁(5)-SYTOX Green (B), valamint Nile Red jelölést (C, E) végeztünk. A kapott értékeket átlag $\pm$ SEM alakban (N=4), az ábrákon folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. *, *** P <0,05, 0,001. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Mindezen eredményeink a CBD biológiai hatásainak egy fontos aspektusára világítottak rá. A tény, hogy a CBD-kezelés során van olyan koncentráció-időtartam kombináció, amiben

teljes értékű szebosztatikus (egyidejű liposztatikus és anti-proliferatív) hatások alakulnak ki a bazális faggyúlipid-termelés és a szebociták életképességének csökkentése nélkül, egy izgalmas és rendkívüli mértékben célzott *acne* terápiás lehetőségre hívja fel a figyelmet, hiszen az egészséges FM-ek alapvető működésének befolyásolása nélkül válhat elérhetővé az *acne*től sújtott területek izolált kezelése, aminek a jelentősége a reménybeli mellékhatásmentes kezelés szempontjából igen nagy.

6.1.6. A CBD szebosztatikus (liposztatikus+anti-proliferatív) hatása *ex vivo* is kialakul

Bár eddigi adataink önmagukban is reménykeltőek voltak a CBD majdani klinikai hatékonyságát illetően, eredményeink minél nagyobb *in vivo*-relevanciája érdekében kísérleteinket a jelenleg elérhető leginkább „*in vivo*-szerű” modellben (hSOC; Lu és mtsai., 2007; Tiede és mtsai., 2009; Hinde és mtsai., 2013)³¹ is megismételtük.



12. ábra A CBD szebosztatikus hatása „*in vivo*-szerű” körülmények között, teljes vastagságú humán bőr szervkultúrában is kialakul

Tenyészeteinket 14 (A-E), illetve 2 (F) napig kezeltük (A: kontroll; B: CBD 10 μM; C: AEA 30 μM; D: AEA 30 μM + CBD 10 μM), majd a megfelelő mintafeldolgozást követően Oil Red O festést (A-E), illetve Ki67 jelölést (F) végeztünk. (A-D) *Piros*: faggyúcsseppek; *kék*: hematoxilin (magfestés); a kalibrációs egyenes hossza 50 μm. (E). A lipidtermelés statisztikai analízise csoportonként 4 szövettani metszet vizsgálatával (átlag±SEM). ***P*<0,01. (F) A Ki67 pozitív sejtek arányának statisztikai analízise csoportonként 2 szövettani metszet vizsgálatával. A proliferáló, Ki67 pozitív sejtek száma az összes DAPI pozitív sejt százalékában, átlag±SEM alakban van ábrázolva. ***P*<0,01.

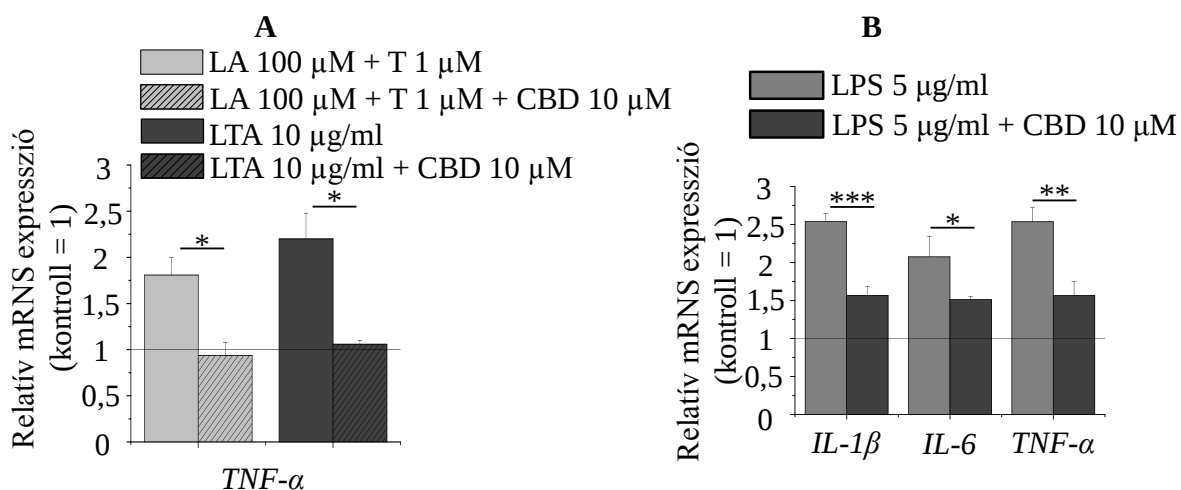
Megállapítottuk, hogy kéthetes kezeléseink során az *in vitro* sejttenyészeteken nyert eredményeinkkel teljes összhangban a CBD hatékonyan csökkentette az AEA-dal indukált

³¹Amint arról a 3.1.6. fejezetben szó esett, megfelelő állatmodell hiányában jelenleg a preklinikai vizsgálatok szintjén a hSOC a legmagasabb rendű, az *in vivo* körülményeket a legmesszebbmenőkig utánozó modell.

lipidtermelést, valamint visszafogta a bazális faggyútermelést is (12/A-E ábra). Hasonlóképpen, a CBD szignifikánsan csökkentette a proliferáló (Ki67 pozitív) szebociták arányát is (48 órás kezelés; 12/F ábra). Mindezen eredményeink arra utaltak, hogy a CBD *in vitro* tapasztalt kedvező szebosztatikus hatásai minden valószínűség szerint *in vivo* is kialakulhatnak.

6.1.7. A CBD „univerzális” gyulladásgátló hatást mutat

A fokozott mennyiségű és megváltozott minőségű faggyútermelés mellett az *acne* patogenezisének fontos „szebocita-specifikus” lépése a lokális gyulladásos reakció (Zouboulis és mtsai., 2005; Kurokawa és mtsai., 2009; Zouboulis és mtsai., 2014b). Éppen ezért egy potens *acne* ellenes szer esetén kíváncsiak voltunk, hogy szebosztatikus aktivitása mellett gyulladásgátló hatású is legyen. Ennek vizsgálatára fenomenológiai kísérleteink utolsó lépéseként különböző gyulladás-modelleket alkalmaztunk a szebocitákon.



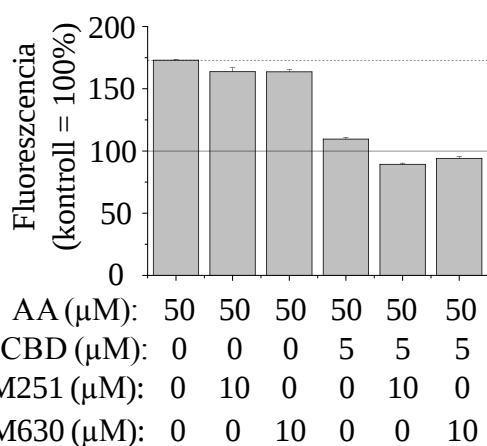
13. ábra A CBD univerzális gyulladásgátló hatást mutat

A Q-PCR vizsgálatot az ábrán jelzett 24 órás kezeléseket követően végeztük. Belső kontrollként a GAPDH expresszióját határoztuk meg, majd a relatív génexpressziók megállapítását követően az eredményeket a $\Delta\Delta$ CT módszert alkalmazva az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll expressziós szintjére normalizáltuk, és átlag $\pm$ SD (N=3) alakban ábrázoltuk. *, *** P <0,05, 0,001. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

A faggyúmirigysejtek „immunkompetens” viselkedéséről szóló irodalmi adatokkal összhangban megállapítottuk, hogy mind az „*acneszerű*” gyulladást modellező LA+T kombináció, mind a Gram-pozitív (lipoteichnoinsav [LTA]), illetve Gram-negatív

(lipopoliszacharid [LPS]) infekciókat utánozó kezeléseink jelentősen fokozták különböző jól ismert gyulladásos citokinek (LA+T és LTA: $TNF-\alpha$; LPS: $IL-1\beta$, $IL-6$ és $TNF-\alpha$) mRNS-szintű kifejeződését 24 órás kezelést követően (**13. ábra**). Kimutattuk, hogy a CBD egyidejű alkalmazása minden esetben normalizálta a vizsgált citokinek expresszióját (**13. ábra**), azaz a kiváltó stimulus jelátvitelétől független, „univerzális” gyulladásgátló hatást mutatott.

6.1.8. A CBD liposztatikus hatását nem „klasszikus” kannabinoid jelátvitel közvetíti



14. ábra A CBD liposztatikus hatása a CB_1 és CB_2 receptoroktól független úton alakul ki

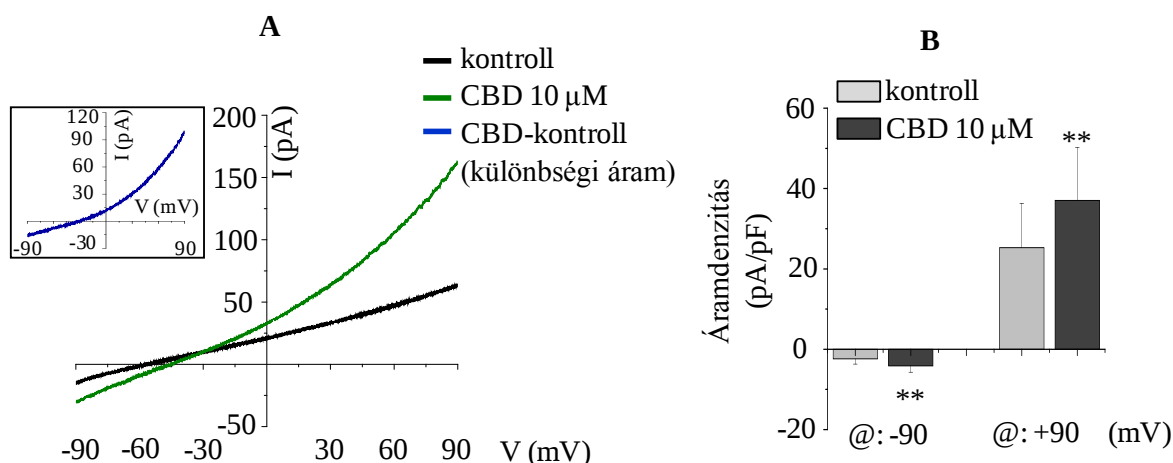
Tenyészeteinket 24 órán át kezeltük, majd Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag $\pm$ SEM alakban (N=4), az ábrákon folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. A pontozott vonal az AA-val kiváltott maximális lipogén válasz szintjét jelöli. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Kísérleteink első szakaszában a fentieknek megfelelően megállapítottuk, hogy a CBD komplex anti-acne hatásokkal rendelkezik, hiszen a kórosan fokozott lipidtermelés normalizálásával, valamint a proliferáció és a gyulladás csökkentésével egyidejűleg célozza az acne mindhárom „szebocita-specifikus” patogenetikai lépését; szebosztatikus hatásai ráadásul „in vivo-szerű” körülmények között is kialakulnak. Ezt

követően arra voltunk kíváncsiak, hogy a fenti jótékony hatások milyen sejtélettani mechanizmussal valósulnak meg.

Amint az az (egyébként némileg ellentmondásos) irodalmi adatok alapján (lásd a 3.2.3. alfejezetben) várható volt, a CBD liposztatikus hatása nem a „klasszikus”, metabotróp kannabinoid útvonalon (azaz a CB_1 és a CB_2 receptorok aktivációján keresztül) valósult meg (a CB_1 és CB_2 specifikus antagonisták/inverz agonisták nem befolyásolták a CBD liposztatikus hatását; **14. ábra**); ezért a következőkben a konvencionális patch-clamp technika

teljes sejt elrendezését alkalmazva megvizsgáltuk, hogy ionotróp receptorok lehetnek-e felelősek a látott hatások kialakulásáért. Megállapítottuk, hogy a 10 μM -os koncentrációban alkalmazott CBD kifelé egyenirányító áramot indukált, és pozitív irányba tolta el a reverzálpotenciált (15/A ábra). Hét sejt vizsgálatát követően elvégeztük a kapott jelek statisztikai analízisét is, és megállapítottuk, hogy a CBD-kezelés -90 és +90 mV-os membránpotenciál-értéken is kis, de szignifikáns növekedést okozott az áramdenzitásban (15/B ábra³²). Ezen eredmények egyértelműen arra utaltak, hogy a CBD alkalmazása sejtfelszíni kationcsatornák megnyílásához vezet a szebocitákon; így felmerült, hogy a látott lipidszintézist csökkentő hatásokért is ilyen ioncsatornák aktivációja lehet felelős.



15. ábra A CBD kifelé egyenirányító membránáramot indukál a humán szebocitákon

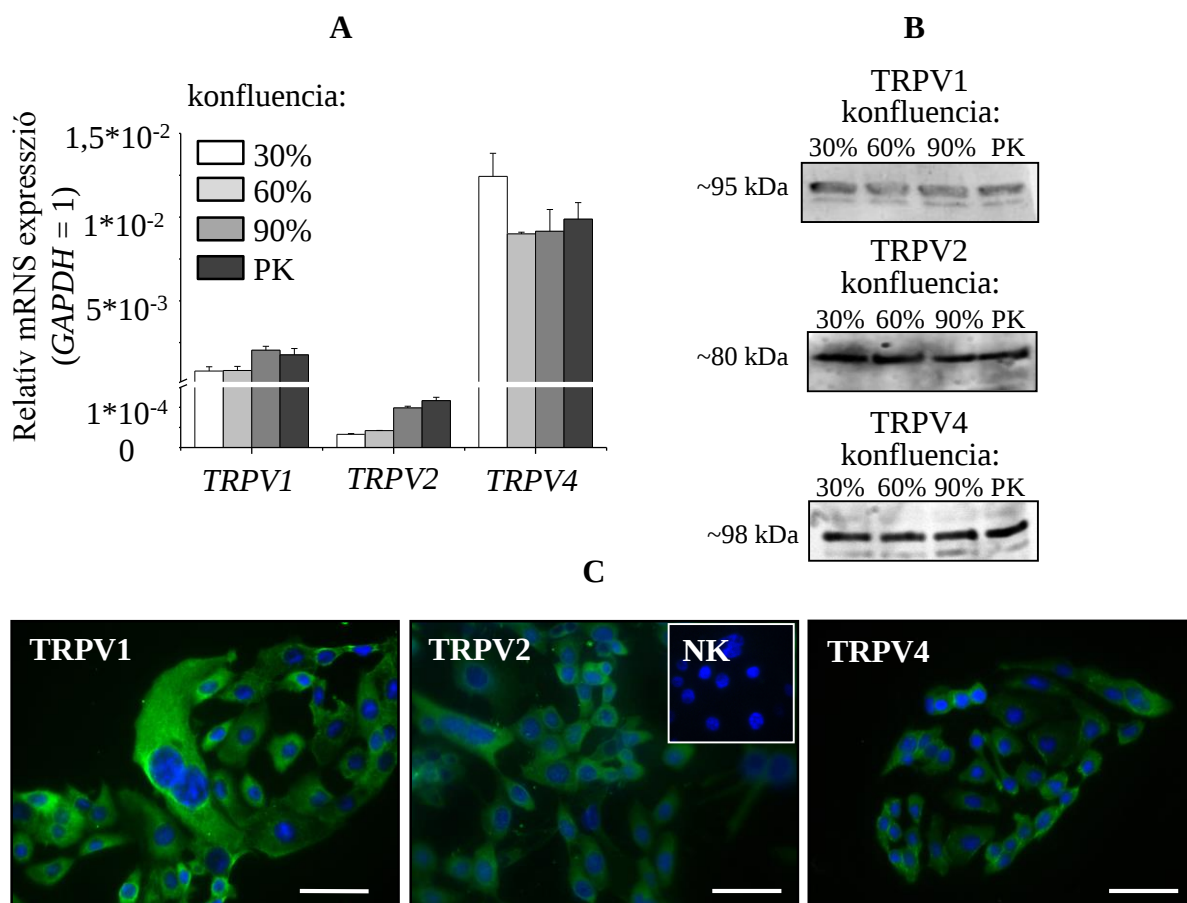
(A) Reprezentatív áram-feszültség görbék (konvencionális patch-clamp technika, teljes sejt elrendezés). Az inzertben látható kék görbe a CBD által indukált különbségi (CBD-kontroll) áramot mutatja. (B) 7 sejt átlagos áramdenzitás értékei (átlag $\pm$ SEM) -90 és +90 mV-os membránpotenciál értékeknél. ** $P < 0,01$.

6.1.9. A szebociták kifejezik a TRPV1, -2 és -4 ionotróp kannabinoid receptorokat

Irodalmi adatok alapján a CBD-ról ismert, hogy számos, a TRP ioncsatorna szupercsaládba tartozó ionotróp kannabinoid receptorként is funkcionáló kationcsatorna aktivitását fokozhatja (Bisogno és mtsai., 2001; Qin és mtsai., 2008; De Petrocellis és mtsai., 2011). Tekintettel arra, hogy munkacsoportunk nemrégiben kimutatta, hogy ezek egyikének, a

³² Az ábrán látható meglehetősen nagy szórás jól mutatja a szebociták változatos differenciáltsági állapotából adódó nagyfokú heterogenitást. Ez, valamint a differenciáció során felszaporodó lipidek és a felszíni membrán sérülékenysége jelentősen megnehezítette az elektrofiziológiai mérések kivitelezését.

TRPV1-nek az aktiválása a csípőspaprika „hatóanyagával”, a kapszaicinnal, a CBD most feltárt lipidszintézist csökkentő hatásához hasonló liposztatikus aktivitás kialakulásához vezet (Tóth és mtsai., 2009), kísérleteink következő lépéseként megvizsgáltuk, hogy ezeknek a receptoroknak lehet-e szerepe a CBD hatásainak közvetítésében.

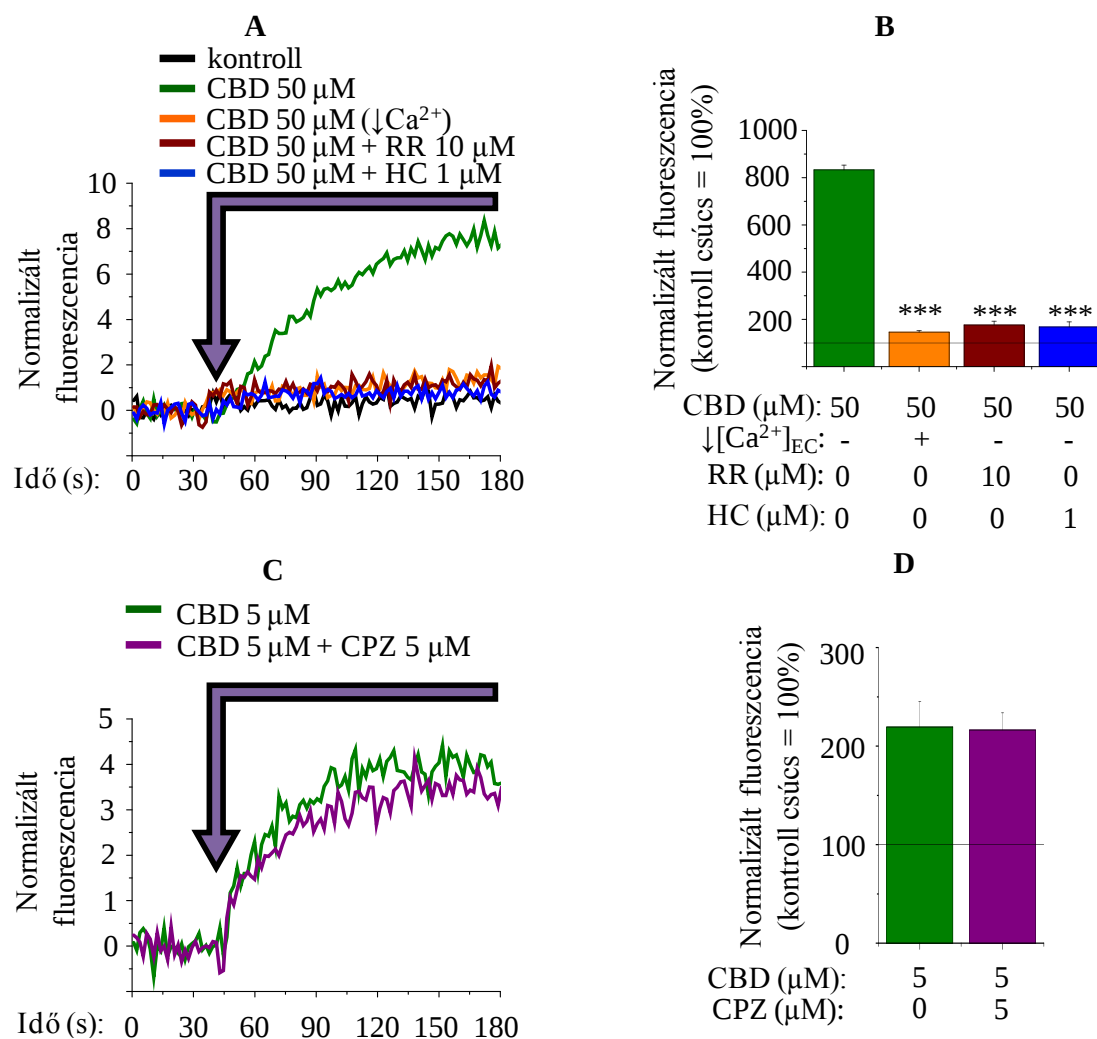


16. ábra *A szebociták kifejezik a TRPV1, -2 és -4 ionotróp kannabinoid receptorokat*

(A) A Q-PCR vizsgálatot 30, 60 és 90%-os konfluenciájú tenyészetekből, valamint posztkonfluens kultúrákból (PK) kiindulva végeztük. Belső kontrollként a *GAPDH* expresszióját határoztuk meg, majd a relatív génexpressziók megállapításához az eredményeket a ΔCT módszert alkalmazva a *GAPDH* expressziós szintjére normalizáltuk, és átlag $\pm$ SD alakban (N=3) ábrázoltuk. (B) A Western blot vizsgálat során 30, 60 és 90%-os konfluenciájú tenyészetekből, valamint PK kultúrából kiindulva az *Anyagok és módszerek* részben ismertetett módon jártunk el. (C) Az IF jelölés során ~60%-os konfluenciájú tenyészeteket vizsgáltunk. Zöld: TRPV1, -2, illetve -4-specifikus immunjelölődés; kék: DAPI magfestés. Negatív kontrollként (NK) az elsődleges antitest elhagyásával készült jelölést használtunk. Méretvonalak: 20 μ m.

Ennek kiderítésére elsőként kimutattuk (illetve a TRPV1 esetében megerősítettük; Tóth és mtsai., 2009), hogy a szebociták mind mRNS (Q-PCR), mind fehérje szinten (Western blot, IF) kifejezik a TRPV1-et, TRPV2-t és TRPV4-et, melyek közül (mRNS szinten) a TRPV4

mutatta a legmagasabb expressziót (**16/A-C ábra**); a TRPA1 és TRPM8 kifejeződése nem érte el a detekciós küszöböt (nem publikált adatok).



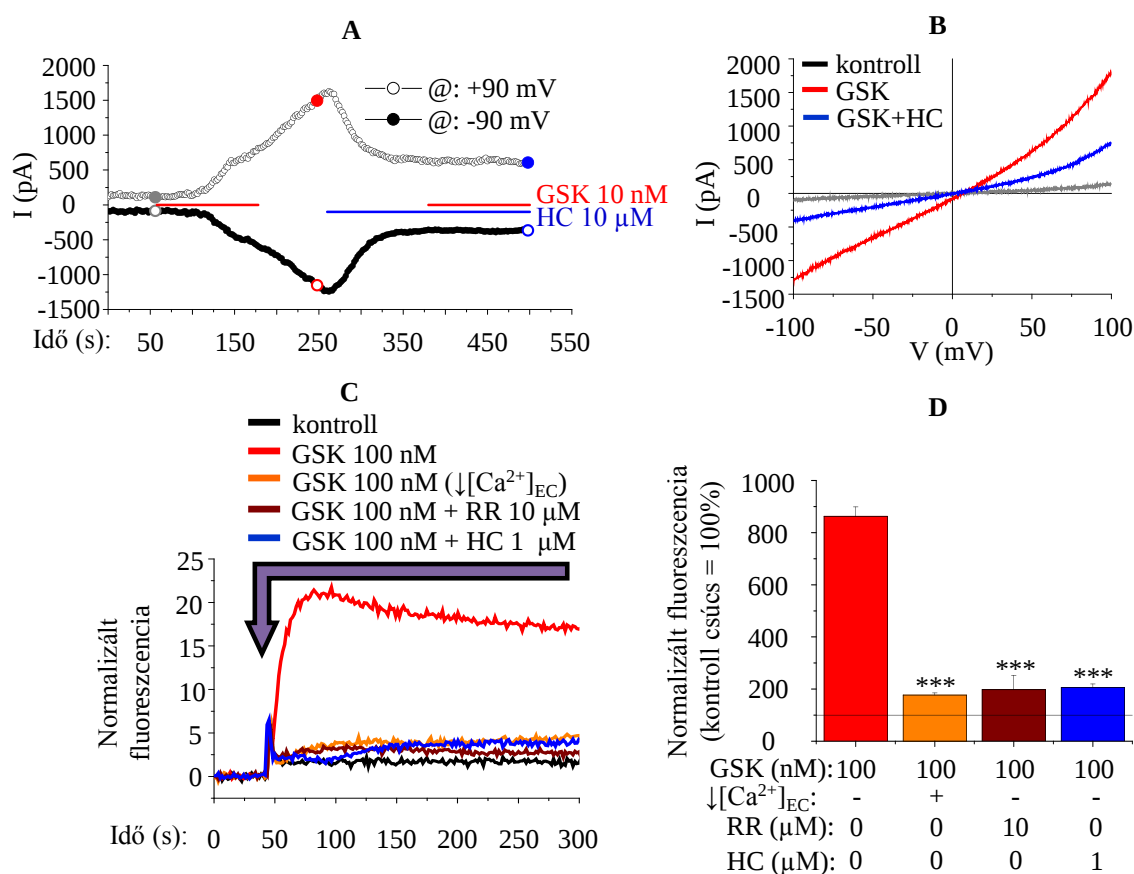
17. ábra A CBD TRPV4-mediált Ca^{2+} -jelet vált ki a sebocitákon

Fluoreszcens Ca^{2+} -mérések reprezentatív analóg görbéi (**A**, **C**), illetve statisztikai analízisei (**B**, **D**). A kezelőanyagok megfelelő kombinációinak bemérésére a kísérlet 35. másodpercében (nyíllal jelölve) került sor; a görbéket a kezelést megelőző alapjellel korrigáltan ábrázoltuk. (**B**, **D**) Az egyes görbék normalizált fluoreszcencia csúcscéit átlag $\pm$ SEM (N=3) alakban, az ábrán folytonos vonallal jelzett kontroll csúcscéit átlagának százalékában ábrázoltuk. *** $P < 0,001$. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

6.1.10. A liposztatikus hatások kialakításáért a TRPV4 aktivációja felelős

Tekintettel arra, hogy a három azonosított TRPV molekula nem-szelektív, de főként Ca^{2+} -ra permeábilis kationcsatornaként funkcionál (Clapham, 2009), a következőkben megvizsgáltuk a CBD Ca^{2+} -homeosztázisra gyakorolt hatását a humán sebocitákon. Fluo-4 AM-alapú fluoreszcens Ca^{2+} -mérést végezve megállapítottuk, hogy a CBD jelentősen fokozta a sebociták intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációját (**17. ábra**).

Fontos megjegyezni, hogy ez a hatás egyaránt kivédhetőnek bizonyult (i) névlegesen Ca^{2+} -mentes médium; (ii) az általános TRP csatorna gátlószer ruténium vörös (RR); és (iii) a TRPV4-specifikus antagonistá HC067047 (HC) alkalmazásakor (**17/A-B ábra**), míg a TRPV1-gátlószer kapszazepin (CPZ) és AMG 9810 (ez utóbbi adatok nincsenek közölve) nem befolyásolta a Ca^{2+} -jel kialakulását (**17/C-D ábra**). Mindezen eredmények arra utaltak, hogy a CBD hatásainak közvetítéséért elsődlegesen a TRPV4 és nem a TRPV1 aktiválása lehet felelős.

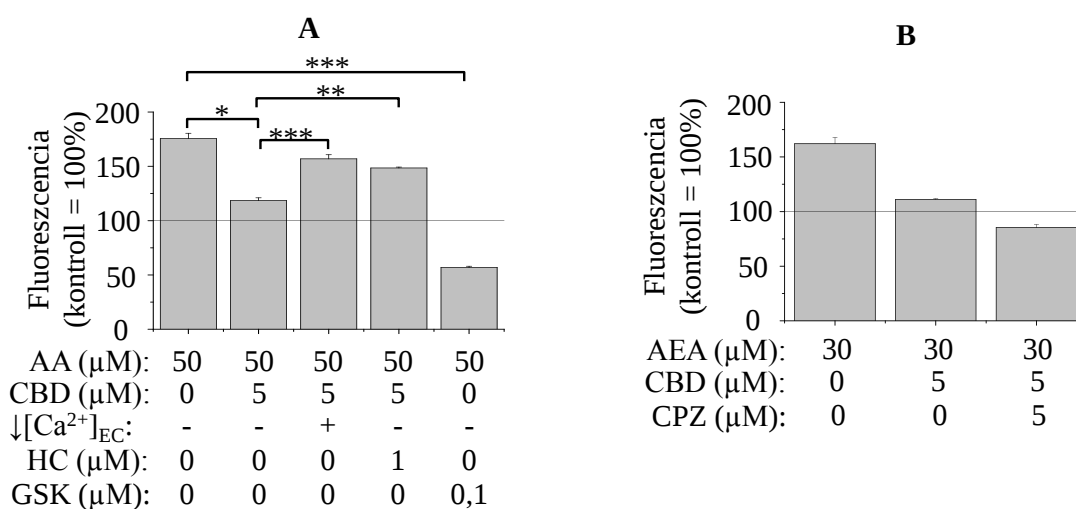


18. ábra A TRPV4 funkcionálisan aktív formában expresszálódik a humán sebocitákon

(A) A membránáramok időfüggése -90 és +90 mV-on mérve GSK és HC kezelést követően. (B) Reprezentatív áram-feszültség görbék (konvencionális patch-clamp technika, teljes sejtes elrendezés) az (A) paneleken jelzett időpontokban. (C) Fluoreszcens Ca^{2+} -mérések reprezentatív analóg görbéi. A kezelőanyagok megfelelő kombinációinak bemérésére a kísérlet 35. másodpercében (nyíllal jelölve) került sor; a görbéket a kezelést megelőző alapjellel korrigáltan ábrázoltuk. (D) Az előbbi görbék normalizált fluoreszcencia csúcsértékeit átlag±SEM (N=3) alakban, az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll csúcsérték átlagának százalékában ábrázoltuk. A pontozott vonal a GSK-val kiváltott maximális választ jelöli. ***P<0,001 a GSK-kezelt csoporthoz képest. Két további kísérlet hasonló eredményre vezetett (C-D).

A TRPV4 funkcionális aktivitásának további alátámasztására az ultrapotens agonista GSK1016790A (GSK) hatásait is megvizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy – hasonlóan a CBD

esetén tapasztaltakhoz – a GSK is jelentős ionáramokat indukált³³, melyek a TRPV4-specifikus antagonistá HC-vel kivédhetőnek bizonyultak (**18/A-B ábra**). A TRPV4 funkcionalitásának további elemzésére megismételtük a Ca^{2+} -homeosztázist vizsgáló kísérleteinket is. Megállapítottuk, hogy a GSK (ismét a CBD-hoz hasonlóan) jelentősen fokozta a szebociták intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációját, amely hatás névlegesen Ca^{2+} -mentes médium, RR és HC alkalmazásával egyaránt kivédhetőnek bizonyult (**18/C-D ábra**), újfent igazolva ezzel a TRPV4 funkcionális expresszióját a faggyúmirigysejteken.



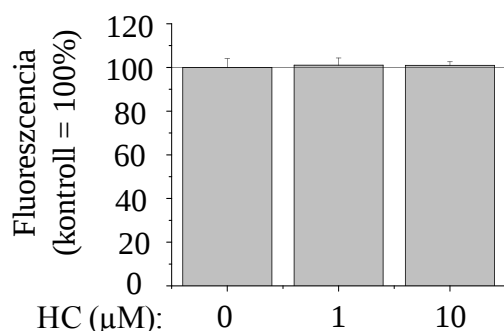
19. ábra A CBD liposztatikus hatása TRPV4-függő módon alakul ki

(A, B) Tenyészeinket 24 órán át kezeltük, majd Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrákon folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. *, **, *** $P < 0,05, 0,01, 0,001$. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

A CBD hatásainak elektrofiziológiai vizsgálata után az egyik kulcsfontosságú sejtélettani végpontot, a liposztatikus hatást vettük ismételtén górcső alá. Megállapítottuk, hogy (összhangban a patch-clamp és Ca^{2+} -mérések során nyert adatainkkal) a liposztatikus hatás egyaránt kivédhető volt az extracelluláris médium Ca^{2+} -koncentrációjának

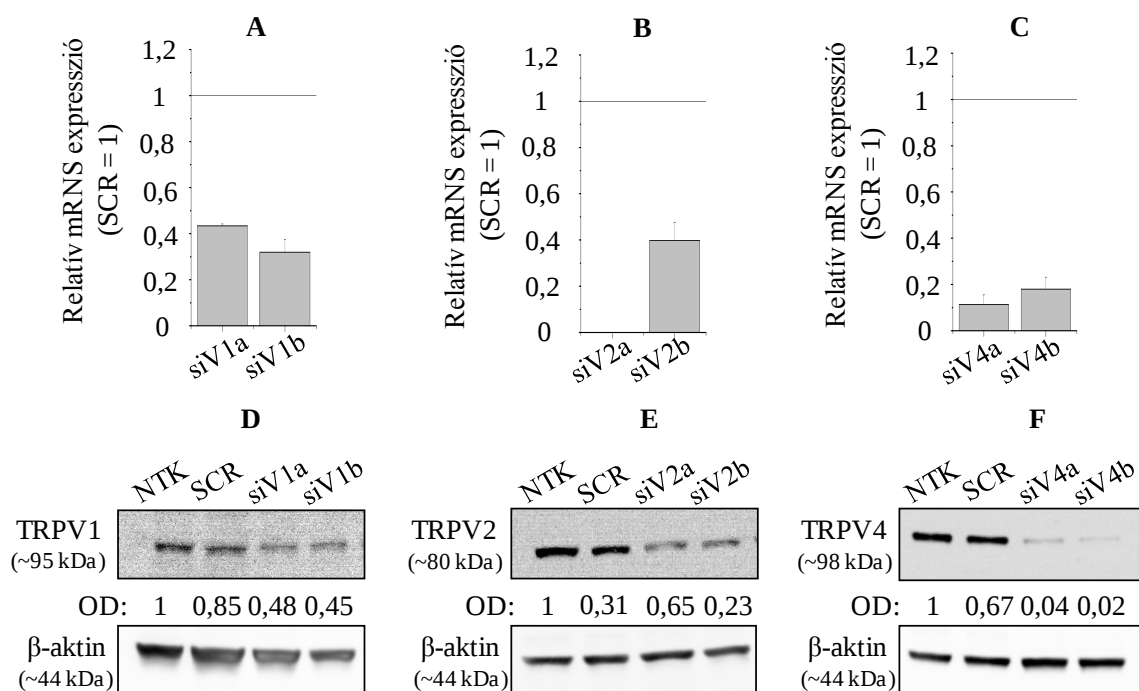
³³Tekintettel arra, hogy a CBD vizsgálata során végzett patch-clamp kísérleteink során nyert tapasztalataink (erősen negatív reverzálpotenciál a kontroll esetben) arra utaltak, hogy a szebociták jelentős K^+ és/vagy Cl^- csatorna expressziót mutathatnak, a célzottan a TRPV4 funkcionalitását vizsgáló kísérleteinkben módosítottunk az alkalmazott oldatok összetételén (a részleteket lásd az *Anyagok és módszerek* rész 5.17. alfejezetében). Erre azért volt szükség, hogy lehetőség szerint teljes mértékben kizárhassuk az esetleges zavaró kálium háttéráramokat, és minél tisztább formájában vizsgálhassuk a TRPV4 működését. Ilyen módon a kontroll sejtek **18/B ábrán** látható áramgörbéjének a **15/A ábrán** láthatóhoz képesti megváltozása (a sejtek már említett heterogenitásán túl) a módosított oldatösszetételnek köszönhető.

csökkentésével és a TRPV4-et gátló HC egyidejű alkalmazásával, míg TRPV1 gátlása nem befolyásolta azt (19/A-B ábra).



20. ábra A TRPV4-gátlása önmagában nem befolyásolja a faggyúlipidek termelését

Tenyészeteinket 48 órán át kezeltük, majd Nile Red jelölést végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrákon folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.



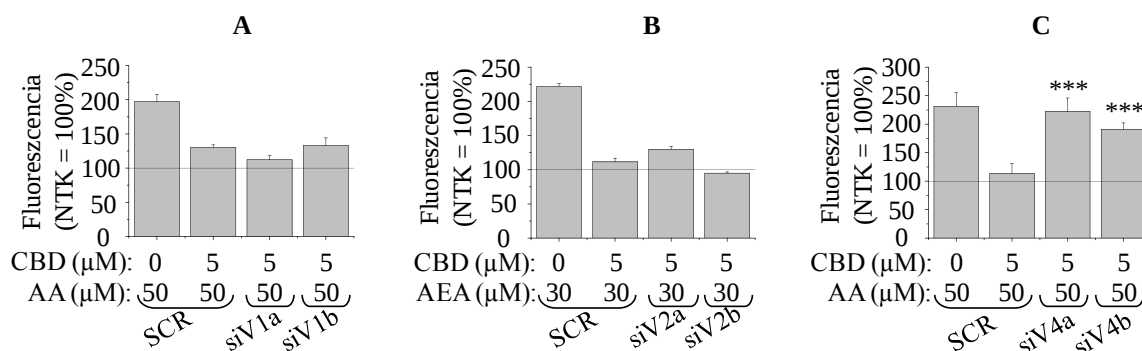
21. ábra A TRPV1, -2 és -4 szelektív géncsendesítésének visszaigazolása

A TRPV1 (A), TRPV2 (B) és TRPV4 (C) mRNA szintű expressziója a transzfekciót követő második napon (Q-PCR). Az adatokat a $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmazva előbb a *PPIA* vagy a *GAPDH* expressziós szintjére, majd a megfelelő non-sense RNS-sel transzfektált, az ábrákon folytonos vonallal jelölt (SCR: „scrambled” kontroll) tenyészetek értékeire normalizáltuk, és átlag±SD alakban ábrázoltuk. (D-F) A nem transzfektált kontroll (NTK), non-sense RNS-sel transzfektált, illetve TRPV1, -2 és -4 géncsendesített sejtek Western blot analízise a transzfekciót követő 3. napon. OD: az egyes TRPV-specifikus sávoknak előbb a mintafelviteli kontrollként alkalmazott β-aktin jelintenzitására, majd a megfelelő NTK-ra normalizált optikai denzitása. Az „siV1a”, „siV1b”, „siV2a”, siV2b”, „siV4a” és „siV4b” rövidítések rendre a TRPV1, TRPV2 és TRPV4 ellenes különböző konstrukciókat jelölik.

A TRPV4 szerepét tovább vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az ultrapotens TRPV4 agonista GSK (elektrofiziológiai vizsgálataink eredményeivel teljes összhangban) a CBD-hoz

hasonlóan képes volt csökkenteni az indukált lipidtermelést (**19/A ábra**), míg az önmagában alkalmazott antagonista nem volt hatással a bazális lipidszintézisre (**20. ábra**).

Bár ezen farmakológiai gátlók segítségével nyert adataink egyértelműen a TRPV4 aktivációjának a liposztatikus hatások közvetítésében betöltött funkcionális szerepe mellett szóltak, eredményeinket molekuláris biológiai módszerekkel is meg kívántuk erősíteni. Ennek megfelelően kísérleteink következő lépéseként elvégeztük az egyes TRPV csatornák szelektív, tranziens géncsendesítését RNS interferencia technika segítségével (**21. ábra**), amelynek révén a farmakológiai módszerekkel „elérhetetlen”³⁴ TRPV2 vizsgálatára is módunk nyílt.



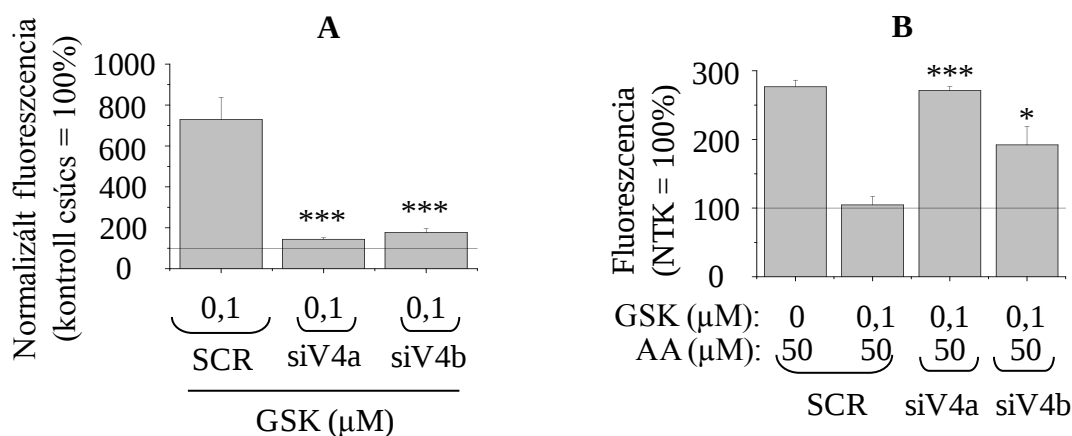
22. ábra *A TRPV1 és a TRPV2 szelektív géncsendesítése nem befolyásolja, míg a TRPV4-é kivédi a CBD liposztatikus hatását*

A neutrálislipid-szintézist a TRPV1 (A), TRPV2 (B), illetve a TRPV4 (C) szelektív géncsendesítését célzó transzfekciót követő harmadik napon kezdett, 24 órás kezeléseket követően vizsgáltuk Nile Red jelölés segítségével. Az eredményeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt NTK átlagának százalékában ábrázoltuk. *** $P < 0,001$ az azonos kezelést kapó SCR csoporthoz képest. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Megállapítottuk, hogy a TRPV1 vagy a TRPV2 kifejeződésének gátlása (**21/A-B és D-E ábra**) nem befolyásolta a CBD indukált lipidszintézist csökkentő hatását (**22/A-B ábra**); ugyanakkor a TRPV4-specifikus „knock down” (**21/C és F ábra**) teljes mértékben kivédte a liposztatikus hatást (**22/C ábra**). A TRPV4 szerepének végső igazolására kísérletünket GSK

³⁴A TRPV2 vonatkozásában sajnos nem áll rendelkezésre kellően specifikus, megbízható antagonista. Az irodalomban leginkább használatos tranilast (Stotz és Clapham, 2015) meglepő módon önmagában is Ca^{2+} -jelet okozott a szecocitákon (nem publikált megfigyelés), így esetünkben hasznavehetetlennek bizonyult.

alkalmazásával is elvégeztük. Amint az várható volt, a TRPV4 géncsendesítése kivédte mind a Ca^{2+} -jel, mind pedig a liposztatikus hatás kialakulását (**23. ábra**).



23. ábra A TRPV4 farmakológiai aktivációja a CBD-hoz hasonlóan liposztatikus hatású

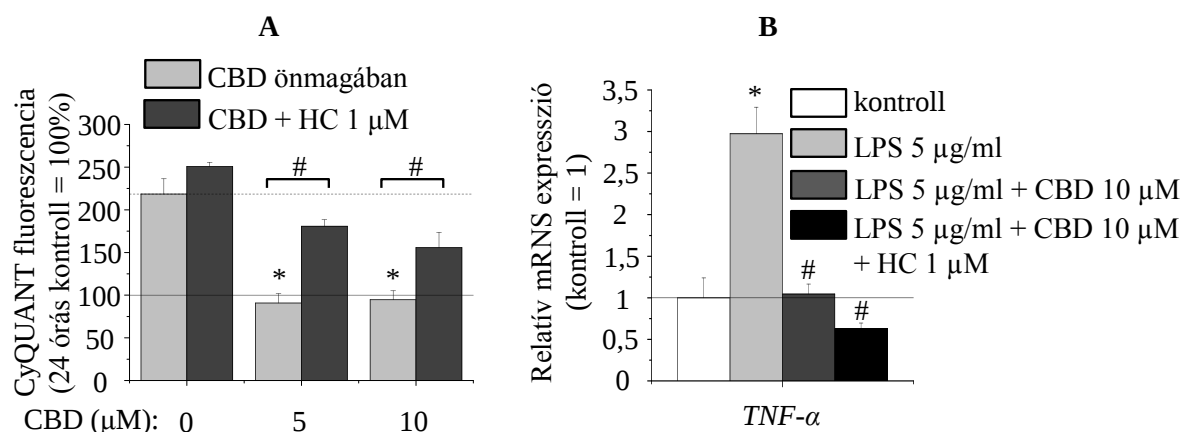
(A) Fluoreszcens Ca^{2+} -mérés a TRPV4 szelektív géncsendesítését célzó transzfekciót követő harmadik napon. A háttérrel korrigált fluoreszcencia értékeket a SCR kontroll átlagának százalékában, átlag $\pm$ SEM alakban (N=8) ábrázoltuk. *** $P < 0,001$ az azonos kezelést kapó SCR csoporthoz képest. (B) A neutrálislipid-szintézist a transzfekciót követő harmadik napon kezdett, 24 órás kezeléseket követően vizsgáltuk Nile Red jelölés segítségével. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt NTK átlagának százalékában ábrázoltuk. *,*** $P < 0,05$, illetve 0,001 az azonos kezelést kapó SCR csoporthoz képest. Egy (A), illetve két (B) további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Mindezen elektrofiziológiai, sejtélettani, farmakológiai és molekuláris biológiai módszerekkel nyert eredményeink meggyőzően igazolták, hogy (i) a TRPV4 funkcionálisan aktív formában fejeződik ki a szebocitákon; (ii) aktiválása jelentősen csökkenti az indukált lipidtermelést; és (iii) a CBD liposztatikus hatásainak hátterében a TRPV4 aktiválása áll.

6.1.11. A CBD anti-proliferatív hatása TRPV4-függő, míg a gyulladásgátló aktivitás

TRPV4-független úton alakul ki

A liposztatikus aktivitásért felelős elsődleges célmolekula azonosítása után arra is kíváncsiak voltunk, hogy a két további *anti-acne* modalitás (az anti-proliferatív és a gyulladásgátló hatás) hátterében is a TRPV4 aktivációja áll-e.



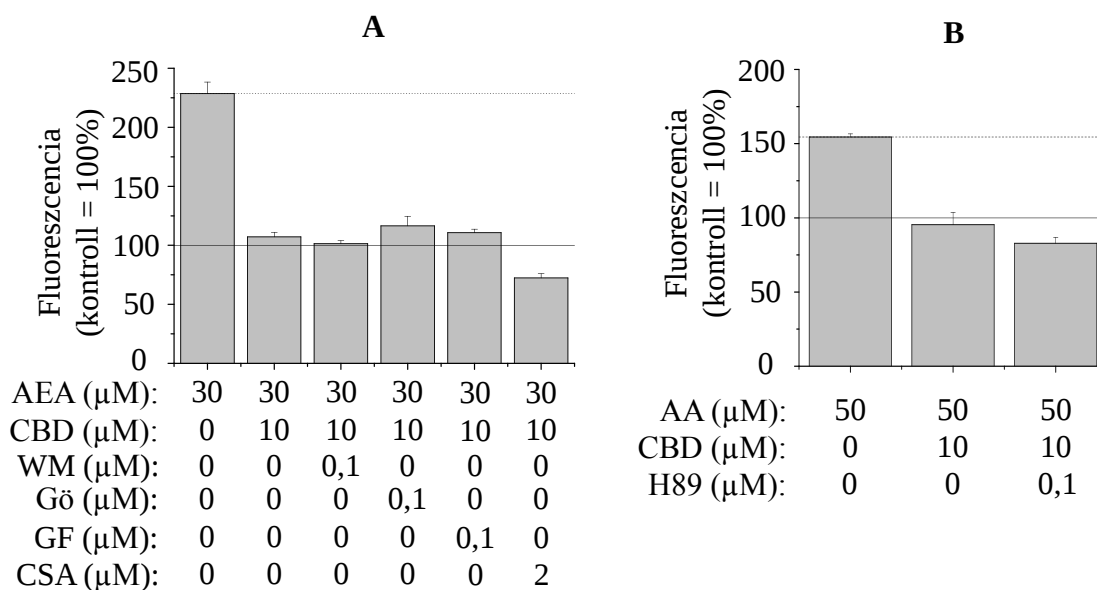
24. ábra A CBD anti-proliferatív aktivitása TRPV4-függő, míg a gyulladásgátló hatás TRPV4-független módon alakul ki

(A) Tenyészteteinket 72 órán keresztül kezeltük, majd CyQUANT proliferációs assay-t végeztünk. Az eredményeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt 24 órás kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. * $P < 0,05$ a 72 órás kontrollhoz képest; # $P < 0,05$. (B) A sejteket 24 órán át kezeltük az ábrán jelzettek szerint, majd Q-PCR vizsgálatot végeztünk. Belső kontrollként a *PPIA* expresszióját határoztuk meg, majd a relatív génexpressziók megállapítását követően az eredményeket a $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmazva az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll expressziós szintjére normalizáltuk, és átlag±SD (N=3) alakban ábrázoltuk. * $P < 0,05$ a kontrollhoz képest; # $P < 0,05$ a kizárólag LPS-sel kezelt csoporthoz képest. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Ennek eldöntésére a TRPV4 antagonistá HC jelenlétében is megismételtük korábbi kísérleteinket. Megállapítottuk, hogy a TRPV4 gátlása jelentősen csökkentette a CBD anti-proliferatív hatását (24/A ábra), de nem gátolta a gyulladásgátló aktivitást (24/B ábra), ami arra utalt, hogy ez utóbbi a TRPV4-től független jelátviteli útvonal aktiválása révén alakul ki.

6.1.12. A CBD-kezelt szebociták microarray analízise számos lehetséges célgén szerepére világított rá

A következőkben arra tettünk kísérletet, hogy azonosítsuk az *anti-acne* jelpálya további szereplőit. Miután kizártuk számos fontos intracelluláris szabályozómolekula (PKC izoformák, PI3K, PKA, kalcineurin) részvételét a lipidszintézist csökkentő hatás kialakításában (25. ábra), kísérleteinket teljes genom microarray vizsgálatokkal folytattuk. Ennek során három független kontroll és CBD-kezelt (10 μM, 24 óra) mintapár összehasonlító elemzésére került sor.



25. ábra A CBD liposztatikus hatása PKC, PKA, PI3K és kalcineurin (PP2B) független módon alakul ki

A szebociták neutrálislipid-szintézisét 24 órás kezeléseket követően vizsgáltuk; lipogén ágensként AEA-ot (**A**), illetve AA-at (**B**) alkalmaztunk. Az eredményeket az ábrán folytonos vonallal jelzett kontroll átlagának százalékában, átlag±SEM (N=4) alakban fejeztük ki. A pontozott vonal az önállóan alkalmazott lipogén ágensekkel kiváltott maximális válasz szintjét jelöli. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. **WM**: wortmannin (PI3K inhibitor); **G6**: Gö6979 (a klasszikus PKC izoformák inhibitora); **GF**: GF109203X (általános PKC-inhibitor); **CSA**: ciklosporin A (kalcineurin inhibitor); **H89**: PKA inhibitor.

A nyers adatok feldolgozása (GSEA, valamint BiNGO analízis) egyértelműen megerősítette a CBD komplex *anti-acne* hatásait bemutató eredményeinket³⁵. A GSEA során számos sejtciklushoz („mitózis”, „G₂/M átmenet” stb.), gyulladásához („citokin termelés”, „TLR9-útvonal” stb.) és lipidszintézishez kapcsolt („aciltranszferáz aktivitás”, „lipid bioszintetikus folyamatok”, „a MAPK-aktivitás pozitív szabályozása” stb.), illetve „acne-releváns” („IGF-1 útvonal”, „mTOR-útvonal”) géncsoport került azonosításra a csökkenő kifejeződést mutató gének vizsgálatakor. A „Ca²⁺-jelátvitel” géncsoport megjelenése a növekvő expressziót mutató gének között a TRPV4 korábban feltárt szerepét erősítette meg. A fentiekkel összhangban a növekvő expressziót mutató gének között „feldúsuló” BiNGO kifejezések („a zsírsajt differenciáció negatív regulációja”, „a zsírsav bioszintetikus

³⁵ Terjedelmi okokból jelen értekezés keretében nincs mód a GSEA és BiNGO elemzések részletes eredményeinek bemutatására; ezek a disszertáció alapját képező publikáció *on-line* kiegészítő adatai között a *The Journal of Clinical Investigation* honlapján (<http://www.jci.org/articles/view/64628#sd>) szabadon hozzáférhetőek.

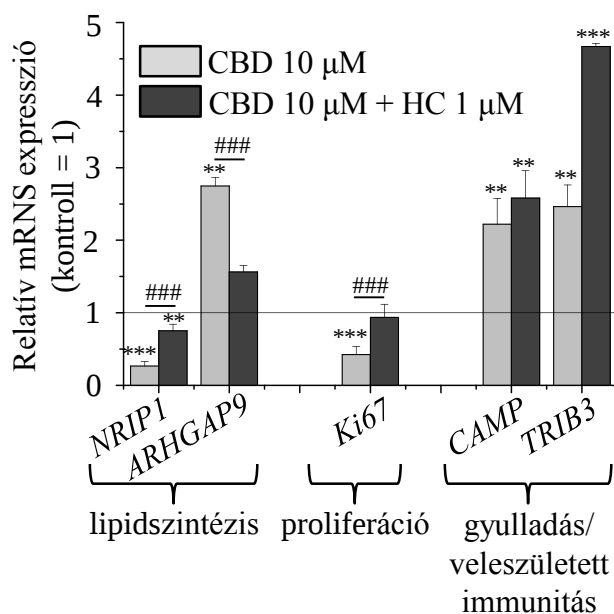
folyamatok negatív regulációja” stb.) a CBD szebocita differenciálódást gátló hatását támasztotta alá.

6. táblázat A CBD-kezelés (10 μ M, 24 óra) hatására szignifikánsan (minimum kétszeres, azonos irányú változás mindhárom kísérlet során; globális, korrigált $P < 0,05$) változó, potenciálisan „acne-” vagy „CBD-releváns” gének listája (a Q-PCR megerősítésre kiválasztott kulcsgének **bordó betűszínnel vannak kiemelve**)

A gén megnevezése	Átlagos expresszióváltozás (kontroll = 1)	Megjegyzés
<i>Homo sapiens</i> solute carrier family 39, member 10 (SLC39A10)	0,179378308	BV-2 mikrogliá sejteken hasonló hatást mutattak ki, a Zn^{2+} -effluxban van szerepe (Juknat és mtsai., 2012).
<i>Homo sapiens</i> disheveled associated activator of morphogenesis 1 (DAAM1)	0,288870651	Feltételezhetően vázfehérjeként szerepet játszik a Dvl-Rho komplex WNT-indukált kialakulásában (forrás: NCBI).
<i>Homo sapiens</i> netrin 4 (NTN4)	0,297136326	Pro-proliferatív hatású (Hu és mtsai., 2012).
<i>Homo sapiens</i> STEAP family member 4 (STEAP4)	0,303239595	Szerepet játszik a zsírsejtek differenciálódásában (forrás: NCBI).
<i>Homo sapiens</i> forkhead box A1 (FOXA1)	0,304794447	Mezenchimális differenciálódási marker (Varley és mtsai., 2009).
<i>Homo sapiens</i> nuclear receptor interacting protein 1 (NRIP1; RIP140-ként is ismert)	0,309212846	A zsírsejtek triglicerid-tárolásának kiemelkedően fontos pozitív regulátora (Leonardsson és mtsai., 2004).
<i>Homo sapiens</i> Toll-like receptor 1 (TLR1)	0,312672783	A veleszületett immunitásban fontos molekula (forrás: NCBI).
<i>Homo sapiens</i> mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP4K3)	0,325163457	Szerepet játszik a „pro-acne” hatásúnak tartott (Schriever és mtsai., 2013) mTORC1 útvonal aktiválásában (Melnik és Schmitz, 2013).
<i>Homo sapiens</i> Kruppel-like factor 5 (intestinal) (KLF5)	0,360155512	Pro-proliferatív az epiteliális sejtekben (Yang és mtsai., 2012).
<i>Homo sapiens</i> secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1)	0,392834472	A szebocita irányú differenciálódást gátló (Guha és mtsai., 2004) WNT-jelátvitel gátlója (Rattner és mtsai., 1997).
<i>Homo sapiens</i> antigen identified by monoclonal antibody Ki67	0,474182345	Proliferációs marker (forrás: NCBI).
<i>Homo sapiens</i> activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67) (ATF4), transcript variant 1	2,138734073	A TRIB3-jelátvitel „down-stream” molekula (Juknat és mtsai., 2013).
<i>Homo sapiens</i> MYB binding protein (P160) 1a (MYBBP1A)	2,285565522	Az NF- κ B represszora (Owen és mtsai., 2007).
<i>Homo sapiens</i> TIGA1 (TIGA1)	2,332263761	A G ₀ fázis fenntartásával gátolja a proliferációt (Yabuta és mtsai., 2006).
<i>Homo sapiens</i> ChaC, cation transport regulator-like 1 (<i>E. coli</i>) (CHAC1)	2,449755082	Az ATF4 „down-stream” célpontja (Mungrue és mtsai., 2009).
<i>Homo sapiens</i> cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP)	3,005000572	Kulcsfontosságú antimikrobiális peptid (Lee és mtsai., 2008).
<i>Homo sapiens</i> Rho GTPase activating protein 9 (ARHGAP9)	3,051559194	Gátolja az ERK2-t (Ang és mtsai., 2007).
<i>Homo sapiens</i> asparagine synthetase (ASNS), transcript variant 2	3,286716977	A TRIB3-ATF4 tengely „down-stream” célpontja (Juknat és mtsai., 2013).
<i>Homo sapiens</i> tribbles homolog 3 (<i>Drosophila</i>) (TRIB3; „SINK”-ként is ismert)	3,393634165	Az NF-κB negatív regulátora (Wu és mtsai., 2003), gátolja a zsírsejt-differenciációt (Takahashi és mtsai., 2008).
<i>Homo sapiens</i> growth differentiation factor 15 (GDF15)	3,593744623	A GDF15-öt overexpresszáló egerek soványak, és csökkent gyulladásos választ mutatnak (Kim és mtsai., 2013).
<i>Homo sapiens</i> DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT3)	6,59893248	A TRIB3-ATF4 tengely „down-stream” célpontja (Juknat és mtsai., 2013).

Természetesen a részletekbe menő analízis a szignifikánsan (minimum kétszeres, azonos irányú változás minden esetben; globális, korrigált $P < 0,05$) változó gének listájának elkészítésére is kiterjedt. Ennek során mindösszesen 80 csökkenő, és 72 növekvő expressziót mutató gén került azonosításra, melyek közül a legfontosabb, irodalmi adatok alapján „acne-” vagy „CBD-releváns” gének listáját a **6. táblázat** tartalmazza³⁶.

Bár ez a génlista, korábbi eredményeinkkel összhangban, ismét csak a CBD komplex *anti-acne* hatásaira világított rá, természetesen a legígéretesebb célgének expresszió változásait Q-PCR-al is megerősítettük (**26. ábra**).



26. ábra A lipidszintézishez és proliferációhoz kötődő kulcsgének TRPV4-függő, míg az „immungének” TRPV4-független módon regulálódnak CBD-kezelés hatására

A Q-PCR vizsgálat során 24 órán át kezeltük a sejteket az ábrán jelzett módokon. Belső kontrollként a *PPIA* expresszióját határoztuk meg, majd a relatív génexpressziók megállapításához az eredményeket a $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmazva előbb a *PPIA*, majd az ábrán folytonos vonallal jelzett kontroll expressziós szintjére normalizáltuk, és átlag $\pm$ SD (N=3-6) alakban ábrázoltuk. Két további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

inhibitora [Ang és mtsai., 2007]) expressziója fokozódik CBD-kezelés hatására.

Megállapítottuk, hogy CBD-kezelés hatására valóban down-regulálódik a „nuclear receptor interacting protein 1” (*NRIP1*; zsírsejtekben a triglicerid felhalmozódás fontos pozitív regulátora [Leonardsson és mtsai., 2004]), valamint a proliferációs marker *Ki67* (NCBI). Azt is igazoltuk, hogy a „Rho GTPase activating protein 9” (*ARHGAP9*; a

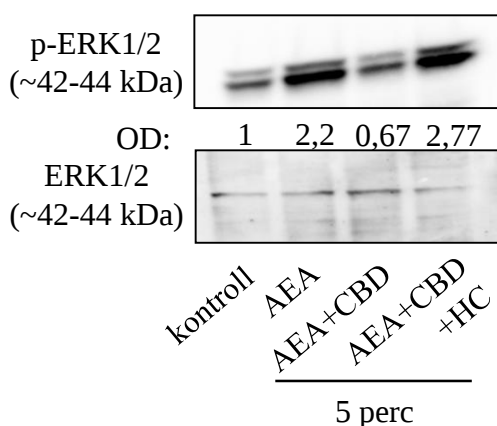
korábbi eredményeink [Dobrosi és mtsai., 2008] alapján pro-lipogén hatású ERK-útvonal endogén

³⁶ Valamennyi microarray adat szabadon hozzáférhető **GSE57571**-es referenciaszámmal a *Gene Expression Omnibus* publikus adatbázisban; a mindhárom esetben konkordánsan és szignifikánsan változó gének teljes listája a disszertáció alapját képező publikáció on-line kiegészítő adatai között a *The Journal of Clinical Investigation* honlapján érhető el (<http://www.jci.org/articles/view/64628#sd>).

Megvizsgáltuk azt is, hogy ezen génexpressziós változások vajon TRPV4-függően alakulnak-e ki. A TRPV4-antagonista jelenlétében elvégzett kísérleteink azt mutatták, hogy a lipidszintézis szabályozásában fontos (*NRIP1*, *ARHGAP9*) és a proliferációs állapothoz kötődő (*Ki67*) gének az eddig találtakkal teljes összhangban TRPV4-függő módon regulálódtak, újra megerősítve ezek TRPV4-mediált szabályozódására vonatkozó korábbi eredményeinket (**26. ábra**).

6.1.13. A liposztatikus hatás hátterében az *NRIP1* TRPV4-függő down-regulációja és az *ERK1/2* MAPK kaszkád szintén TRPV4-függő gátlása áll

Természetesen kíváncsiak voltunk arra is, hogy az előbbieken azonosított potenciális célgének expresszióváltozásai csak „tünetei” vagy valóban közvetítői is a különféle *anti-acne* modalitásoknak, így kísérleteink következő lépéseként ezek szisztematikus vizsgálatát végeztük el.

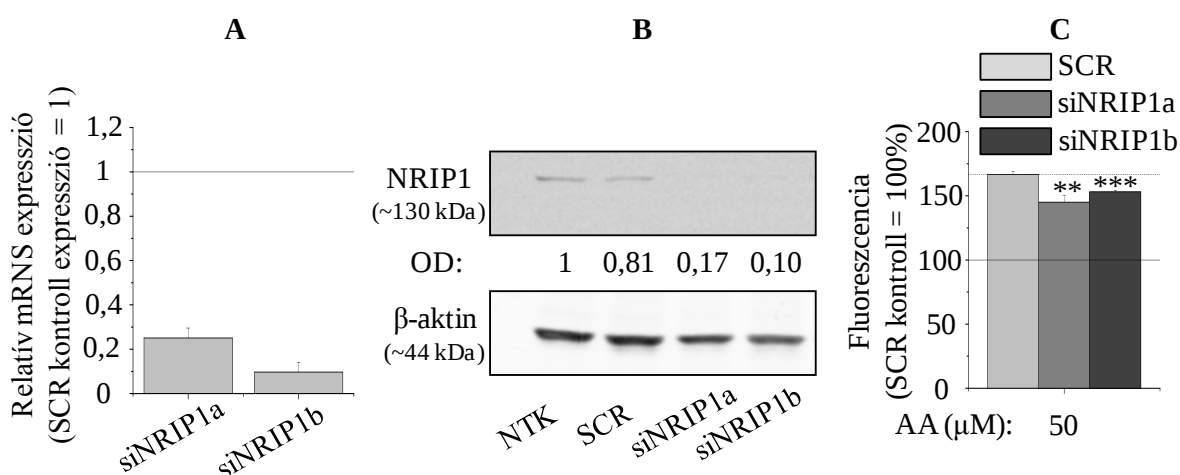


27. ábra A CBD TRPV4-függő módon gátolja a lipogén ERK1/2 AEA-indukált foszforilációját

Az ábrán az jelzett módon kezelt sebocita tenyészetek Western blot analízise. OD: az egyes p-ERK1/2-specifikus sávoknak előbb az ERK1/2 jelintenzitására, majd a kontrollra normalizált optikai denzitása. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Ismert, hogy az ERK1/2 MAPK útvonal fontos szabályozója a sejtproliferációnak (Roskoski, 2012), és korábbi eredményeink szerint a sebociták esetében ráadásul az AEA lipidszintézist fokozó hatásainak kialakításában is kulcsszerepet játszik (Dobrosi és mtsai., 2008). Tekintettel arra, hogy a CBD ezekkel éppen ellentétes (azaz liposztatikus és anti-proliferatív hatást váltott ki; **7., 8., 9., 10. és 12. ábra**), és up-regulálta az útvonal egyik endogén inhibitorát, az *ARHGAP9*-et (**6. táblázat; 26. ábra**), következő lépésként megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolja az AEA-indukált ERK1/2-aktivációt.

A foszforilált ERK1/2 mennyiségét Western blottal vizsgálva megállapítottuk, hogy a CBD kivédte az AEA által kiváltott MAPK aktivációt; ráadásul előző eredményeinkkel teljes összhangban azt is kimutattuk, hogy ez a hatás TRPV4-függő módon jött létre, hiszen a TRPV4-antagonista HC jelenlétében nem alakult ki (27. ábra). Mindezen eredményeink arra utaltak, hogy a pro-lipogén ERK1/2 MAPK útvonal (véltetőleg ARHGAP9-mediált), TRPV4-függő gátlása fontos szerepet játszhat a CBD liposztatikus hatásának kialakításában.



28. ábra Az NRIP1 szelektív géncsökkentése a CBD-hoz hasonlóan liposztatikus hatású

(A) Az NRIP1 mRNA szintű expressziója a transzfekciót követő második napon. Az adatokat a $\Delta\Delta$ CT módszert alkalmazva előbb a PPIA expressziós szintjére, majd a non-sense RNS-sel transzfektált, az ábrákon folytonos vonallal jelölt (SCR: „scrambled” kontroll) tenyészet értékeire normalizáltuk, és átlag $\pm$ SD (N=3) alakban ábrázoltuk. Az „siNRIP1a” és „siNRIP1b” az NRIP1 ellenes különböző konstrukciókat jelölik. (B) A nem transzfektált kontroll (NTK), non-sense RNS-sel transzfektált, illetve NRIP1 géncsökkentett sejtek Western blot analízise a transzfekciót követő 3. napon. OD: az NRIP1-specifikus sávoknak előbb a mintafelviteli kontrollként alkalmazott β -aktin jelintenzitására, majd a NTK-ra normalizált optikai denzitása. Az „siNRIP1a” és „siNRIP1b” rövidítések az NRIP1 ellenes különböző konstrukciókat jelölik. (C) A neutrálislipid-szintézist az NRIP1 szelektív géncsökkentését célzó transzfekciót követő harmadik napon kezdett, 24 órás kezeléseket követően vizsgáltuk Nile Red jelölés segítségével. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt SCR átlagának százalékában ábrázoltuk. **, *** P <0,01, 0,001 az azonos kezelést kapó SCR csoporthoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

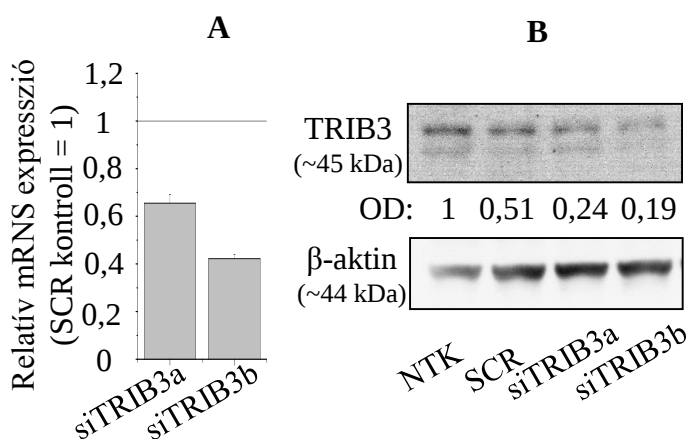
Előzőekben már részletezett microarray adataink a MAPK-kaszkáddal történő interferencia mellett, az NRIP1 down-regulációját is azonosították, mint potenciálisan liposztatikus hatásokat közvetítő folyamatot. Az NRIP1 funkcionális vizsgálatára végrehajtottuk a molekula szelektív géncsökkentését (28/A-B ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a non-sense RNS-sel transzfektált, „scrambled” kontroll sejtekhez képest az NRIP1-géncsökkentettek szignifikánsan kisebb lipogén választ adtak az AA-kezelés során, azaz az

NRIP1 indukált down-regulálása valóban utánozta a CBD lipogén ágensek által indukált lipidszintézist csökkentő hatását (28/C ábra).

6.1.14. A CBD gyulladásgátló hatása a P65-NF- κ B útvonal „tribbles homolog 3” (TRIB3) általi gátlásának köszönhető

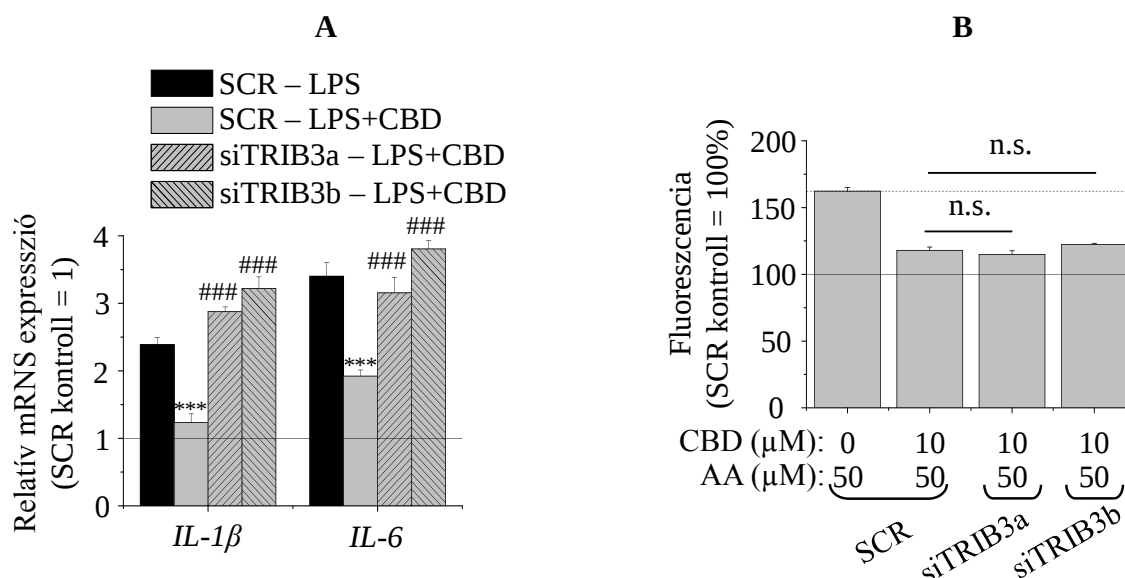
A szebosztatikus aktivitás hátterében álló sejtelettani folyamatok részletes tanulmányozását követően a gyulladásgátló hatás mélyreható vizsgálatára került sor. A már említett microarray eredmények alapos elemzése során a korábban részletezettek szerint (6. táblázat) sikerült több immunológiai funkcióval bíró gént is azonosítanunk. Q-PCR segítségével megerősítettük, hogy az LL-37 katelicidin (CAMP; központi jelentőségű, a szebocitákban ismerten kifejeződő AMP [Lee és mtsai., 2008]) és a „tribbles homolog 3” (TRIB3; ez a „SINK” néven is ismert fehérje a pro-inflammatorikus P65-NF- κ B útvonal gátlása révén jelentős gyulladásgátló aktivitással rendelkezik [Wu és mtsai., 2003]) valóban up-regulálódnak CBD-kezelés hatására (26. ábra). Ráadásul eddigi eredményeinkkel teljes összhangban (24/B ábra) azt is kimutattuk, hogy ezek a változások TRPV4-független módon alakulnak ki (26. ábra).

29. ábra A TRIB3 szelektív „géncsendesítése” sikeres volt



(A) A TRIB3 mRNS szintű expressziója a transzfekciót követő második napon. Az adatokat a $\Delta\Delta$ CT módszert alkalmazva előbb a PPIA expressziós szintjére, majd a non-sense RNS-sel transzfektált, az ábrákon folytonos vonallal jelölt (SCR: „scrambled” kontroll) tenyészet értékeire normalizáltuk, és átlag $\pm$ SD (N=3) alakban ábrázoltuk. Az „siTRIB3a” és „siTRIB3b” a TRIB3 ellenes különböző konstrukciókat jelölik. (B) A nem transzfektált kontroll (NTK), non-sense RNS-sel transzfektált (SCR), illetve TRIB3 géncsendesített sejtek Western blot analízise a transzfekciót követő 3. napon. OD: a TRIB3-specifikus sávoknak előbb a mintafelviteli kontrollként alkalmazott β -aktin jelintenzitására, majd a NTK-ra normalizált optikai denzitása.

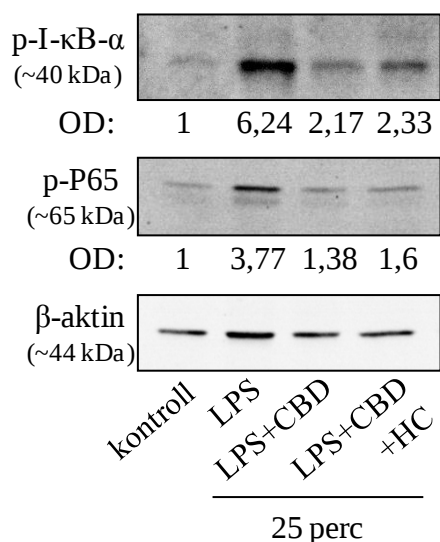
A következőkben a TRIB3 lehetséges funkcionális szerepét vizsgálva elvégeztük a molekula szelektív géncsendesítését (**29. ábra**), majd megismételtük a gyulladásgátló hatást vizsgáló kísérleteinket.



30. ábra A TRIB3 szelektív géncsendesítése kivédi a CBD gyulladásgátló hatását, de nem befolyásolja a liposztatikus aktivitást

(A) *IL-1β* és *IL-6* mRNA expresszió 5 μg/ml LPS kezelést követően CBD (10 μM) jelenlétében vagy hiányában. A 24 órás kezeléseket a transzfekciót követő 2. napon kezdtük. *** $P < 0,001$ a megfelelő CBD-mentes kezeléshez képest. ### $P < 0,001$ az azonos kezelést kapó non-sense RNS-sel transzfektált (SCR) csoporthoz képest. Az adatokat a $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmazva előbb a *PPIA* expressziós szintjére, majd az ábrán folytonos vonallal jelölt SCR kontroll tényező értékeire normalizáltuk, és átlag $\pm$ SD (N=3) alakban ábrázoltuk. Az „siTRIB3a” és „siTRIB3b” a különböző TRIB3 ellenes konstruktokat jelölik. (B) A neutrálislipid-szintézist a TRIB3 szelektív géncsendesítését célzó transzfekciót követő harmadik napon kezdett 24 órás kezeléseket követően vizsgáltuk Nile Red jelölés segítségével. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM alakban (N=4), az ábrán folytonos vonallal jelölt SCR átlagának százalékában ábrázoltuk. n.s.: nem szignifikáns különbség. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Megállapítottuk, hogy a CBD az eddigi eredményekkel összhangban ismét csak hatékonyan csökkentette az LPS által indukált pro-inflammatorikus citokin termelést a „non-sense” RNS-sel transzfektált „scrambled” kontroll (SCR) sejtek esetén. Ez a hatás teljes mértékben hiányzott a TRIB3-géncsendesített sejtek esetén (**30/A ábra**), ami a TRIB3 központi jelentőségére utal a CBD gyulladásgátló hatásának kialakításában. Érdekes módon, bár egyes irodalmi adatok (Takahashi és mtsai., 2008) ismeretében felmerült a lehetősége, eredményeink szerint a TRIB3 kifejeződés csökkentése nem befolyásolta a CBD liposztatikus hatását (**30/B ábra**).



31. ábra A CBD TRPV4-független módon gátolja a P65-NF-κB útvonal LPS-indukálta aktivációját

A Western blot analízis során az ábrán látható módokon kezelt szebocita tenyészeteket vizsgáltunk. OD: a p-I-κB-α és a p-P65 specifikus sávoknak előbb a mintafelviteli kontrollként alkalmazott β-aktin jelintenzitására, majd a kontrollra normalizált optikai denzitása. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Tekintettel arra, hogy a fentebb már részletezettek szerint a TRIB3 elsődlegesen a pro-inflammatorikus P65-NF-κB gátlása révén fejti ki jótékony, gyulladásgátló hatását; valamint irodalmi adatok alapján a CBD valóban képes az NF-κB-útvonal gátlására (Kozela és mtsai., 2010), a TRIB3 jelentőségének felismerését követően kísérleteink következő logikus lépéseként azt vizsgáltuk meg, hogy a CBD-kezelés miként befolyásolja az LPS-indukálta NF-κB-aktivációt.

Azt tapasztaltuk, hogy az LPS jelentős mértékben fokozta mind az I-κB-α, mind a P65-NF-κB izoforma foszforilációját³⁷. Megállapítottuk, hogy a korábban már említett irodalmi adatokkal (Wu és mtsai., 2003),

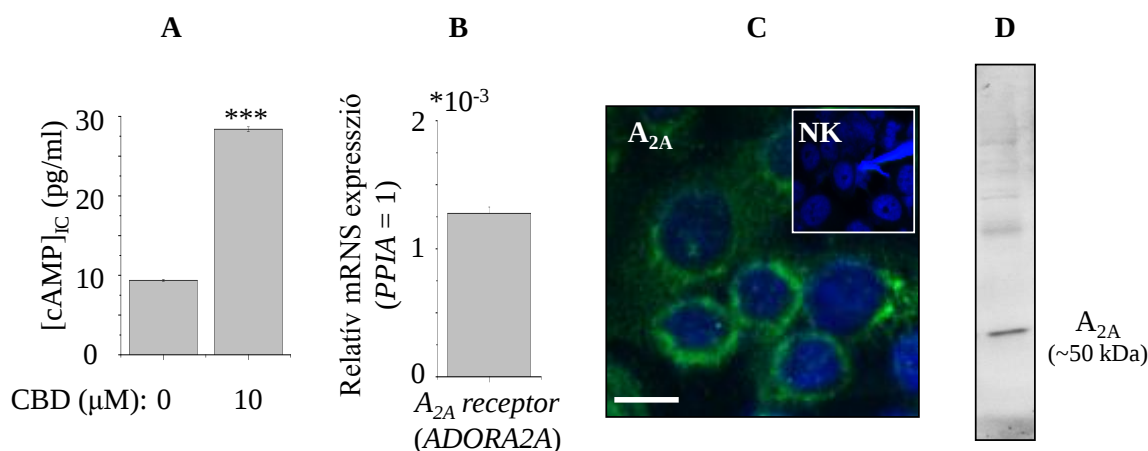
valamint a TRIB3 géncsendesítése kapcsán nyert eredményeinkkel (**30. ábra**) összhangban a CBD valóban képes volt TRPV4-független módon kivédeni az LPS NF-κB útvonalat aktiváló hatását (**31. ábra**).

6.1.15. A gyulladásgátló hatás kialakulásának hátterében a P65-NF-κB útvonal A_{2A} adenosin receptor →cAMP →TRIB3↑ általi gátlása áll

Miután eddigi kísérleteink során sikerrel azonosítottuk a CBD gyulladásgátló hatásának effektorát (vagyis a P65-NF-κB izoforma aktiválódásának vélhetőleg TRIB3-mediált gátlását), a CBD hatásait vizsgáló kísérleteink zárásaként arra voltunk kíváncsiak, hogy

³⁷ A defoszforilált I-κB-α az NF-κB-t inaktívan tartó gátló hatású molekula. Gyulladásos szignálok, pl. TLR-aktiváció esetén az I-κB-α foszforilálódik, aminek következtében megszűnik az NF-κB-alegységekre gyakorolt gátló hatása. Következő lépésben a szabaddá váló NF-κB-izoomerek (esetünkben a P65) foszforiláció útján aktiválódnak, majd a sejtmagba transzlokálódva indítják el a gyulladásos válasz kialakulását (Beinke és Ley, 2004). Ilyen módon az I-κB-α és az NF-κB izoomerek foszforilációja érzékeny jelzői a rendszer aktivitásának.

milyen jelátviteli folyamatok vezethetnek a gyulladásgátló hatás kialakulásában központi jelentőségűnek bizonyult TRIB3 up-regulációjához/aktivációjához.

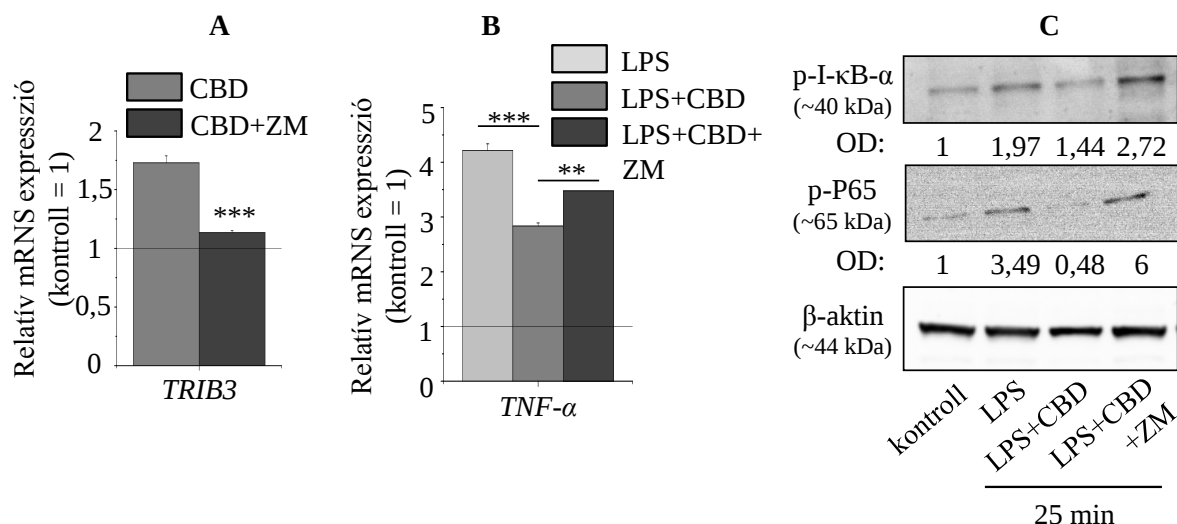


32. ábra Az adenosin A_{2A} receptor funkcionálisan aktív formában fejeződik ki a humán szebocitákon

(A) Az intracelluláris cAMP koncentráció ([cAMP]_{iC}) meghatározására egy órás kezeléseket követően a sejtek lizátumából került sor. Az adatokat standard görbe segítségével kvantifikálva átlag $\pm$ SEM alakban (N=3) ábrázoltuk. *** $P < 0,001$. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. (B) A Q-PCR vizsgálatot 60%-os konfluenciájú tenyészetekből kiindulva végeztük. Belső kontrollként a *PPIA* expresszióját határoztuk meg, majd a relatív génexpresszió megállapításához az eredményeket a Δ CT módszert alkalmazva a *PPIA* expressziós szintjére normalizáltuk, és átlag $\pm$ SD (N=3) alakban ábrázoltuk. (C) Az IF jelölés során ~60%-os konfluenciájú tenyészeteket vizsgáltunk. Zöld: A_{2A}-specifikus immunjelölődés; kék: DAPI magfestés. Negatív kontrollként (NK) az elsődleges antitest elhagyásával készült jelölést használtunk. Méretvonal: 10 μ m. (D) A Western blot vizsgálat során ~60%-os konfluenciájú tenyészetekből kiindulva az *Anyagok és módszerek* részben ismertetett módon jártunk el.

Mivel irodalmi adatok alapján a TRIB3 up-regulációját/aktivációját a cAMP koncentráció növekedése is kiválthatja (Zou és mtsai., 2011), ezért elsőként azt vizsgáltuk meg, hogy a CBD-kezelés miként befolyásolja az intracelluláris cAMP koncentrációt a szebocitákban. ELISA technika segítségével megállapítottuk, hogy a CBD jelentősen fokozta a sejtek cAMP tartalmát (32/A ábra), ami arra utalt, hogy (i) a TRIB3 aktivációjának háttérében valóban állhatott az irodalmi adatok alapján várható cAMP-szint-fokozódás; és (ii) a CBD gyulladásgátló hatásért felelős elsődleges (receptorális) célpont egy G_s-fehérjéhez kapcsolt 7-TM receptor lehet. Az irodalmi adatok ismételt áttekintése során a CBD számos lehetséges célmolekulája között egy olyat találtunk (az adenosin A_{2A} receptort), amely G_s-fehérjéhez kapcsolt (Ijzerman és mtsai., 2013). Ráadásul más rendszerekben már leírták róla, hogy közvetítheti a CBD gyulladásgátló hatását (Ribeiro és mtsai., 2012). Ezek az

eredmények az A_{2A} receptort rendkívül valószínű elsődleges célponttá tették, ezért megvizsgáltuk, hogy kifejeződik-e a humán szebocitákon is. Q-PCR, Western blot és IF jelölés segítségével megállapítottuk, hogy a faggyúmirigysejtek mind mRNS, mind fehérje szinten expresszálják az A_{2A} receptort (32/B-D ábra).



33. ábra A CBD gyulladásgátló hatása az A_{2A} receptor aktiválása révén valósul meg

(A-B) A *TRIB3* és a *TNF-α* mRNS expresszióját az ábrán látható 24 órás kezeléseket követően vizsgáltuk meg (Q-PCR; CBD: 10 μM; LPS: 5 μg/ml; ZM: 10 nM). Az adatokat a $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmazva előbb a *PPIA* expressziós szintjére, majd az ábrákon folytonos vonallal jelölt kontroll tenyészet értékeire normalizáltuk, és átlag±SD (N=3) alakban ábráztuk. **, *** $P < 0,01$, $0,001$. (C) A Western blot analízis során az ábrán látható módokon kezelt szebocita tenyészeteket vizsgáltunk (CBD: 10 μM; LPS: 5 μg/ml; ZM: 100 nM). OD: a p-I-κB-α és a p-P65 specifikus sávoknak előbb a mintafelviteli kontrollként alkalmazott β-aktin jelintenzitására, majd a kontrollra normalizált optikai denzitása. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

Annak eldöntésére, hogy az előzőekben bemutatott, vélhetőleg *TRIB3*-mediált P65-NF-κB gátlás által megvalósuló gyulladásgátló hatások valóban lehetnek-e az A_{2A} receptor aktivációjának következményei, kísérleteinket az A_{2A} receptor specifikus antagonistája, a ZM241385 (ZM; Poucher és mtsai., 1995) jelenlétében is megismételtük. Megállapítottuk, hogy az A_{2A} receptor specifikus gátlása (i) képes volt kivédeni a CBD *TRIB3* expressziót fokozó hatását (33/A ábra); (ii) a gyulladásgátló hatást (33/B ábra); és (iii) a P65-NF-κB útvonallal való interferenciát is (33/C ábra).

Mindezek alapján úgy tűnik, hogy humán szebocitákon a CBD gyulladásgátló hatásáért a P65-NF-κB útvonal A_{2A} receptor → cAMP↑ → *TRIB3*↑ jelátviteli „tengely” általi gátlása felelős.

6.2. *A FAAH inhibíció jelentős gyulladásgátló hatás kialakulásához vezet in vitro és in vivo egyaránt*

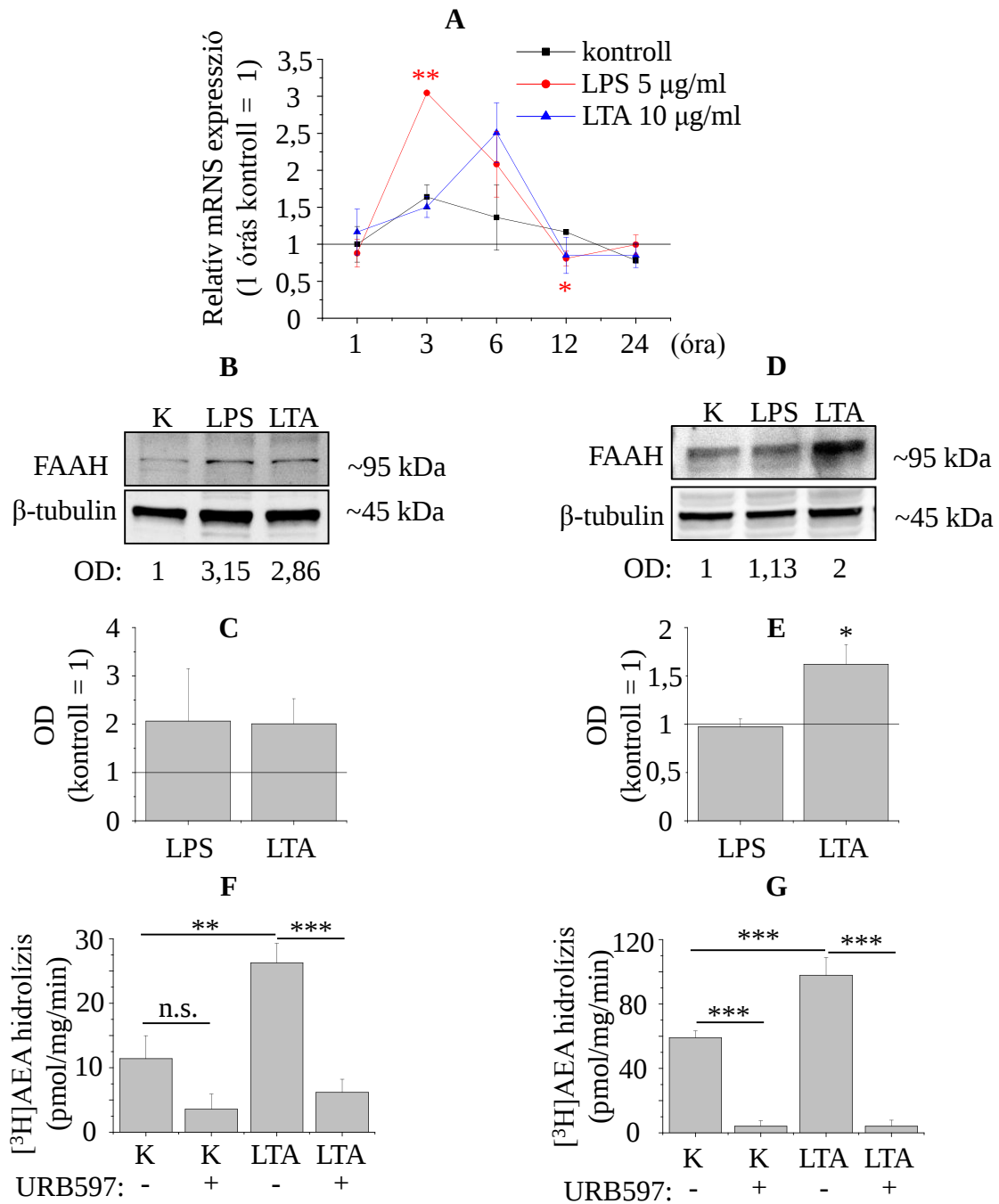
A *Célkitűzés* fejezetben megfogalmazottak szellemében vizsgálataink második felében az ECS gyulladáshoz kapcsolódó folyamatok szabályozásában betöltött szerepének jobb megismerésére tettünk kísérletet epidermális keratinocitákon.

6.2.1. *A TLR aktiváció jelentősen fokozza FAAH kifejeződését és aktivitását humán epidermális keratinocitákon*

Kísérleteink első lépéseként sikerrel reprodukáltuk azokat az irodalmi adatokat, melyek szerint az eCB-okat lebontó egyik legfontosabb enzim, a FAAH funkcionálisan aktív formában fejeződik ki a humán epidermális keratinocitákon (Maccarrone és mtsai., 2003; Pucci és mtsai., 2011; **34. ábra**). Amint arról a 3.2.7.1. *alfejezetben* már szó esett, a FAAH által szabályozott lokális eCB-tónus irodalmi adatok alapján egy állandó, „homeosztatis” gyulladásgátló hatást tart fenn a keratinocitákon (Karsak és mtsai., 2007; Leonti és mtsai., 2010). Mindezek ismeretében feltételezhető, hogy a lokális gyulladáshoz kapcsolódó folyamatok elindítása során az eCB-tónus FAAH-mediált, negatív irányú szabályozása is hozzájárulhat a válasz mértékének finomhangolásához.

Ezen hipotézis tesztelésére a hámsejteket különféle TLR-aktivátorokkal (LPS és LTA) kezeltük, majd megvizsgáltuk a FAAH kifejeződését. Bár érdekes módon az mRNA expresszió csak LPS kezelésre mutatott statisztikailag szignifikáns emelkedést HPV-KER sejteken (3 órás kezelés; **34/A ábra**), mégis mindkét TLR aktivátor fokozni látszott³⁸ a FAAH fehérje szintű expresszióját az immortalizált hámsejteken, míg NHEK-kon csak az LTA-nak volt ilyen hatása (**34/B-E ábra**).

³⁸ Bár a fokozódás konzekvensen jelen volt, ez vélhetőleg a kis elemszám (N=3) miatt nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket HPV-KER sejteken.



34. ábra A Toll-like receptor aktiváció a FAAH pozitív regulátora humán epidermális keratinocitákon

A) A FAAH mRNA expresszióját az ábrán látható kezeléseket követően vizsgáltuk meg (Q-PCR). Az adatokat a $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmazva előbb a *PPIA* expressziós szintjére, majd az ábrán folytonos vonallal jelölt 1 órási kontroll tenyészet értékeire normalizáltuk, és átlag $\pm$ SD (N=3) alakban ábrázoltuk. **K:** kontroll. *, ** $P < 0,05$, $0,01$ az adott napi kontrollhoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. **(B-E)** A Western blot analízis során az ábrán látható módokon 24 órán át kezelt HPV-KER **(B, C)** és NHEK **(D, E)** tenyészeteket vizsgáltunk (LPS: 5 µg/ml; LTA: 10 µg/ml). **OD:** a FAAH-specifikus sávoknak előbb a mintafelviteli kontrollként alkalmazott β-tubulin jelintenzitására, majd a kontrollra normalizált optikai denzitása. **(B és D)** Reprezentatív Western blotok. **(C, E)** A Western blot kísérletek statisztikai analízise (**C:** HPV-KER; **E:** NHEK). A normalizált OD-ok átlag $\pm$ SEM alakban vannak ábrázolva (N=3), * $P < 0,05$. **(F, G)** A FAAH aktivitást 24 órási kontroll, illetve LTA (10 µg/ml) kezeléseket követően vizsgáltuk meg (**F:** HPV-KER; **G:** NHEK). Az aktivitás specificitását URB597-tel (100 nM) ellenőriztük. A három független passzázból (HPV-KER), illetve donorból (NHEK) származó, triplikálva végzett kísérlet adatait átlag $\pm$ SEM alakban ábrázoltuk. n.s.: nem szignifikáns különbség; **, *** $P < 0,01$, $0,001$.

Bár ezen eredmények részben alátámasztani látszottak a FAAH aktivitás fokozódásával kapcsolatban megfogalmazott előzetes hipotézisünket, annak érdekében, hogy egyértelműen igazolhassuk vagy kizárhassuk ezt a feltételezést, megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolja a TLR-jelátvitel a FAAH aktivitását mind HPV-KER sejteken, mind pedig NHEK-kon.

Három független passzázból (HPV-KER), illetve három donorból (NHEK) származó sejteket vizsgálva megállapítottuk, hogy a FAAH aktivitása valóban jelentősen fokozódik TLR2 aktiváció hatására (**34/F-G ábra**), ami arra utal, hogy a TLR-aktivációt követően másodlagosan csökkenő eCB tónusnak valóban szerepe lehet a gyulladásos reakció felerősítésében. Ezért a következőkben azt vizsgáltuk meg, hogy a FAAH-gátlása milyen hatással van a humán epidermális keratinociták gyulladásos folyamataira.

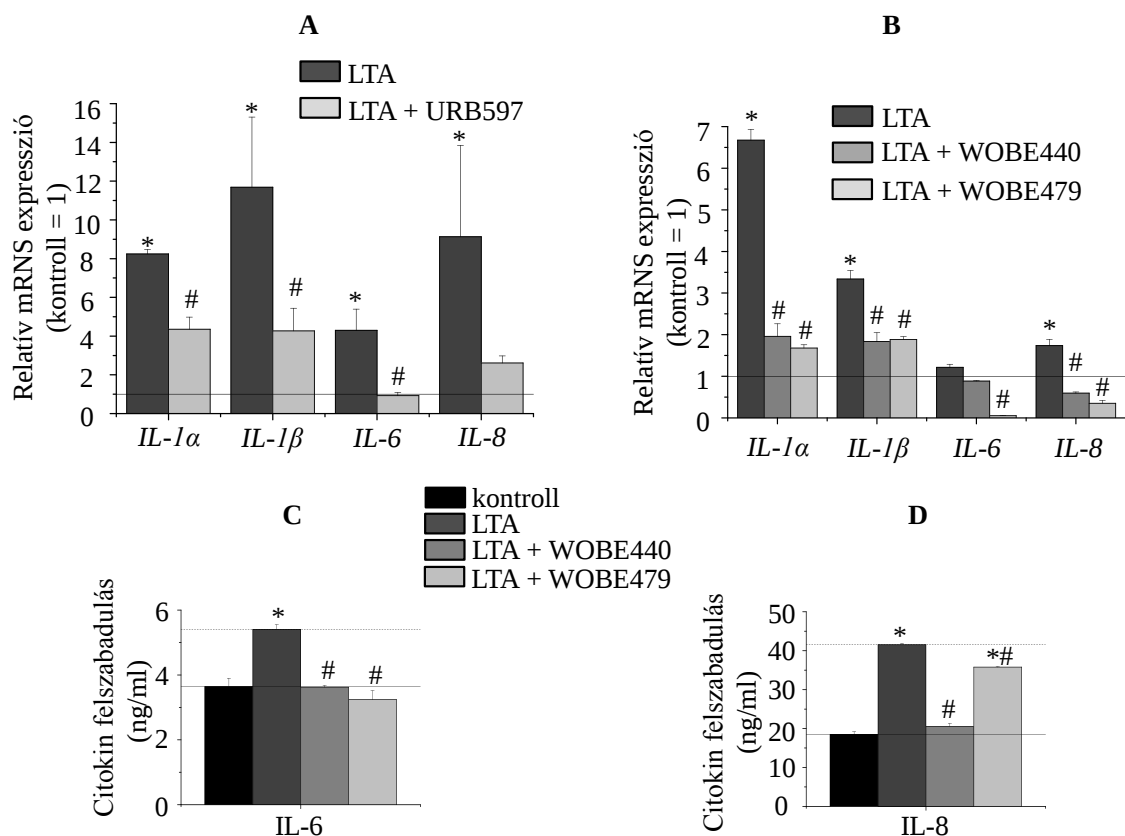
6.2.2. A FAAH-inhibitorok jelentős gyulladásgátló hatást fejtenek ki

Mint ahogy fent bemutattuk, a keratinociták LTA kezelésre jelentős FAAH-expresszió és aktivitás fokozódással reagáltak (**34. ábra**); ezért további kísérleteink során ezt használtuk az „*in vitro* modell-gyulladás” kiváltására. Megállapítottuk, hogy az LTA-kezelés valóban jelentősen fokozta több kulcsfontosságú gyulladásos citokin (*IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6* és *IL-8*) mRNA szintű expresszióját (**35/A-B ábra**).

Kimutattuk azt is, hogy ezt mind a kereskedelmi forgalomban már kapható URB597 (Mor és mtsai., 2004; **35/A ábra**), mind pedig két, újonnan szintetizált, potens és szelektív³⁹ FAAH-inhibitor, a WOBE440 és -479 (Nicolussi és mtsai., 2014a; **35/B ábra**) alkalmazása képes volt hatékonyan kivédeni. Tekintettel arra, hogy a gyulladásos citokinek esetében a termelés és a molekula biológiailag aktív formában történő felszabadítása igen gyakran több, független lépésben szabályozott folyamat, ezért azt is megvizsgáltuk, hogy a FAAH-gátlók

³⁹ Kollaborációs partnereink eredményei szerint a két újonnan szintetizált, N-alkil-karbamát szerkezetű inhibitor hatékony FAAH-gátló koncentrációi nem aktiválják direkt módon a CB₁ és CB₂ kannabinoid receptorokat, nincsenek hatással a 2-AG lebontását végző monoacilglicerol-lipázra, és közvetlenül nem befolyásolják az EMT vagy a COX₂ működését sem (Nicolussi és mtsai., 2014a), így rendkívül szelektív FAAH-inhibitoroknak tekinthetők.

miként befolyásolják a sejtek felülűszőjába szekretált citokin-mennyiséget. ELISA technika segítségével megállapítottuk, hogy mind a WOBE440, mind a WOBE479 szignifikánsan csökkentette az LTA-indukálta IL-6 és IL-8 felszabadulást (35/C-D ábra), ami arra utalt, hogy jó eséllyel *in vivo* is hatékony gyulladásgátló hatást mutatnak majd.

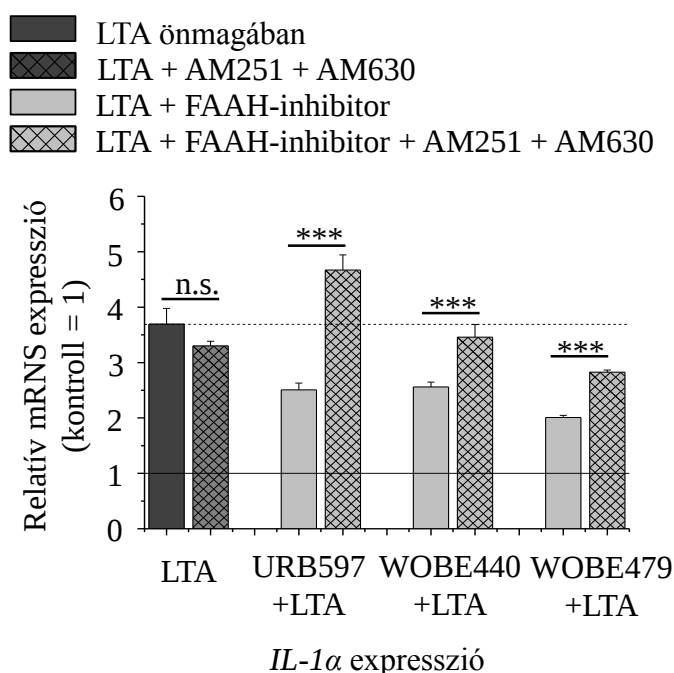


35. ábra A FAAH-inhibitorok jelentős gyulladásgátló hatékonyságot mutatnak humán epidermális keratinocitákon

(A, B) A gyulladásos citokinek mRNS expresszióját HPV-KER sejteken az ábrán látható 24 órás kezeléseket követően vizsgáltuk meg (Q-PCR; LTA: 10 µg/ml; URB597: 100 nM; WOBE440: 100 nM; WOBE479: 200 nM). Az adatokat a $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmazva előbb a *PPIA* expressziós szintjére, majd az ábrákon folytonos vonallal jelölt kontroll tenyészet értékeire normalizáltuk, és átlag±SD (N=3) alakban ábrázoltuk. * $P < 0,05$ a kontroll csoporthoz képest. # $P < 0,05$ a kizárólag LTA kezelést kapó csoporthoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett. (C-D) Az IL-6 (C) és IL-8 (D) felszabadulását az ábrán jelölt 24 órás kezeléseket követően ELISA technikával végeztük HPV-KER sejtek felülűszőjából. Az adatokat átlag±SD (N=3) alakban ábrázoltuk. * $P < 0,05$ a kontroll csoporthoz képest. # $P < 0,05$ a kizárólag LTA kezelést kapó csoporthoz képest. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

6.2.3. A FAAH-inhibitorok gyulladásgátló hatása $CB_{1/2}$ -mediált, „klasszikus” kannabinoid jelátvitel révén valósul meg

Bár az általunk használt, újonnan szintetizált, specifikus FAAH-inhibitorok gyulladásgátló hatásának mechanizmusa az irodalmi adatok (Karsak és mtsai., 2007; Di Marzo, 2008; Nicolussi és mtsai., 2014a) alapján első pillantásra egyértelműnek tűnt, mégis meg kívántunk bizonyosodni arról, hogy a látottak hátterében valóban „klasszikus” kannabinoid jelátvitel (ti. a FAAH gátlásának hatására fokozódó eCB tónus által aktivált CB_1 és CB_2 receptorokhoz kapcsolódó jelátvitel) áll-e. Ennek eldöntésére AM251 és AM630 jelenlétében is megismételtük az előző kísérleteinket, és megállapítottuk, hogy a CB_1 és a CB_2 receptorok együttes gátlása (az irodalmi adatok [Karsak és mtsai., 2007] alapján vártakkal összhangban) képes volt kivédeni a WOB440 és WOB479, valamint a pozitív kontrollként alkalmazott URB597 gyulladásgátló hatását is. Ezen eredményeink egyértelműen azt sugallták, hogy a FAAH-gátlók anti-inflammatórikus hatásának kialakulásáért a keratinocitákon valóban a „klasszikus”, $CB_{1/2}$ -mediált kannabinoid jelpálya aktiválódása felelős.

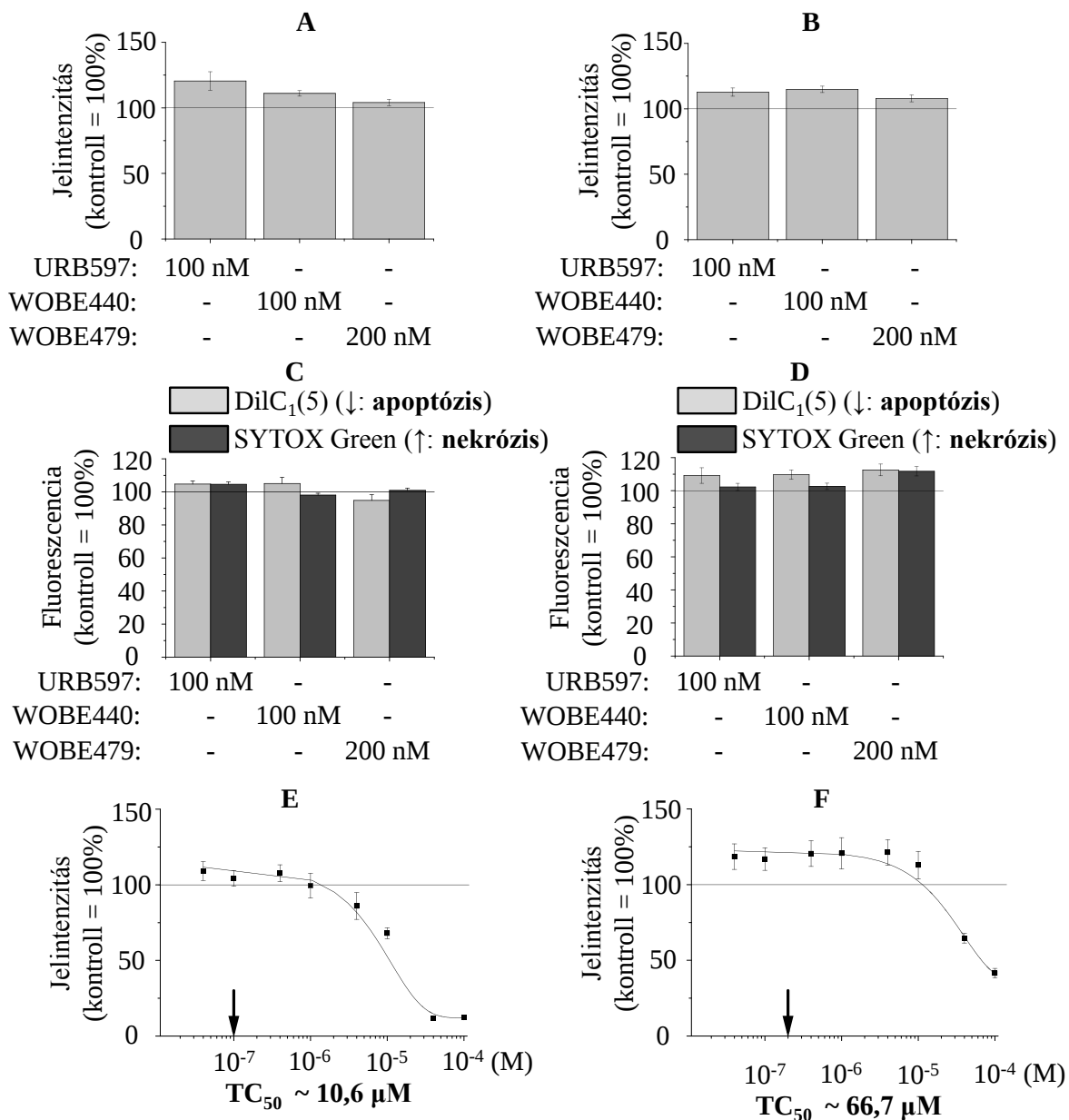


36. ábra A FAAH-inhibitorok $CB_{1/2}$ -mediált, „klasszikus” kannabinoid jelátvitel révén fejtik ki gyulladásgátló hatásukat

Az *IL-1α* mRNA szintű expresszióját HPV-KER sejteken, az ábrán látható 24 órás kezeléseket követően vizsgáltuk meg (Q-PCR; LTA: 10 μ g/ml; URB597: 100 nM; WOB440: 100 nM; WOB479: 200 nM). Az adatokat a $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmazva előbb a *PPIA* expressziós szintjére, majd az ábrán folytonos vonallal jelölt kontroll tenyészet értékeire normalizáltuk, és átlag $\pm$ SD (N=3) alakban ábrázoltuk. *** $P < 0,001$. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

6.2.4. A FAAH-gátlók még hosszabb távú kezelések során is a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazhatók

A következőkben (az anyagok lehetséges *in vivo* alkalmazhatóságát szem előtt tartva) megvizsgáltuk, hogy a FAAH-gátlók miként befolyásolják a keratinociták életképességét.



37. ábra A FAAH-inhibitorok még hosszabb távú kezelések alkalmával is a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazhatóak

HPV-KER tenyésztéseinket 8 (A, C), 24 (B, D), illetve 72 órán keresztül (E-F) kezeltük, majd MTT-assay-t (A-B, E-F), valamint DilC₁(5)-SYTOX Green jelölést (C-D) végeztünk. A kapott értékeket átlag±SEM alakban (N=4), az ábrákon folytonos vonallal jelölt kontroll átlagának százalékában ábrázoltuk. Az (E) és (F) paneleken a nyilak az inhibitorok biokémiai karakterizálása során meghatározott (Nicolussi és mtsai., 2014a), és általunk is hatékonynak talált gyulladásgátló koncentrációit jelölik. TC₅₀: az az illesztett görbe alapján becsült koncentráció, melynél az MTT jel a kontroll felére csökkent. Egy további, független kísérlet hasonló eredményre vezetett.

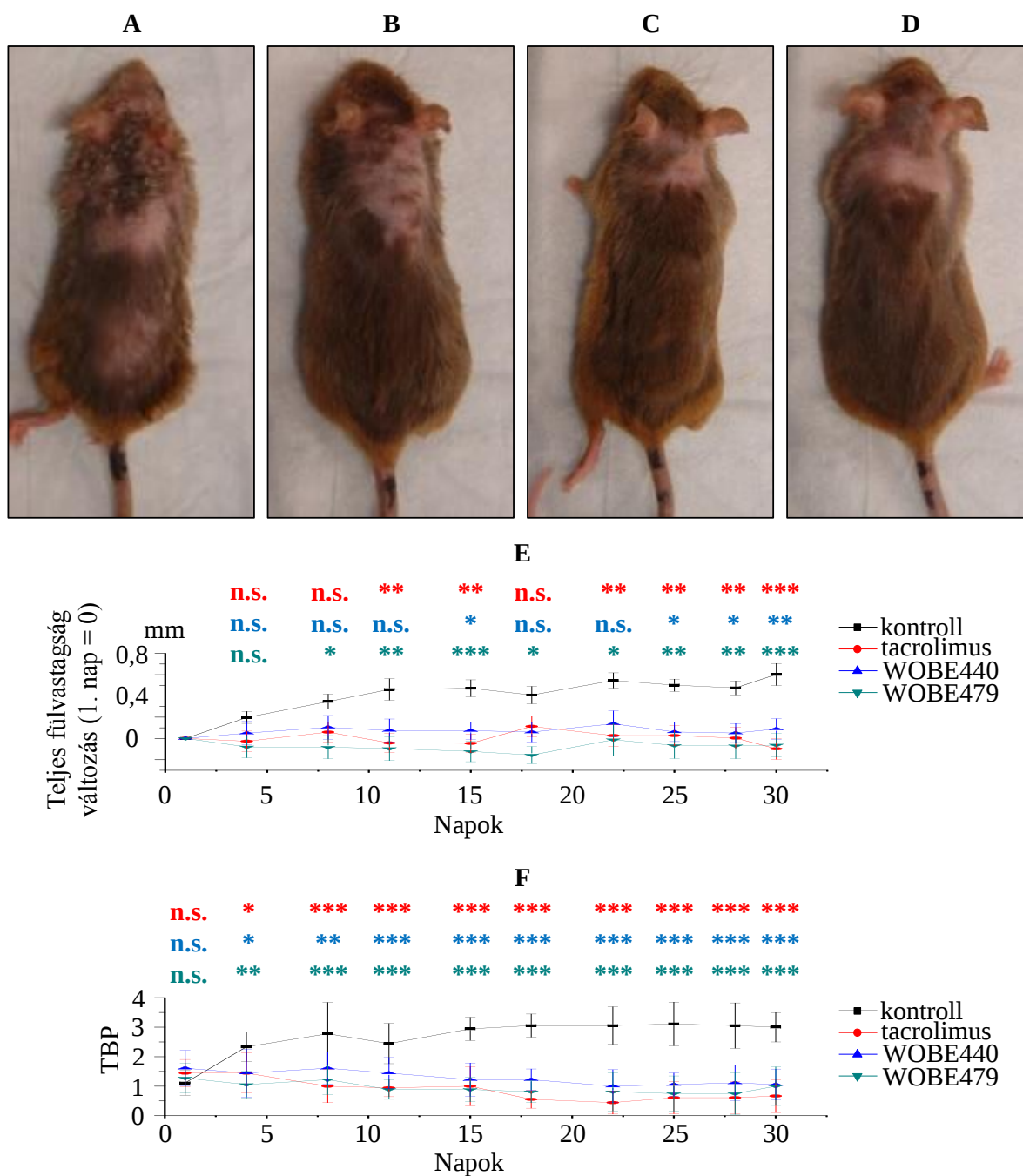
Megállapítottuk, hogy a FAAH-inhibitorok 8 és 24 órás kezelések során nem befolyásolták a HPV-KER sejtek életképességét (37/A-B ábra), és nem indukáltak korai, sejtszámváltozással még nem járó apoptotikus vagy nekrotikus sejthalál folyamatokat sem (37/C-D ábra). Méréseinket hosszabb távú, 72 órás kezeléseket követően megismételve is úgy találtuk, hogy a FAAH-inhibitorok citotoxikus hatása csak több nagyságrenddel a korábban hatékonynak talált gyulladásgátló koncentrációk (WOBE440: 100 nM; WOBE479: 200 nM) fölött jelentkezik (WOBE440 TC₅₀: ~10,6 µM; WOBE479 TC₅₀: ~66,7 µM; 37/E-F ábra).

6.2.5. A FAAH-inhibitorok kedvezően befolyásolják az NC/Tnd egerek bőrtüneteit

Az epidermális keratinociták ECS-ének jobb megismerését célzó kísérleteink zárásaként arra voltunk kíváncsiak, hogy az *in vitro* hatékonynak és biztonságosnak mutatkozó FAAH-inhibitorok egy magas klinikai relevanciával rendelkező *in vivo* modellben topikális alkalmazást követően is effektívnek bizonyulnak-e.

A kérdés megválaszolására partnereink a korábban NC/Nga-ként ismert és az AD széles körben elfogadott modelljeként számon tartott NC/Tnd egértörzsön (Jung és mtsai., 2011) vizsgálták a FAAH-inhibitorok hatékonyságát, „pozitív” kontrollként calcineurin-inhibitort (tacrolimus) adagolva. A kísérletek során megállapítást nyert, hogy a két újonnan szintetizált FAAH-inhibitor topikálisan adagolva a tacrolimusszal gyakorlatilag megegyező hatékonysággal enyhítette az egerek bőrtüneteit és fogta vissza a gyulladásos folyamatok aktivitásának általános jelzőjeként számon tartott ödémás fülduzzadás kialakulását; ráadásul a 30 napos vizsgálati periódus alatt semmilyen nyilvánvaló makroszkópos mellékhatásra vagy viselkedésbeli változásra sem derült fény (38. ábra).

Mindezen eredményeink megerősítették, hogy a topikálisan adagolt FAAH-gátlók *in vivo* is hatékonyak lehetnek a különböző bőrgyulladások kezelésében.



38. ábra A topikálisan alkalmazott új típusú FAAH-inhibitorok hatékonyan enyhítik az NC/Tnd egerek bőrtüneteit

(A-D) Reprezentatív fotódokumentáció a kísérletbe bevont állatokról az 1 hónapos kísérleti periódus végén. **A:** kontroll (aceton:olívaolaj 4:1 arányú keveréke); **B:** tacrolimus (0,1 [g/100 ml] speciális ásványolaj, paraffin, propilén-karbonát, vazelin és viasz tartalmú formulációban); **C:** WOBE440 (1 [g/100 ml] aceton:olívaolaj 4:1 arányú keverékében); **D:** WOBE479 (1 [g/100 ml] aceton:olívaolaj 4:1 arányú keverékében). (E) A két fül kumulált vastagságának változása a kiindulási fülvastagsághoz képest. (F) A teljes betegség pontszám (TBP) változása a kiindulási értékhez képest. A pontozás szubjektív skála (0: tünetmentes; 1: enyhe tünetek; 2: közepesen súlyos tünetek; 3: súlyos tünetek) segítségével történt, melynek során a *bőrpír*, az *ödémaképződés/papuláció*, illetve a *váladékozás*, *pörkképződés* és esetleges *vérzés* fennállása/súlyossága volt a vizsgálgódás tárgya. A kísérletek két egyenlő részben, csoportonként 8-9 állattal zajlottak. Az eredmények átlag±SEM alakban vannak feltüntetve. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ az adott napi kontrollhoz viszonyítva. n.s.: nem szignifikáns különbség.

7. Megbeszélés

„Felix, qui potuit rerum
cognoscere causas.”
Vergilius: *Georgica*, II. 490.

A bőr (kór)élettani folyamatainak mélyebb megismerése és megértése számos igen nagy prevalenciájú megbetegedés kezelésében kecsegtet az előrelépés reményével. Az ECS és a(z) (endo)kannabinoid szignalizáció egy olyan újonnan felfedezett szabályozó rendszer, amelyről irodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy döntő jelentőségű az immunrendszer működéseinek finomhangolásában, és mint ilyen, az emberi bőr vonatkozásában is számos gyakori, gyulladásos folyamatokkal kísért betegség (pl. az AD vagy az *acne* stb.) patogenezisében játszhat szerepet, így pedig a korszerű, molekuláris medicina szemléletű terápiás próbálkozások egyik kulcsfontosságú jövőbeli célpontja lehet. Jelen értekezésben ezért arra tettünk kísérletet, hogy megvizsgáljuk egy nem-pszichotróp FK, a CBD hatásait humán szebocitákon, illetve, hogy több információt szerezzünk az egyik legfontosabb eCB-okat lebontó enzim, a FAAH működéséről és jelentőségéről a humán epidermális keratinociták immunológiai viselkedésének szabályozásában.

7.1. A FAAH mint lehetséges új célpont a bőrgyulladások kezelésében

Az emberi szervezet elsődleges védelmét a különféle külső ártalmakkal szemben egyebek mellett a bőr komplex barrierfunkciói (fizikokémiai, immunológiai és mikrobiológiai barrierék) látják el (Elias, 2008; Reitamo és Remitz, 2014). Amint arról az *Irodalmi áttekintés* 3.1.2. *alfejezetében* részletesen szó esett, a KEB felépítésében kulcsfontosságú a különböző bőr eredetű sejtek (pl. epidermális keratinociták) precízen szabályozott proliferációs/differenciációs egyensúlya, illetve az egyes sejtféleségek koordinált együttműködése. Ráadásul mind az immunológiai, mind a fizikokémiai barrier felépítése és fenntartása nagyban függ a kommenzális/szimbionta mikrobióta és a bőr kölcsönhatásaitól. Az egészséges barrier tehát egyfajta folytonos „párbeszédként” fogható fel, melyből bármelyik résztvevő kiesése, illetve „abnormális” viselkedése maga után vonhatja a másik

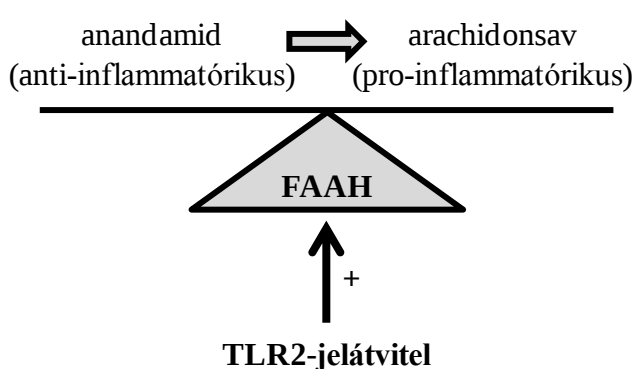
szereplő működészavarait is (Kupper és Fuhlbrigge, 2004; Gallo és Nakatsuji, 2011; Oláh és mtsai., 2012).

Az ilyesfajta „komplex” barrierkárosodásra egy kiváló példa az AD, amely egy minden részletében máig sem tisztázott patogenezisű, elsősorban a fejlett ipari országokban előforduló, idült gyulladásal jellemezhető kórkép (Kubo és mtsai., 2012). Tekintettel arra, hogy az AD-ben fennálló krónikus gyulladás egyértelműen hozzájárul a fizikokémiai barrier további károsodásához (Howell és mtsai., 2009; Kuo és mtsai., 2013), könnyen belátható, hogy a bőr immunológiai folyamatait szabályozó jelátviteli rendszerek jobb megismerése fontos lépés lehet az újabb, ideális esetben a jelenleg elérhetőeknél hatékonyabb és/vagy kedvezőbb mellékhatásprofillal bíró terápiás eljárások kifejlesztéséhez vezető úton.

Ismert, hogy az epidermális keratinociták különféle kemokinek és citokinek felszabadítása révén kulcsfontosságúak a „professzionális” immunsejtek toborzásában és működésük szabályozásában; biológiai aktivitásuk ily módon jelentős szerepet játszik a bőrgyulladások elindításában, valamint aktivitásuk és lefolyásuk szabályozásában (Kupper és Fuhlbrigge, 2004; Karsak és mtsai., 2007).

Bár a FAAH epidermális expressziója már régóta ismert (Maccarrone és mtsai., 2003), jelen kísérleteink során elsőként mutattuk ki, hogy az enzim aktivitásának poszttranszkripciószabályozása (véltetőleg a homeosztatisztikus eCB tónus *in situ* csökkentésén keresztül) bizonyos esetekben hozzájárulhat a gyulladásos folyamatok kiteljesedéséhez. Eredményeink szerint ugyan a FAAH mRNS szintű kifejeződése nem (LTA) vagy csak tranziens módon (LPS) változott TLR2 és -4 aktiváció hatására HPV-KER sejteken (**34/A ábra**), az expresszió fehérje szintű növekedése ugyanakkor (bár a kis elemszám miatt nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet) minden esetben konzekvensen kialakult (**34/B-C ábra**). NHEK-kon vizsgálódva pedig azt tapasztaltuk, hogy a kifejeződés a TLR2-t aktiváló LTA kezelést követően matematikailag is szignifikáns mértékben fokozódott (**34/D-E ábra**). Tekintettel

arra, hogy az mRNA és fehérje szintű eredmények ellentmondani látszottak egymásnak, illetve arra, hogy egy enzim kifejeződésének változása nem szükségszerűen tükrözi az aktivitás mértékét, a TLR-jelátvitel lehetséges pozitív szabályozó szerepét direkt aktivitás mérés segítségével is megvizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy fehérje szinten nyert adataink által sugalltakkal összhangban a FAAH aktivitása szignifikánsan fokozódott a TLR2-t aktiváló LTA-val történő 24 órás kezelések során mind az immortalizált, mind pedig a primer humán epidermális keratinociták esetén (**34/F-G ábra**).



Ezen eredményeink két fontos tanulsággal is szolgáltak. Egyfelől rámutattak, hogy - legalábbis bizonyos Toll-like receptor(ok) aktivációját követően - a FAAH aktivitásának

39. ábra A FAAH aktivitás feltételezett „kapuőr” szerepe a TLR2-aktiváció által kiváltott gyulladásos folyamatok szabályozásában

fokozódása (a csökkenő homeosztatis, gyulladásgátló eCB-

tónus, valamint elméletileg a következményesen fokozódó AA termelés révén⁴⁰⁾ hozzájárulhat a gyulladásos folyamatok dinamikájának pozitív regulációjához (**39. ábra**)⁴¹. Másfelől pedig elvezettek ahhoz az eddig más rendszerekben le nem írt felismeréshez is, hogy a FAAH esetében az aktivitás szabályozásában kiemelkedő jelentőségű a poszttranszkripció reguláció. Bár természetesen előfordulhat, hogy ez a biológiai viselkedés a keratinociták sajátja és más sejtféleségek esetében nem jellemző, mégis fontos adalék lehet a FAAH

⁴⁰ Tekintettek arra, hogy eredményeink szerint (lásd később) a CB₁ és CB₂ receptorok szimultán gátlása kivédte a gyulladásgátló hatás kialakulását (**36. ábra**), adataink arra engednek következtetni, hogy az AA szerepe ebben az esetben a gyulladásos folyamatok kialakításában és fenntartásában alárendelt jelentőségű lehet. Nem szabad ugyanakkor elfelejteni, hogy a felszabaduló AA a differenciálódás és ezzel a fizikokémiai barrier felépítésének szabályozásában ettől függetlenül még fontos szerepet játszhat (Weise és mtsai., 2011; Sivamani, 2014).

⁴¹ Ennek akár olyan közismert betegségek patogenezisében is lehet szerepe, mint a *rosacea* ahol a közelmúltban írták le a TLR2 expresszió fokozódását epidermális keratinocitákon (Picardo és Ottaviani, 2014). Ennek fényében eredményeink alapján nem kizárt, hogy a betegségre jellemző gyulladásos folyamatok hátterében a csökkent eCB-tónus is szerepet játszhat.

további vizsgálatához, hiszen felhívja a figyelmet arra, hogy a kizárólag mRNS szinten történő vizsgálatok könnyen álnegatív eredményekre vezethetnek⁴².

Mindezen eredmények alapján a TLR-jelátvitel által fokozott FAAH aktivitás normalizálása egy teljesen új, célzott gyulladásgátló terápia esélyét vetítette előre a bőr gyulladásos folyamatainak kezelésében. Ezen hipotézis tesztelésére kísérleteink következő szakaszában megvizsgáltuk, hogy egy kereskedelmi forgalomban már elérhető (URB597; Mor és mtsai., 2004), illetve két, kollaborációs partnereink által újonnan kifejlesztett, potens és szelektív⁴³ FAAH-inhibitor (WOBE440 és WOBE479; Nicolussi és mtsai., 2014a) miként befolyásolja az LTA-indukálta gyulladásos válasz kialakulását. Megállapítottuk, hogy a gátlószerek mind mRNS, mind fehérje szinten jelentősen csökkentették az LTA-ra adott pro-inflammatórikus reakciót (**35. ábra**). A hatás hátterében az irodalmi adatokkal (Di Marzo, 2008; Nicolussi és mtsai., 2014a) összhangban a CB₁ és CB₂ kannabinoid receptorok indirekt aktiválása állt (**36. ábra**), a FAAH-inhibitorok pedig rövid és hosszú távú kezelések során sem csökkentették a humán keratinociták életképességét (**37. ábra**). Mindezen eredmények arra utaltak, hogy a FAAH-inhibitorok *in vivo* is képesek lehetnek hatékony gyulladásgátló válasz kialakítására. Ez esetben ráadásul, elméleti megfontolások alapján, ezt a hatást egyéb lokális tényezők is erősíthetik, hiszen az epidermális eCB-tónus fokozódása (elvileg) pl. a LC-ek és az érzőideg-végződés biológiai viselkedését is anti-inflammatórikus irányba befolyásolhatja (Maccarrone és mtsai., 2015).

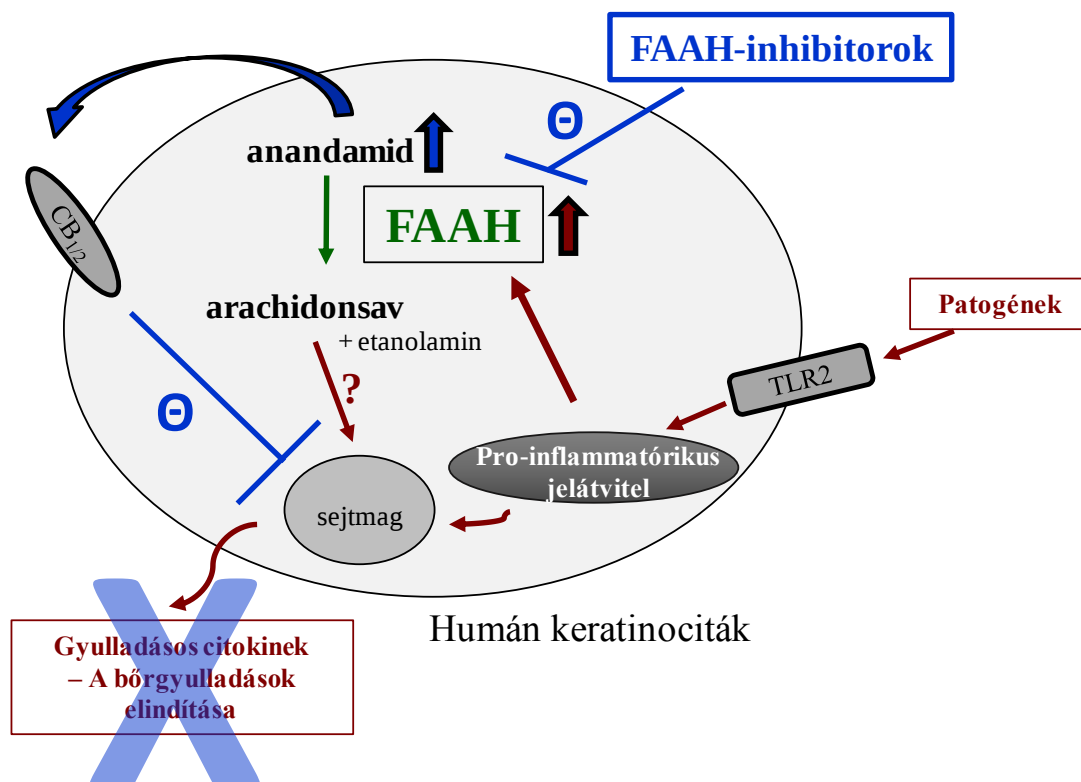
A lehetséges klinikai felhasználás szempontjából kulcskérdés, hogy szisztémás vagy topikális úton kívánjuk-e alkalmazni az adott szereket. Tekintettel arra, hogy a topikális

⁴² Ezzel egybeesnek azon megfigyeléseink előzetes eredményei is, melyek szerint AD-ben a tüneteket mutató bőrterületekről származó tenyésztett keratinocitákban a FAAH mRNS szintű expressziója hasonló a tünetmentes területekről származókéhoz, fehérje szinten azonban markáns különbségek mutatkoznak a két sejtpopuláció között (nem publikált megfigyelés).

⁴³ Amint arról már szó esett, kollaborációs partnereink alapos munkájának hála bebizonyosodott, hogy a két újonnan fejlesztett inhibitor hatékony FAAH-gátló koncentrációi nem befolyásolják a kereskedelmi forgalomban kapható FAAH-gátlók többsége által gyakran „célba vett” egyéb enzimek (pl. COX₂ és monoacilglicerol-lipáz), valamint az EMT aktivitását, és nem kötődnek a CB₁ és CB₂ kannabinoid receptorokhoz sem, így biológiai hatásaik valóban szelektíven a FAAH gátlásának számlájára írhatók.

alkalmazás esetén sokkal célzottabb (esetleg nagyobb dózisu) kezelésre nyílik lehetőség, az esetleges mellékhatások minimalizálása érdekében mindenképpen a direkt módon a bőrre történő adagolás tűnik a legcélravezetőbbnek. Mindezen megfontolások alapján, eredményeink klinikai relevanciájának növelése érdekében kísérleteink zárásaként az AD általánosan elfogadott modelljéül szolgáló NC/Tnd egerek (Jung és mtsai., 2011) felhasználásával is meg kívántuk vizsgálni a FAAH-gátlók topikális alkalmazást követő gyulladásgátló hatékonyságát.

Megállapítottuk, hogy a megfelelő formulációban a bőrfelszínre adagolt FAAH-inhibitorok a klinikai gyakorlatban széles körben használt és ezért jelen kísérleteink során egyfajta pozitív kontrollként alkalmazott tacrolimushoz hasonló hatékonysággal enyhítették az állatok gyulladásos folyamatainak mértékét indirekt módon jelző fülduzzadást, valamint szignifikánsan csökkentették a TBP-ot is úgy, hogy az egy hónapos vizsgálati periódus során nem okoztak megfigyelhető mellékhatást (38. ábra).



40. ábra A FAAH-gátlók lehetséges helye és szerepe a bőrgyulladások kezelésében

Színkód: **bordó: a TLR2-jelátvitel hatása; kék: a FAAH-gátlás hatása; zöld: a FAAH aktivitása.**

Mindezek alapján a most bemutatott, komplementer *in vitro* és *in vivo* kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy a FAAH aktivitása által szabályozott eCB-tónus egy lehetséges TLR-függő regulátora a bőr gyulladásos folyamatainak. A FAAH gátlása pedig célzott, hatékony és az állatkísérletes adatok tanúsága szerint nagy valószínűséggel mellékhatásmentes terápiás eszköz lehet a különféle bőrgyulladások jövőbeli kezelésében (**40. ábra**). Reményeink szerint így eredményeink alapján a közeljövőben mód nyílhat a vizsgált szelektív FAAH-gátlók topikális alkalmazást követő hatékonyságának tesztelésére humán klinikai vizsgálatokban is.

7.2. A CBD komplex anti-acne hatásai és a háttérükben húzóó jelátvitel

Az *acne* az egyik leggyakoribb emberi bőrbetegség, melynek kezelése a mai napig sem teljes mértékben megoldott (a téma részletes áttekintése a 3.1.5. *alfejezetben* található). Ennek megfelelően napjainkban is számos új kezelési mód (pl. retinsav metabolizmust blokkoló ágensek [„RAMBA”], laurilsav, *P. acnes* vakcináció, PPAR agonisták, dipeptidil-peptidáz IV inhibitorok, az 5-LOX-t gátló Zileuton, sztearoil-koenzim A inhibitorok, TLR2 gátlószerek, illetve új típusú gyulladás-gátlók, pl. az α -melanocita stimuláló hormonból származó tripeptid, a KdPT [lizin-d-prolin-treonin]) vizsgálata zajlik világszerte (Mastofrancesco és mtsai., 2010; Dessinioti és Zouboulis, 2014; Rawlings, 2014). A közelmúltban munkacsoportunk fényt derített arra, hogy az ECS klasszikus (CB₂ receptor; Dobrosi és mtsai., 2008) és tágabb értelemben vett (TRPV1; Tóth és mtsai., 2009) tagjai komplex módon regulálják a faggyúlipid-termelést, ezért jelen kísérleteink során humán, immortalizált sebociták (SZ95 sejtek; Zouboulis és mtsai., 1999), illetve hSOC (Lu és mtsai., 2007; Tiede és mtsai., 2009; Hinde és mtsai., 2013) alkalmazásával a nem-pszichotróp FK CBD humán faggyúmirigysejtekre gyakorolt biológiai hatásait vettük górcső alá.

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a neurológiai klinikai gyakorlatban a *sclerosis multiplex* adjuváns kezelésében már évek óta alkalmazott CBD (Pertwee, 2006; Zuardi és

mtsai., 2006a; Zuardi és mtsai., 2006b) komplex *anti-acne* hatásokat vált ki. Eredményeink szerint az életképesség és a szebociták bazális lipidtermelésének befolyásolása nélkül⁴⁴ (**7. és 8. ábra**) (i) mind kvantitatív, mind kvalitatív értelemben normalizálja a „*pro-acne*” ágensek által kórosan fokozott faggyúlipid-termelést (*univerzális liposztatikus hatás*; **7. és 9. ábra**); (ii) csökkenti a szebociták proliferációját (*anti-proliferatív hatás*; **10. ábra**); és (iii) kivédi a „*pro-acne*” ágensek, illetve TLR-aktivátorok gyulladásos citokinek termelésére gyakorolt hatását is (*univerzális gyulladásgátló hatás*; **13. ábra**). Kimutattuk azt is, hogy a CBD szebosztatikus (kombinált liposztatikus és anti-proliferatív⁴⁵) hatásai „*in vivo*-szerű” körülmények között, hSOC-ban is kialakulnak (**12. ábra**), ami alapján jó esély látszik arra, hogy esetleges jövőbeli klinikai alkalmazása során is hatékony legyen.

Az előzőekben tárgyalt és jelen kísérletek során bizonyított, hármas celluláris *anti-acne* aktivitás mellett érdemes szót ejteni arról is, hogy irodalmi adatok alapján a CBD topikális alkalmazását további, a betegség kezelése szempontjából előnyös hatások kialakulása kísérheti. A 3.1.5. *alfejezetben* részletesen tárgyaltak szerint az *acne* kialakulásában a már említett szebocita-specifikus lépések (fokozott mennyiségű és megváltozott minőségű faggyúlipid-termelés, fokozott proliferáció, gyulladás) mellett nagy jelentőséggel bír a FM-ek kivezetőcsöveinek hiperkeratinizáció miatti elzáródása (*comedo* képződés), illetve a pangó faggyúban felszaporodó baktériumok (pl. egyes *P. acnes* törzsek) által kiváltott gyulladás (Zouboulis és mtsai., 2003; Kurokawa és mtsai., 2009; Zouboulis és mtsai., 2005; Shirakawa és mtsai., 2006; Layton, 2010; Schneider és Paus, 2010; Vega és mtsai., 2010; Szabó és

⁴⁴ Ezen eredmények klinikai jelentőségét az adja, hogy az „ideális” *acne* kezelés során többek között a FM-ek élettani funkcióinak megőrzésére is törekednünk kell(ene), hiszen a faggyútermelés jelentős szerepet játszik egyebek mellett a KEB kialakításában (Zouboulis és mtsai., 2008). Ennek megfelelően az, hogy az izotretinoinnal ellentétben (Nelson és mtsai., 2006) a CBD nem „szebocitotoxikus”, hanem a kórosan fokozott lipidtermelést normalizáló, „tisztán” liposztatikus és anti-proliferatív hatásokat vált ki, a reménybeli mellékhatásmentes terápia szempontjából mindenképpen üdvözlendő, és tovább növeli az eredmények klinikai transzláthatóságának esélyét.

⁴⁵ Minthogy a faggyútermelés egy holokrin szekréciós folyamat végeredménye, az *in vivo* faggyútermelés szempontjából a szebociták proliferációja még az egyes sejtek individuális lipidtermelésénél is fontosabb meghatározója az *acne*hoz vezető kórosan fokozott faggyútermelés kialakulásának (Thody és Shuster, 1989; Melnik és Zouboulis, 2013).

Kemény, 2011). A CBD-ról pedig (csakúgy mint számos egyéb FK-ról) a közelmúltban bebizonyosodott, hogy jelentős anti-bakteriális hatással bír (Appedino és mtsai., 2008). Bár a CBD esetleges *P. acnes* ellenes hatékonyságát ez ideig még senki sem vizsgálta, ezen adatok alapján felmerül, hogy az egyébként is valószínűsíthető indirekt (pl. LL-37 katelicidin up-reguláció által mediált; **6. táblázat** és **26. ábra**) hatásait direkt anti-bakteriális aktivitás is kiegészítheti. Ismert az is, hogy a CBD gátolja a hiperproliferatív keratinociták osztódását (Wilkinson és Williamson, 2007) és differenciációját (Pucci és mtsai., 2013). Ennek, valamint az *acnerea* jellemző kóros lipidom kvalitatív normalizálásának (**9. ábra**) és a gyulladásos citokin-termelés csökkentésének (**13. ábra**) pedig a *comedo* képződésre lehet jótékony hatása, aminek eredményeként elméletileg már a betegség valamennyi patogenetikai lépését lefedő, globális *anti-acne* aktivitás alakulhat ki.

A kedvező *anti-acne* hatások fenomenológiai karakterizálása után azok mechanizmusának részletekbe menő vizsgálatára igyekeztünk sort keríteni. Számításba véve a CBD ismert célmolekuláinak a 3.2.3. *alfejezet*ben már részletesen tárgyalt sokszínűségét, ez meglehetősen komplex vállalkozásnak ígérkezett, azonban a fentebb már említett korábbi eredményeink (ti., hogy a TRPV1 aktivációja a CBD esetében látotthoz hasonló liposztatikus hatások kialakulásához vezet; Tóth és mtsai., 2009), arra engedtek következtetni, hogy esetünkben is ionotróp kannabinoid receptorok aktiválódása állhat a hatások hátterében.

Az ezen hipotézis tesztelésére teljes sejtes elrendezésben elvégzett patch-clamp kísérleteink (melyek során az irodalomban elsőként vizsgáltuk a humán szebocitákat elektrofiziológiai szempontból) eredményei megerősíteni látszottak ezt a feltételezésünket (**15. ábra**). Ezt követően farmakológiai és molekuláris biológiai módszerek széles tárházát felvonultatva igazoltuk, hogy a CBD liposztatikus és anti-proliferatív aktivitása a TRPV4 ioncsatorna aktivációjához és a következményes Ca^{2+} -beáramláshoz kötődik, míg a gyulladásgátló hatás ettől függetlenül alakul ki (**19., 22., 23. és 24. ábra**).

Ezen a ponton érdemes megjegyezni, hogy a lipidszintézis Ca^{2+} -jelátviteli általi negatív regulációja nem példanélküli az irodalomban, ugyanis nemcsak szebocitákon (Tóth és mtsai., 2009), hanem zsírs sejteken is leírtak már hasonlót (Shi és mtsai., 2000; Zhang és mtsai., 2007). Adataink ráadásul összhangban állnak a De Petrocellis és munkatársai által közölt eredményekkel, melyek szerint a CBD hatékony, de a „klasszikus” agonistákhoz és más FK-okhoz (pl. (-)- Δ^9 -tetrahidrokannabivarin [THCV]) képest kis hatáserősségű aktivátora a TRPV4-nek (De Petrocellis és mtsai., 2012). Nem publikált, valamint jelenleg bírálati szakban lévő eredményeink alapján ugyanis a THCV az 1-10 μM -os koncentrációtartományban a CBD-hoz nagyon hasonló szebosztatikus hatásokat vált ki, 10 μM -ban azonban már csökkenti a bazális faggyúlipid-termelést is (Oláh és mtsai., publikáció revízió alatt), és az azonos koncentrációban adagolt CBD alkalmazásakor jellemzőnél nagyobb Ca^{2+} -jelet vált ki (nem publikált megfigyelés).

Tekintettel arra, hogy több intracelluláris jelátviteli útvonal vizsgálata is eredménytelenül zárult (**25. ábra**), a „down-stream” jelátviteli pontosabb tisztázására három független kontroll és CBD-kezelt (10 μM ; 24 óra) szebocita mintapárt teljes genom microarray vizsgálatnak vetettünk alá. Az elvégzett GSEA és BiNGO analízisek a 6.1.12. alfejezetben részletesen tárgyaltaknak megfelelően megerősítették a CBD komplex *anti-acne* hatásairól eddig kapott eredményeinket⁴⁶, valamint fényt derítettek 80 down- és 72 up-regulálódó CBD-célgénre is, melyek közül az irodalmi adatok alapján legérdekesebbnek tűnőket a **6. táblázat** foglalja össze. Az ezek közül Q-PCR megerősítésre kiválasztott gének validálása addigi eredményeinkkel teljes összhangban azt mutatta, hogy a lipidszintézishez (*NR1P1* és *ARHGAP9*), valamint proliferációhoz (*Ki67*) köthető gének TRPV4-függő, míg az

⁴⁶ Amint arról már szó esett, ezek az eredmények a disszertáció alapját képező publikáció *on-line* kiegészítő adatai között a *The Journal of Clinical Investigation* honlapján szabadon hozzáférhetőek (<http://www.jci.org/articles/view/64628#sd>). A CBD *anti-acne* hatásainak szerteágazóságát remekül példázza, hogy a csökkenő kifejeződést mutató gének vizsgálatakor egyebek mellett olyan, az *acne* patogenezisében alapvető fontosságú jelátviteli útvonalak is azonosításra kerültek, mint az IGF-1 vagy az mTOR-útvonal (Melnik és Schmitz, 2013; Monfrecola és mtsai., 2015).

„immun” gének (*TRIB3*, *LL-37 katelicidin*) TRPV4-független módon regulálódtak (**26. ábra**). Az ERK-jelpálya endogén inhibitorának, az *ARHGAP9*-nek (Ang és mtsai., 2007) az up-regulálódása ráadásul arra utalt, hogy a pro-lipogén MAPK-kaszád (Dobrosi és mtsai., 2008) gátlása hozzájárulhat a CBD liposztatikus hatásának a kialakulásához. Tekintettel arra, hogy a CBD a fentebb bemutatott adatokkal teljes összhangban TRPV4-függő módon képes volt kivédeni az AEA által kiváltott pro-lipogén ERK1/2 MAPK foszforilációt⁴⁷ (**27. ábra**), eredményeink ismét aláhúzták a TRPV4 központi jelentőségét a CBD liposztatikus jelátvitelének elindításában.

A MAPK-kaszád vizsgálata mellett a CBD által TRPV4-függő módon down-regulált, a zsírsejtek triglicerid raktározásának szabályozásában fontos pozitív regulátor NRIP1 (Leonardsson és mtsai., 2004) szelektív géncsendesítését is elvégeztük (**28. ábra**). Megállapítottuk, hogy a CBD hatását „utánzó” NRIP1 „knock down” szignifikánsan csökkentette az AA által kiváltott lipogén választ (**28. ábra**), megerősítve ezzel az NRIP1 down-reguláció szerepét a CBD liposztatikus hatásainak kialakításában⁴⁸.

A TRPV4-mediált szebosztatikus aktivitás molekuláris hátterének részletekbe menő vizsgálata után a gyulladásgátló hatások jelátvitelét vettük górcső alá. A microarray adatok alapos elemzése az NF- κ B-útvonal endogén inhibitora, a *TRIB3* (Wu és mtsai., 2003) a lehetséges szerepére világított rá (**6. táblázat; 26. ábra**). Ezt a feltételezést a *TRIB3* számos ismert célgénjének („*activating transcription factor 4*”, *aszparagin szintetáz*, „*cation transport regulator-like 1*” és „*DNS-károsodás-indukált transzkript 3*”; Mungrue és mtsai., 2009; Juknat és mtsai., 2013) az up-regulációja is megerősítette, ezért megvizsgáltuk a *TRIB3* esetleges részvételét a CBD gyulladásgátló hatásainak közvetítésében. Megállapítottuk, hogy

⁴⁷ Bár végül nem került be a publikáció végleges változatába, a szintetikus TRPV4 agonista GSK alkalmazásával is végeztünk kísérleteket, és előzetes eredményeink azt mutatták, hogy a CBD-hoz hasonlóan képes volt kivédeni az ERK1/2 MAPK kaszád AEA általi aktivációját (nem publikált megfigyelés).

⁴⁸ A legújabb eredmények fényében úgy tűnik, hogy az NRIP1 down-regulációja egyszersmind anti-proliferatív hatású is lehet (Aziz és mtsai., 2015), azaz lehetséges, hogy nem „csak” a lipidszintézis, hanem a proliferáció csökkenésében is szerepet játszott.

a TRIB3 szelektív gécnsendesítése (**29. ábra**) kivédte a CBD LPS-sel szemben mutatott gyulladásgátló hatását (**30/A ábra**), és bár irodalmi adatok alapján felmerült⁴⁹, fentebb bemutatott eredményeinkkel (**26. ábra**) összhangban, nem befolyásolta annak liposztatikus aktivitását (**30/B ábra**).

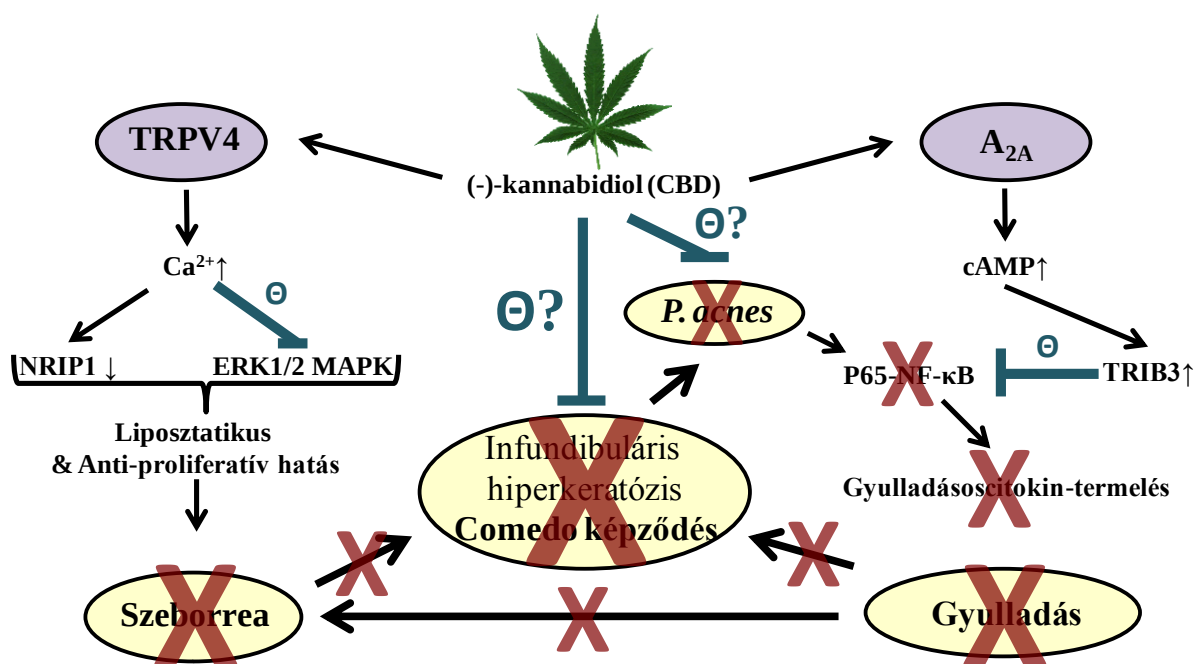
Ezen a ponton érdemes megjegyezni, hogy a TRIB3-at a közelmúltban rajtunk kívül egymástól függetlenül két további munkacsoport is CBD-célgénként azonosította (Salazar és mtsai., 2009; Juknat és mtsai., 2013; Salazar és mtsai., 2013). Ezek az eredmények az általunk jelen dolgozat keretében prezentáltakkal együtt egyértelműen arra utalnak, hogy ez a gén fontos celluláris effektora a FK-oknak, így a későbbiekben vizsgálatát mindenképpen érdemes lesz „rutinszerűen” megejteni az ezen molekulák hatásaiért felelős jelpályák tanulmányozásakor.

Tekintettel arra, hogy a már említettek szerint a TRIB3 gyulladásgátló hatását az irodalmi adatok alapján az NF- κ B-útvonal gátlása révén fejti ki (Wu és mtsai., 2003), a CBD-ról pedig ismert, hogy képes ezzel a jelpályával interferálva anti-inflammatórikus hatások kialakítására (Kozela és mtsai., 2010), következő lépésként azt vizsgáltuk meg, hogy a CBD miként befolyásolja az LPS hatására kialakuló NF- κ B-aktivációt. Megállapítottuk, hogy a CBD - a korábbiakkal (**24. és 26. ábra**) összhangban ismét csak TRPV4 független módon - kivédte az LPS P65-NF- κ B-útvonalat aktiváló hatását (**31. ábra**), azaz megállapítható, hogy a CBD gyulladásgátló hatásának „végső effektora” a P65-NF- κ B-útvonal (véltetőleg TRIB3-mediált) gátlása volt.

Végezetül a TRIB3 up-regulációt kiváltó „up-stream” folyamatok azonosítására tettünk kísérletet. Kimutattuk, hogy a CBD-kezelés jelentősen fokozta az intracelluláris cAMP szintet, ami irodalmi adatok alapján a TRIB3-jelátvitel egyik lehetséges aktivátora (Zou és mtsai., 2011; **32/A ábra**). Ezen eredmények arra utaltak, hogy a gyulladásgátló hatások

⁴⁹ Irodalmi adatok alapján a TRIB3 a PPAR γ transzkripciós aktivitásának gátlásával csökkenti a zsírsejtek differenciálódását (Takahashi és mtsai., 2008).

hátterében egy G_s-fehérjéhez kapcsolt 7-TM receptor aktiválódása állhatott. Az irodalmi adatok áttekintésekor mindössze egyetlen G_s-kapcsoltat (Ijzerman és mtsai., 2013) találtunk a CBD ismert célmolekulái között, az A_{2A} adenosin receptort. Mivel erről már kimutatták, hogy közvetítheti a CBD gyulladásgátló hatásait (Ribeiro és mtsai., 2012), ezen a ponton igen valószínűvé vált, hogy a gyulladásgátló hatások hátterében ennek a receptornak az aktivációja állhat. Elméletünk tesztelése során kimutattuk, hogy az A_{2A} receptor valóban expresszálódik mind mRNS, mind pedig fehérje szinten a humán szebocitákban (32/B-D ábra), szelektív antagonistája pedig kivédte nemcsak a CBD-mediált *TRIB3* up-regulációt, de a gyulladásgátló hatást és a P65-NF-κB-útvonal CBD általi gátlását is (33. ábra). Mindez tehát azt jelenti, hogy a CBD anti-inflammatorikus hatását humán szebocitákon minden valószínűség szerint a P65-NF-κB-útvonal *TRIB3*-mediált gátlása okozza, amelyet a CBD az A_{2A} receptor direkt vagy indirekt aktiválása⁵⁰ révén vált ki (41. ábra).



41. ábra A CBD jelen tanulmányban leírt (szélek), illetve irodalmi adatok (középen; Wilkinson és Williamson, 2007; Appendino és mtsai., 2008; Pucci és mtsai., 2013) alapján feltételezhető anti-acne hatásainak áttekintése

⁵⁰ Egyes irodalmi adatok alapján nem zárható ki, hogy a CBD nem közvetlenül a receptorhoz kapcsolódva, hanem az ekvilibratív nukleozid transzporter 1 (ENT1) gátlásával és az adenosin „tónus” fokozásával másodlagosan aktiválja az A_{2A}-t (Carrier és mtsai., 2006; Liou és mtsai., 2008).

Összességében adataink egy potenciálisan igen hatékony *anti-acne* szerként láttatják a CBD-t, ami több, egymástól független útvonalon egyidejűleg hatva, valódi „többcélpontú polifarmakon”-ként⁵¹ elméletileg egyszerre lehet képes az *acne* patogenezisében lényeges valamennyi kulcsmozzanat kedvező befolyásolására (**41. ábra**). Az a tény, hogy a CBD biztonságosságát már számos tanulmány, illetve a klinikai gyakorlat is igazolta (Pertwee, 2006; Zuairi és mtsai., 2006a és b), különösen annak fényében teszi vonzóvá ezt a molekulát, ha tekintetbe vesszük a jelenleg elérhető legsokoldalúbb *anti-acne* szer, az izotretinoin jelentős potenciális mellékhatásprofilját (Ellis és Krach, 2001; Kurokawa és mtsai., 2009; Rigopoulos és mtsai., 2010). Mindezen irodalmi adatok a most prezentált eredményekkel együtt egy költséghatékony és vélhetőleg jól tolerálható, ám mégis rendkívül hatékony CBD-alapú *acne* terápia lehetőségére mutatnak rá.

Sajnálatos módon a CBD farmakokinetikája az emberi testben nem minden részletében ismert, így nem tudható biztosan az sem, hogy a szisztémásan alkalmazott CBD mekkora hányada jut el a bőrbe; az azonban bizonyos, hogy marihuánafogyasztást követően egyes FK-ok mind a hajszálakban, mind a faggyúban kimutathatóak (Kintz és mtsai., 1995; Skopp és mtsai., 2007; Moosmann és mtsai., 2015). Bár a szájnyalakhártya spray-ként adagolt Sativex® esetén a CBD plazmakoncentrációi elmaradnak a jelen tanulmányban hatékonynak talált alacsony mikromoláris koncentrációtartománytól (Karschner és mtsai., 2011), a CBD-hoz hasonlóan rendkívül lipofil anyagok esetében nem kizárt a plazmakoncentrációk többszörösének elérése sem a megfelelően lipidgazdag szövetekben. Mindezek alapján joggal remélhető, hogy az erősen lipofil CBD a zsírokban gazdag FM-ekben relatíve magas, terápiás szempontból is releváns koncentrációt érjen el akár szisztémás alkalmazást követően is.

⁵¹ Napjainkban egyre inkább terjed az ún. „polifarmakológiai” gyógyszerfejlesztési szemlélet, azaz a korábban jellemző „egy szer egy célpont” stratégiával szemben előtérbe kerül a betegségekre karakterisztikus molekulárispatológiai „ujjlenyomatot” önmagukban is minél teljesebben lefedő, többcélpontú hatóanyagok fejlesztése (Bolognesi, 2013; Reddy és Zhang, 2013; Cumming és mtsai., 2014; Rosini, 2014). A korábbiakban már említett farmakológiai promiskuitást, valamint a jelen tanulmány keretében feltárt több, egymást kiegészítő támadásponton nyugvó, komplex *acne* ellenes hatást figyelembe véve a CBD ennek az új irányzatnak egy igen sikeres képviselője lehet a jövőben.

Másfelől azonban a szisztémás alkalmazásnál sokkal ígéretesebbnek tűnik a topikális beviteli mód. Ez már csak azért is igen izgalmas lehetőségnek ígérkezik, mert ebben az esetben a CBD nagyfokú lipofilitása miatt más hasonló karakterű anyagokhoz (pl. szteroid hormonok [Hueber és mtsai., 1992], egyes fényérzékenyítők [Togsverd-Bo és mtsai., 2012], ciklopirox oleamin [Starova és Aly, 2005] stb.) hasonlóan elsődlegesen⁵² a transzfollikuláris úton penetrál a bőr mélyebb rétegei felé, és így jó eséllyel éppen a megcélolni kívánt FM-ekben halmozódik fel (Lodzki és mtsai., 2003). Ez pedig állatkísérletes modellek alapján egy rendkívül célzott beviteli mód lehetne a FM-ek kezelésére (Lodzki és mtsai., 2003; Tubaro és mtsai., 2010).

Bár a „tisztá” CBD szeborrea, illetve *acne* ellenes hatékonyságát eleddig senki sem vizsgálta megfelelően kontrollált klinikai kísérletekben, egy közelmúltban megjelent cikk mégis a CBD klinikai hatásosságára enged következtetni. Ebben a közleményben a pakisztáni szerzőpáros egy 12 hetes, egyesvak, placebo-kontrollált klinikai kísérletről számol be, amelyben 3%-os kendermag-kivonatot, illetve placebot tartalmazó krémmel kezelték szeborreás betegek egyik és másik arcfelét („osztott arc” vizsgálat), ahol a *Cannabis*-kivonat szignifikánsan csökkentette a faggyútermelést és a bőrpírt a vivőanyaggal kezelt arcfélhez képest (Ali és Akhtar, 2015)⁵³.

Összegezve, fentebb tárgyalt eredményeink alapján a CBD (különösen a hozzáférhető irodalmi adatok fényében) rendkívül ígéretes, hatékony és kedvező mellékhatásprofilú *anti-acne* szer lehet, így mindenképpen indokoltnak tűnik mihamarabb megfelelően kontrollált klinikai tanulmányokban megvizsgálni, hogy *in vivo* valóban olyan hatékony-e, amilyenek eredményeink és az irodalmi adatok alapján ígérkezik. A kísérleteink során feltárt, ezt

⁵² Speciális formulációkkal természetesen szisztémás hatékonyság is elérhetőnek tűnik (Giacoppo és mtsai., 2015; Hammell és mtsai., 2015), azonban esetünkben ez nyilvánvalóan nem cél.

⁵³ Érdekes módon a szakirodalom mellett különböző blogokon számos, részben az általunk közölt publikáció által inspirált CBD-lal, illetve különböző tisztaságú kender-kivonatokkal végzett „önkísérletről” szóló beszámolót lehet olvasni, melyek egy részében a CBD kimondottan hatékony *anti-acne* szernek bizonyult (pl. <http://www.acne.org/messageboard/topic/345356-does-cbd-cannabidiol-really-reduces-sebum-secretion/>).

megelőzően teljesen ismeretlen szebosztatikus ($\text{TRPV4} \rightarrow \text{Ca}^{2+} \uparrow \rightarrow \text{ERK1/2} \downarrow \text{ MAPK} \downarrow$ és $\text{NRIP1} \downarrow$), valamint gyulladásgátló ($\text{A}_{2\text{A}} \rightarrow \text{cAMP} \uparrow \rightarrow \text{TRIB3} \uparrow \rightarrow \text{P65-NF-}\kappa\text{B} \downarrow$) jelátviteli útvonalak (41. ábra) pedig további, célzott, nagy hatékonyságú és kedvező mellékhatásprofilú *anti-acne* szerek fejlesztése előtt nyithatnak kaput.

7.3. Záró gondolatok

A fentiekben arra tettünk kísérletet, hogy jobban megértsük a bőr (kór)élettanának egy eleddig kevésbé kutatott szegmensét, és egy lépéssel közelebb kerüljünk a „*k(ut)annabinoid*” szignalizációban rejlő terápiás potenciál azonosításához és kiaknázásához. Figyelembe véve az ECS és a FK-ok *Irodalmi áttekintés*ben részletesen számba vett, szinte már szédítő sokszínűségét, bizvást állítható, hogy még csak a kezdetén járunk az útnak, mindazonáltal Grga Pitić örökbecsű szavaival élve:

*„I think this is the beginning
of a beautiful friendship.”
Emir Kusturica: Macska-jaj*

8. Összefoglalás

Jelen kísérleteink során egy nem-pszichotróp fitokannabinoid, a (-)-kannabidiol (CBD), valamint egy, a gyulladásgátló endokannabinoid tónus (eCB-tónus) szabályozásában kulcsfontosságú enzim, a zsírsavamid-hidroláz (FAAH) biológiai szerepét vizsgáltuk meg humán szebocitákon, epidermális keratinocitákon és NC/Tnd egereken.

Megállapítottuk, hogy a FAAH fehérje szintű expressziója és aktivitása fokozódik Toll-like receptor (TLR)-2 aktivációra mind immortalizált, mind pedig primer humán epidermális keratinociták esetén, így a gyulladásgátló eCB-tónus FAAH által mediált csökkentése elméletileg hozzájárulhat a TLR2-mediált gyulladásos folyamatok kialakulásához. FAAH-inhibitorok segítségével igazoltuk továbbá, hogy a következményesen kialakuló fokozott eCB-tónus jelentős CB₁ és CB₂ receptor-mediált anti-inflammatorikus hatással bír *in vitro* humán keratinocitákon és *in vivo* NC/Tnd egereken is. Ezek alapján felvetődik a FAAH-inhibitorok terápiás alkalmazásának lehetősége a bőr különböző gyulladásos folyamatainak jövőbeli kezelésében.

CBD-lal végzett kísérleteink során kimutattuk, hogy ez a neurológiai klinikai gyakorlatban már régebb óta mellékhatásmentesen alkalmazott szer jelentős, komplex *anti-acne* aktivitást mutat (kombinált liposztatikus, anti-proliferatív és gyulladásgátló hatások), melyek háttérében általunk újonnan azonosított szebosztatikus (TRPV4→Ca²⁺↑→NRIP1↓ és ERK1/2 MAPK↓), valamint gyulladásgátló (A_{2A}→cAMP↑→TRIB3↑→P65-NF-κB↓) útvonalak aktiválása állt.

Míthogy irodalmi adatok alapján a CBD jó eséllyel az *acne* patogenezisében fontos további elemekre (comedo képződés, *P. acnes* kolonizáció) is kedvező hatást gyakorolhat, eredményeink felvetik a CBD jövőbeli terápiás felhasználásának lehetőségét az *acne* kezelésében.

9. Summary

In the current study we aimed at investigating the effects of a non-psychotropic phytocannabinoid, (-)-cannabidiol (CBD) on human sebocytes, and the fatty acid amide hydrolase (FAAH) enzyme, a key negative regulator of the anti-inflammatory endocannabinoid tone (eCB-tone) on epidermal keratinocytes as well as on NC/Tnd mice.

We found that protein expression and activity of FAAH was increased by Toll-like receptor (TLR)-2 activation both in immortalized and primary human epidermal keratinocytes, indicating that FAAH-mediated decrease of the anti-inflammatory eCB-tone might theoretically contribute to the development of TLR2-induced inflammatory processes. By using various FAAH-inhibitors, we furthermore demonstrated that the consequently increasing eCB-tone exerts substantial anti-inflammatory actions via activating CB₁ and CB₂ receptors both *in vitro* on human keratinocytes and *in vivo* on NC/Tnd mice. Taken together, these results indicate that FAAH-inhibitors may become powerful tools in the treatment of various cutaneous inflammatory disorders.

By administering CBD (a substance in use in neurological clinical practice without any significant side-effects for many years) we could demonstrate that it exerted complex *anti-acne* activity (combined lipostatic, anti-proliferative and anti-inflammatory actions), which were mediated via novel sebostatic (TRPV4 → Ca²⁺↑ → NR1H1↓ and ERK1/2 MAPK↓) and anti-inflammatory (A_{2A} → cAMP↑ → TRIM31↑ → P65-NF-κB↓) pathways.

Since according to data in the literature CBD is very likely to exert beneficial effects against other relevant pathogenetic steps of *acne* as well (comedogenesis, colonization of *P. acnes*), our results raised the possibility that CBD may be a powerful tool in the future *acne* therapy.

10. Irodalomjegyzék

„Mert mindaz... akit keres, talál.”
Lukács evangéliuma 11,10.

- Abood, M.E., Sorensen, R.G. and Stella, N. (2013). endoCANNABINOIDS – Actions at non-CB1/CB2 cannabinoid receptors. Springer-Verlag New York DOI: 10.1007/978-1-4614-4669-9.
- Akhmetshina, A., Dees, C., Busch, N., Beer, J., Sarter, K., Zwerina, J., Zimmer, A., Distler, O., Schett, G., and Distler, J.H.W. (2009). The cannabinoid receptor CB2 exerts antifibrotic effects in experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum.* 60, 1129–1136.
- Akopian, A.N., Ruparel, N.B., Jeske, N.A., Patwardhan, A., and Hargreaves, K.M. (2009). Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 79–84.
- Aleas, T., Ganceviciene, R., Fimmel, S., Müller-Decker, K., and Zouboulis, C.C. (2006). Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B4 and prostaglandin E2 are active in sebaceous glands. *J. Mol. Med.* 84, 75–87.
- Ali, A., and Akhtar, N. (2015). The safety and efficacy of 3% Cannabis seeds extract cream for reduction of human cheek skin sebum and erythema content. *Pak J Pharm Sci* 28, 1389–1395.
- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.* 58, 315–348.
- Ang, B.K., Lim, C.Y., Koh, S.S., Sivakumar, N., Taib, S., Lim, K.B., Ahmed, S., Rajagopal, G., and Ong, S.H. (2007). ArhGAP9, a novel MAP kinase docking protein, inhibits Erk and p38 activation through WW domain binding. *J Mol Signal* 2, 1.
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., Smith, E., and Rahman, M.M. (2008). Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *J. Nat. Prod.* 71, 1427–1430.
- Aziz, M.H., Chen, X., Zhang, Q., DeFrain, C., Osland, J., Luo, Y., Shi, X., and Yuan, R. (2015). Suppressing NR1H1 inhibits growth of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Oncotarget*.
- Bardan, A., Nizet, V., and Gallo, R.L. (2004). Antimicrobial peptides and the skin. *Expert Opin Biol Ther* 4, 543–549.
- Bauer, M., Chicca, A., Tamborini, M., Eisen, D., Lerner, R., Lutz, B., Poetz, O., Pluschke, G., and Gertsch, J. (2012). Identification and quantification of a new family of peptide endocannabinoids (Pepcans) showing negative allosteric modulation at CB1 receptors. *J. Biol. Chem.* 287, 36944–36967.
- Beinke, S., Ley, S.C. (2004). Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem. J.* 382, 393–409.
- Béke, G., Kapitány, A., Dajnoki, Zs., Hajdu, K., Gáspár, K., Bíró, T., and Szegedi, A. (2015). A bőr immunrendszerének felépítése és működése. 7(2), 4–11.
- Bénard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenço, J., Bellocchio, L., Soria-Gómez, E., Matias, I., Delamarre, A., Metna-Laurent, M., Cannich, A., et al. (2012). Mitochondrial CB₁ receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat. Neurosci.* 15, 558–564.
- Benfenati, A., Brilli, F. (1939). Sulla distribuzione delle ghiandole sebacee nella cute del corpo umano. *Archivo Italiano di Dermatologia* 15, 33–42.

- Bieber, T. (2008). Atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 358, 1483–1494.
- Bíró, T., Tóth, B.I., Haskó, G., Paus, R., and Pacher, P. (2009). The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 411–420.
- Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I., Moriello, A.S., Davis, J.B., Mechoulam, R., and Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br. J. Pharmacol.* 134, 845–852.
- Bitencourt, R.M., Pamplona, F.A., and Takahashi, R.N. (2008). Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 18, 849–859.
- Bodó, E., Bíró, T., Telek, A., Czifra, G., Griger, Z., Tóth, B.I., Mescalchin, A., Ito, T., Bettermann, A., Kovács, L., et al. (2005). A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am. J. Pathol.* 166, 985–998.
- Boguniewicz, M., and Leung, D.Y.M. (2011). Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol. Rev.* 242, 233–246.
- Bolognesi, M.L. (2013). Polypharmacology in a single drug: multitarget drugs. *Curr. Med. Chem.* 20, 1639–1645.
- Booz, G.W. (2011). Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1054–1061.
- Borbíró, I., Lisztes, E., Tóth, B.I., Czifra, G., Oláh, A., Szöllosi, A.G., Szentandrassy, N., Nánási, P.P., Péter, Z., Paus, R., et al. (2011). Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1605–1614.
- Bos, J.D., and Kapsenberg, M.L. (1993). The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol. Today* 14, 75–78.
- Bovell, D.L., Santic, R., Kofler, B., Hermann, A., Wilson, D., Corbett, A., and Lang, R. (2008). Activation of chloride secretion via proteinase-activated receptor 2 in a human eccrine sweat gland cell line--NCL-SG3. *Exp. Dermatol.* 17, 505–511.
- Braff, M.H., and Gallo, R.L. (2006). Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 306, 91–110.
- Bukowsky, L.F. (2010). Skin anatomy and physiology research development. 1st edn. NOVA Biomedical Publications, Hauppauge.
- Burstein, S. (2015). Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 1377–1385.
- Butrica, J.L. (2002). The Medical Use of Cannabis Among the Greeks and Romans. *Journal of Cannabis Therapeutics* 2(2), 51.
- Camera, E., Ludovici, M., Galante, M., Sinagra, J.-L., and Picardo, M. (2010). Comprehensive analysis of the major lipid classes in sebum by rapid resolution high-performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 51, 3377–3388.

- Carrier, E.J., Auchampach, J.A., and Hillard, C.J. (2006). Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7895–7900.
- Caterina, M.J. (2014). TRP channel cannabinoid receptors in skin sensation, homeostasis, and inflammation. *ACS Chem Neurosci* 5, 1107–1116.
- Chicca, A., Marazzi, J., Nicolussi, S., and Gertsch, J. (2012). Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *J. Biol. Chem.* 287, 34660–34682.
- Clapham, D.E. (2009). Transient Receptor Potential (TRP) channels. In: Squire, L.R. (szerk.) *Encyclopedia of Neuroscience* Volume 9. Oxford, UK: Oxford Academic Press 1109–1133.
- Clapham, D.E., DeCaen, P., Carvacho, I., Chaudhuri, D., Doerner, J.F., Julius, D., Kahle, K.T., McKemy, D., Oancea, E., Sah, R., Stotz, S. C., Tong, D., Wu, L.J., Xu, H., Nilius, B., Owsianik, G. (2015). Transient Receptor Potential channels. Letöltve: 2015. november 13-án; IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY, <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=78>.
- Cumming, J.G., Finlay, M.R.V., Giordanetto, F., Hemmerling, M., Lister, T., Sanganee, H., and Waring, M.J. (2014). Potential strategies for increasing drug-discovery productivity. *Future Med Chem* 6, 515–527.
- Czifra, G., Szöllösi, A.G., Tóth, B.I., Demaude, J., Bouez, C., Breton, L., and Bíró, T. (2012). Endocannabinoids regulate growth and survival of human eccrine sweat gland-derived epithelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1967–1976.
- Csaba, Zs. és Nemeskéri, Á. (2002). Bőr és bőrfüggelékek. In: Rölich P. (szerk.) *Szövektan* Budapest: Semmelweis Egyetem Képzéskutató, Oktatástechnológiai és Dokumentációs Központ. 2(2), 368–392.
- De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A.S., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C.G., and Di Marzo, V. (2011). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1479–1494.
- De Petrocellis, L., Orlando, P., Moriello, A.S., Aviello, G., Stott, C., Izzo, A.A., and Di Marzo, V. (2012). Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiol (Oxf)* 204, 255–266.
- De Petrocellis, L., Vellani, V., Schiano-Moriello, A., Marini, P., Magherini, P.C., Orlando, P., and Di Marzo, V. (2008). Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325, 1007–1015.
- Demuth, D.G., and Molleman, A. (2006). Cannabinoid signalling. *Life Sci.* 78, 549–563.
- Dessinioti, C. (2014). Acne pathogenesis: What we learned over the years. In: Zouboulis C. C., Katsambas A. D. és Kligman A. M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 62–67. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Dessinioti, C., and Zouboulis, C.C. (2014). Hormonal therapy for acne. In: Zouboulis C. C., Katsambas A. D. és Kligman A. M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 477–482. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>

- Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S. és Howlett A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 34(5), 605-613.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., and Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946–1949.
- Di Marzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 7, 438–455.
- Dobrosi, N., Tóth, B.I., Nagy, G., Dózsa, A., Géczy, T., Nagy, L., Zouboulis, C.C., Paus, R., Kovács, L., and Bíró, T. (2008). Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J.* 22, 3685–3695.
- Draelos, Z. and Pugliese, P.T. (2011). *Physiology of the skin*. 3rd edn. Allured Business Media, Carol Stream.
- Edgar, R., Domrachev, M., and Lash, A.E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 30, 207–210.
- Elias, P.M. (2008). Skin barrier function. *Curr Allergy Asthma Rep* 8, 299–305.
- Elias, P.M. and Feingold, K.R. (2006). *Skin barrier*. Taylor & Francis, New York.
- Ellis, C.N., and Krach, K.J. (2001). Uses and complications of isotretinoin therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45, S150–S157.
- Elphick, M.R., and Egertová, M. (2005). The phylogenetic distribution and evolutionary origins of endocannabinoid signalling. *Handb Exp Pharmacol* 283–297.
- ElSohly, M.A., and Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* 78, 539–548.
- Fellermeier, M., Eisenreich, W., Bacher, A., and Zenk, M.H. (2001). Biosynthesis of cannabinoids. Incorporation experiments with (13)C-labeled glucoses. *Eur. J. Biochem.* 268, 1596–1604.
- Fišar, Z. (2009). Phytocannabinoids and endocannabinoids. *Curr Drug Abuse Rev* 2, 51–75.
- Gaffal, E., Cron, M., Glodde, N., and Tüting, T. (2013a). Anti-inflammatory activity of topical THC in DNFB-mediated mouse allergic contact dermatitis independent of CB1 and CB2 receptors. *Allergy* 68, 994–1000.
- Gaffal, E., Cron, M., Glodde, N., Bald, T., Kuner, R., Zimmer, A., Lutz, B., and Tüting, T. (2013b). Cannabinoid 1 receptors in keratinocytes modulate proinflammatory chemokine secretion and attenuate contact allergic inflammation. *J. Immunol.* 190, 4929–4936.
- Gaffal, E., Glodde, N., Jakobs, M., Bald, T., and Tüting, T. (2014). Cannabinoid 1 receptors in keratinocytes attenuate fluorescein isothiocyanate-induced mouse atopic-like dermatitis. *Exp. Dermatol.* 23, 401–406.
- Gallo, R.L., and Huttner, K.M. (1998). Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol.* 111, 739–743.
- Gallo, R.L., and Nakatsuji, T. (2011). Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1974–1980.

- Géczy, T., Oláh, A., Tóth, B.I., Czifra, G., Szöllősi, A.G., Szabó, T., Zouboulis, C.C., Paus, R., and Bíró, T. (2012). Protein kinase C isoforms have differential roles in the regulation of human sebocyte biology. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1988–1997.
- Gelmetti, C. (2014). The sebaceous gland through the centuries: A difficult path to independence. In: Zouboulis C. C., Katsambas A. D. és Kligman A. M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 3-8. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Gertsch, J., Pertwee, R.G. és Di Marzo, V. (2010). Phytocannabinoids beyond the Cannabis plant – do they exist? *Br. J. Pharmacol.* 160, 523–529.
- Giacoppo, S., Galuppo, M., Pollastro, F., Grassi, G., Bramanti, P., and Mazzon, E. (2015). A new formulation of cannabidiol in cream shows therapeutic effects in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Daru* 23, 48.
- Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309–1312.
- Guha, U., Mecklenburg, L., Cowin, P., Kan, L., O’Guin, W.M., D’Vizio, D., Pestell, R.G., Paus, R., and Kessler, J.A. (2004). Bone morphogenetic protein signaling regulates postnatal hair follicle differentiation and cycling. *Am. J. Pathol.* 165, 729–740.
- Hammell, D.C., Zhang, L.P., Ma, F., Abshire, S.M., McIlwrath, S.L., Stinchcomb, A.L., and Westlund, K.N. (2015). Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis. *Eur J Pain*.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1932–1936.
- Hinde, E., Haslam, I.S., Schneider, M.R., Langan, E.A., Kloepper, J.E., Schramm, C., Zouboulis, C.C., and Paus, R. (2013). A practical guide for the study of human and murine sebaceous glands in situ. *Exp. Dermatol.* 22, 631–637.
- Hofer, S.C., Ralvenius, W.T., Gachet, M.S., Fritschy, J.-M., Zeilhofer, H.U., and Gertsch, J. (2015). Localization and production of peptide endocannabinoids in the rodent CNS and adrenal medulla. *Neuropharmacology* 98, 78–89.
- Howell, M.D., Kim, B.E., Gao, P., Grant, A.V., Boguniewicz, M., DeBenedetto, A., Schneider, L., Beck, L.A., Barnes, K.C., and Leung, D.Y.M. (2009). Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, R7–R12.
- Howlett, A.C. és Fleming, R.M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol. Pharmacol.* 26(3), 532-538.
- Hu, Y., Ylivinkka, I., Chen, P., Li, L., Hautaniemi, S., Nyman, T.A., Keski-Oja, J., and Hyytiäinen, M. (2012). Netrin-4 promotes glioblastoma cell proliferation through integrin $\beta 4$ signaling. *Neoplasia* 14, 219–227.
- Hudson, B.D., Hébert, T.E., and Kelly, M.E.M. (2010). Ligand- and heterodimer-directed signaling of the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol. Pharmacol.* 77, 1–9.
- Hueber, F., Wepierre, J., and Schaefer, H. (1992). Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of hydrocortisone and testosterone: in vivo study in the hairless rat. *Skin Pharmacol.* 5, 99–107.

- Ijzerman, A.P., Fredholm, B.B., Jacobson, K.A., és mtsai. (2013) Adenosine receptors: A2A receptor. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=19>. Accessed on November 11, 2013.
- Jensen, J.M., and Proksch, E. (2009). The skin's barrier. *G Ital Dermatol Venereol* 144, 689–700.
- Juknat, A., Pietr, M., Kozela, E., Rimmerman, N., Levy, R., Gao, F., Coppola, G., Geschwind, D., and Vogel, Z. (2013). Microarray and pathway analysis reveal distinct mechanisms underlying cannabinoid-mediated modulation of LPS-induced activation of BV-2 microglial cells. *PLoS ONE* 8, e61462.
- Juknat, A., Rimmerman, N., Levy, R., Vogel, Z., and Kozela, E. (2012). Cannabidiol affects the expression of genes involved in zinc homeostasis in BV-2 microglial cells. *Neurochem. Int.* 61, 923–930.
- Jung, K., Tanaka, A., Fujita, H., Matsuda, A., Oida, K., Karasawa, K., Okamoto, N., Ohmori, K., Jee, Y., Shin, T., et al. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated suppression of dendritic cell function prevents the onset of atopic dermatitis in NC/Tnd mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 420–429.e1–e6.
- Kaminski, A. (2014). Less common treatments. In: Zouboulis, C.C., Katsambas, A.D. és Kligman, A.M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 483–490. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Karsak, M., Gaffal, E., Date, R., Wang-Eckhardt, L., Rehnelt, J., Petrosino, S., Starowicz, K., Steuder, R., Schlicker, E., Cravatt, B., et al. (2007). Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science* 316, 1494–1497.
- Karschner, E.L., Darwin, W.D., Goodwin, R.S., Wright, S., and Huestis, M.A. (2011). Plasma cannabinoid pharmacokinetics following controlled oral delta9-tetrahydrocannabinol and oromucosal cannabis extract administration. *Clin. Chem.* 57, 66–75.
- Kathmann, M., Flau, K., Redmer, A., Tränkle, C., and Schlicker, E. (2006). Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 372, 354–361.
- Katsambas, A.D., and Dessinioti, C. (2014). The difficult acne patient. In: Zouboulis, C.C., Katsambas, A.D. és Kligman, A.M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 383–388. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Kim, J.M., Kosak, J.P., Kim, J.K., Kissling, G., Germolec, D.R., Zeldin, D.C., Bradbury, J.A., Baek, S.J., and Eling, T.E. (2013). NAG-1/GDF15 transgenic mouse has less white adipose tissue and a reduced inflammatory response. *Mediators Inflamm.* 2013, 641851.
- Kintz, P., Cirimele, V., and Mangin, P. (1995). Testing human hair for cannabis. II. Identification of THC-COOH by GC-MS-NCI as a unique proof. *J. Forensic Sci.* 40, 619–622.
- Kligman, A.M. (1963). The uses of sebum? In: Montagna, W., Ellis, R.A., Silver, A.F. (szerk.) *Advances in Biology of Skin*. Vol IV. The Sebaceous Glands. Oxford: Pergamon Press, 110–112.

- Kőszeghy, Á., Kovács, A., Bíró, T., Szücs, P., Vincze, J., Hegyi, Z., Antal, M., and Pál, B. (2015). Endocannabinoid signaling modulates neurons of the pedunculopontine nucleus (PPN) via astrocytes. *Brain Struct Funct* 220, 3023–3041.
- Kozela, E., Pietr, M., Juknat, A., Rimmerman, N., Levy, R., and Vogel, Z. (2010). Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. *J. Biol. Chem.* 285, 1616–1626.
- Kranich, J., Maslowski, K.M., and Mackay, C.R. (2011). Commensal flora and the regulation of inflammatory and autoimmune responses. *Semin. Immunol.* 23, 139–145.
- Kubo, A., Nagao, K., and Amagai, M. (2012). Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J. Clin. Invest.* 122, 440–447.
- Kuo, I.-H., Yoshida, T., De Benedetto, A., and Beck, L.A. (2013). The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 266–278.
- Kupczyk, P., Reich, A., and Szepietowski, J.C. (2009). Cannabinoid system in the skin - a possible target for future therapies in dermatology. *Exp. Dermatol.* 18, 669–679.
- Kupper, T.S., and Fuhlbrigge, R.C. (2004). Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 211–222.
- Kurokawa, I., Danby, F.W., Ju, Q., Wang, X., Xiang, L.F., Xia, L., Chen, W., Nagy, I., Picardo, M., Suh, D.H., et al. (2009). New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. *Exp. Dermatol.* 18, 821–832.
- Langan, E.A., Philpott, M.P., Kloepper, J.E., and Paus, R. (2015). Human hair follicle organ culture: Theory, application and perspectives. *Exp. Dermatol.*
- Laprairie, R.B., Bagher, A.M., Kelly, M.E.M., and Denovan-Wright, E.M. (2015). Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 172, 4790–4805.
- Layton, A.M. (2010). Disorders of the Sebaceous Glands. In: Burns, T., Breathnach, S., Cox, N., Griffiths, C. (szerk.) *Rook's Textbook of Dermatology*, 8th ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 42.1-42.89.
- Lazzerini, P.E., Natale, M., Giancchetti, E., Capecchi, P.L., Montilli, C., Zimbone, S., Castrichini, M., Balistreri, E., Ricci, G., Selvi, E., et al. (2012). Adenosine A2A receptor activation stimulates collagen production in sclerodermic dermal fibroblasts either directly and through a cross-talk with the cannabinoid system. *J. Mol. Med.* 90, 331–342.
- Lee, C.M., and Dessi, J. (1989). NCL-SG3: a human eccrine sweat gland cell line that retains the capacity for transepithelial ion transport. *J. Cell. Sci.* 92 (Pt 2), 241–249.
- Lee, D.-Y., Yamasaki, K., Rudstil, J., Zouboulis, C.C., Park, G.T., Yang, J.-M., and Gallo, R.L. (2008). Sebocytes express functional cathelicidin antimicrobial peptides and can act to kill propionibacterium acnes. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1863–1866.
- Leonardsson, G., Steel, J.H., Christian, M., Pocock, V., Milligan, S., Bell, J., So, P.-W., Medina-Gomez, G., Vidal-Puig, A., White, R., et al. (2004). Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8437–8442.

- Leonti, M., Casu, L., Raduner, S., Cottiglia, F., Floris, C., Altmann, K.-H., and Gertsch, J. (2010). Falcarinol is a covalent cannabinoid CB1 receptor antagonist and induces pro-allergic effects in skin. *Biochem. Pharmacol.* 79, 1815–1826.
- Liou, G.I., Auchampach, J.A., Hillard, C.J., Zhu, G., Yousufzai, B., Mian, S., Khan, S., and Khalifa, Y. (2008). Mediation of cannabidiol anti-inflammation in the retina by equilibrative nucleoside transporter and A2A adenosine receptor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 5526–5531.
- Littman, D.R., and Pamer, E.G. (2011). Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host Microbe* 10, 311–323.
- Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Huang, B.X., Kim, H.-Y., Luquet, S., Palmiter, R.D., Krystal, G., Rai, R., Mahadevan, A., és mtsai. (2008). Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* 54, 1–7.
- Lo Celso, C., Berta, M.A., Braun, K.M., Frye, M., Lyle, S., Zouboulis, C.C., and Watt, F.M. (2008). Characterization of bipotential epidermal progenitors derived from human sebaceous gland: contrasting roles of c-Myc and beta-catenin. *Stem Cells* 26, 1241–1252.
- Lodzki, M., Godin, B., Rakou, L., Mechoulam, R., Gallily, R., and Touitou, E. (2003). Cannabidiol-transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *J Control Release* 93, 377–387.
- Lu, Z., Hasse, S., Bodo, E., Rose, C., Funk, W., and Paus, R. (2007). Towards the development of a simplified long-term organ culture method for human scalp skin and its appendages under serum-free conditions. *Exp. Dermatol.* 16, 37–44.
- Maccarrone, M., Bab, I., Bíró, T., Cabral, G.A., Dey, S.K., Di Marzo, V., Konje, J.C., Kunos, G., Mechoulam, R., Pacher, P., et al. (2015). Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 277–296.
- Maccarrone, M., Bari, M., and Agrò, A.F. (1999). A sensitive and specific radiochromatographic assay of fatty acid amide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* 267, 314–318.
- Maccarrone, M., Di Rienzo, M., Battista, N., Gasperi, V., Guerrieri, P., Rossi, A., and Finazzi-Agrò, A. (2003). The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 278, 33896–33903.
- Maccarrone, M., Valensise, H., Bari, M., Lazzarin, N., Romanini, C., and Finazzi-Agrò, A. (2001). Progesterone up-regulates anandamide hydrolase in human lymphocytes: role of cytokines and implications for fertility. *J. Immunol.* 166, 7183–7189.
- Maccarrone, M., van der Stelt, M., Rossi, A., Veldink, G.A., Vliegenthart, J.F., and Agrò, A.F. (1998). Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J. Biol. Chem.* 273, 32332–32339.
- Mackie, K., Brewer, H.B., Jr., Cota, D., Cravatt, B.F., Di Marzo, V., Ginsberg, H.N., Howlett, A., Reggio, P.H., and Woods, S.C. (2008) The endocannabinoid system handbook. *Scientiae* Letölthető a <http://www.scribd.com/doc/92307900/ECSHandbook> honlapról. (2015. november 10.)
- Madison, K.C. (2003). Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 121, 231–241.

- Makrantonaki, E., and Zouboulis, C.C. (2007). Testosterone metabolism to 5 α -dihydrotestosterone and synthesis of sebaceous lipids is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor ligand linoleic acid in human sebocytes. *Br. J. Dermatol.* 156, 428–432.
- Marquart, S., Zerr, P., Akhmetshina, A., Palumbo, K., Reich, N., Tomcik, M., Horn, A., Dees, C., Engel, M., Zwerina, J., et al. (2010). Inactivation of the cannabinoid receptor CB1 prevents leukocyte infiltration and experimental fibrosis. *Arthritis Rheum.* 62, 3467–3476.
- Martin, B.R. (1986). Cellular effects of cannabinoids. *Pharmacol. Rev.* 38(1), 45–74.
- Mastrofrancesco, A., Kokot, A., Eberle, A., Gibbons, N.C.J., Schallreuter, K.U., Strozyk, E., Picardo, M., Zouboulis, C.C., Luger, T.A., and Böhm, M. (2010). KdPT, a tripeptide derivative of alpha-melanocyte-stimulating hormone, suppresses IL-1 beta-mediated cytokine expression and signaling in human sebocytes. *J. Immunol.* 185, 1903–1911.
- McPartland, J.M., Matias, I., Di Marzo, V., and Glass, M. (2006). Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene* 370, 64–74.
- Mechoulam, R. (1986). The pharmacohistory of *Cannabis sativa* Cannabinoids as Therapeutic Agents. In: Mechoulam, R. (szerk.) Boca Raton, CRC Press 1–19.
- Mechoulam, R., and Gaoni, Y. (1965a). Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron* 21, 1223–1229.
- Mechoulam, R., and Gaoni, Y. (1965b). A TOTAL SYNTHESIS OF DL-DELTA-1-TETRAHYDROCANNABINOL, THE ACTIVE CONSTITUENT OF HASHISH. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 3273–3275.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., and Compton, D.R. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50, 83–90.
- Melnik, B.C. (2014). Acne and genetics. In: Zouboulis C. C., Katsambas A. D. és Kligman A. M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 109–130. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Melnik, B.C., and Schmitz, G. (2013). Are therapeutic effects of antiacne agents mediated by activation of FoxO1 and inhibition of mTORC1? *Exp. Dermatol.* 22, 502–504.
- Melnik, B.C., and Zouboulis, C.C. (2013). Potential role of FoxO1 and mTORC1 in the pathogenesis of Western diet-induced acne. *Exp. Dermatol.* 22, 311–315.
- Minkov, M., and Bond, M.H. (2016). A Genetic Component to National Differences in Happiness. *J Happiness Stud* 1–20.
- Mirshahpanah, P., and Maibach, H.I. (2007). Models in acnegenesis. *Cutan Ocul Toxicol* 26, 195–202.
- Monfrecola, G., Lembo, S., Caiazzo, G., De Vita, V., Di Caprio, R., Balato, A., and Fabbrocini, G. (2015). Mechanistic target of rapamycin (mTOR) expression is increased in acne patients' skin". *Exp. Dermatol.*
- Montagna, W. (1963). Comparative aspects of sebaceous glands. In: Montagna, W., Ellis, R.A, Silver A.F (szerk.) *Advances in Biology of Skin*. Vol IV. The Sebaceous Glands. Oxford: Pergamon Press, 32–45.

- Moosmann, B., Roth, N., and Auwärter, V. (2015). Finding cannabinoids in hair does not prove cannabis consumption. *Sci Rep* 5, 14906.
- Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., et al. (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34, 267–273.
- Mor, M., Rivara, S., Lodola, A., Plazzi, P.V., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Piersanti, G., Kathuria, S., and Piomelli, D. (2004). Cyclohexylcarbamic acid 3'- or 4'-substituted biphenyl-3-yl esters as fatty acid amide hydrolase inhibitors: synthesis, quantitative structure-activity relationships, and molecular modeling studies. *J. Med. Chem.* 47, 4998–5008.
- Moran, M.M., McAlexander, M.A., Bíró, T., and Szallasi, A. (2011). Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 10, 601–620.
- Morgan, C.J.A., Schafer, G., Freeman, T.P., and Curran, H.V. (2010). Impact of cannabidiol on the acute memory and psychotomimetic effects of smoked cannabis: naturalistic study: naturalistic study [corrected]. *Br J Psychiatry* 197, 285–290.
- Morimoto, S., Tanaka, Y., Sasaki, K., Tanaka, H., Fukamizu, T., Shoyama, Y., Shoyama, Y., and Taura, F. (2007). Identification and characterization of cannabinoids that induce cell death through mitochondrial permeability transition in Cannabis leaf cells. *J. Biol. Chem.* 282, 20739–20751.
- Motoyoshi, K. (1983). Enhanced comedo formation in rabbit ear skin by squalene and oleic acid peroxides. *Br. J. Dermatol.* 109, 191–198.
- Mungrue, I.N., Pagnon, J., Kohannim, O., Gargalovic, P.S., and Lusa, A.J. (2009). CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. *J. Immunol.* 182, 466–476.
- Munro, S., Thomas, K.L. és Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65.
- Nagy, I., and Kemény, L. (2014). Antimicrobial peptides in acne. In: Zouboulis C. C., Katsambas A. D. és Kligman A. M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 171–178. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Nelson, A.M., Gilliland, K.L., Cong, Z., and Thiboutot, D.M. (2006). 13-cis Retinoic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in human SEB-1 sebocytes. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2178–2189.
- Nicolussi, S., Chicca, A., Rau, M., Rihs, S., Soeberdt, M., Abels, C., and Gertsch, J. (2014a). Correlating FAAH and anandamide cellular uptake inhibition using N-alkylcarbamate inhibitors: from ultrapotent to hyperpotent. *Biochem. Pharmacol.* 92, 669–689.
- Nicolussi, S., Viveros-Paredes, J.M., Gachet, M.S., Rau, M., Flores-Soto, M.E., Blunder, M., and Gertsch, J. (2014b). Guineensine is a novel inhibitor of endocannabinoid uptake showing cannabimimetic behavioral effects in BALB/c mice. *Pharmacol. Res.* 80, 52–65.
- Niyonsaba, F., Nagaoka, I., Ogawa, H., and Okumura, K. (2009). Multifunctional antimicrobial proteins and peptides: natural activators of immune systems. *Curr. Pharm. Des.* 15, 2393–2413.

- Oddi, S., Bari, M., Battista, N., Barsacchi, D., Cozzani, I., and Maccarrone, M. (2005). Confocal microscopy and biochemical analysis reveal spatial and functional separation between anandamide uptake and hydrolysis in human keratinocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 386–395.
- Oláh, A., Szöllősi, A.G., and Bíró, T. (2012). The channel physiology of the skin. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 163, 65–131.
- Ottaviani, M., Camera, E., and Picardo, M. (2010). Lipid mediators in acne. *Mediators Inflamm.* 2010.
- Owen, H.R., Elser, M., Cheung, E., Gersbach, M., Kraus, W.L., and Hottiger, M.O. (2007). MYBBP1a is a novel repressor of NF-kappaB. *J. Mol. Biol.* 366, 725–736.
- Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B., and Pasquali, R. (2006). The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr. Rev.* 27, 73–100.
- Palumbo-Zerr, K., Horn, A., Distler, A., Zerr, P., Dees, C., Beyer, C., Selvi, E., Cravatt, B.F., Distler, O., Schett, G., et al. (2012). Inactivation of fatty acid amide hydrolase exacerbates experimental fibrosis by enhanced endocannabinoid-mediated activation of CB1. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 2051–2054.
- Pappas, A. (2014). Sebum and sebaceous lipids. In: Zouboulis, C.C., Katsambas, A.D. és Kligman, A.M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 33–38.
DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Paradisi, A., Pasquariello, N., Barcaroli, D., and Maccarrone, M. (2008). Anandamide regulates keratinocyte differentiation by inducing DNA methylation in a CB1 receptor-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 283, 6005–6012.
- Pasquariello, N., Oddi, S., Malaponti, M., and Maccarrone, M. (2009). Regulation of gene transcription and keratinocyte differentiation by anandamide. *Vitam. Horm.* 81, 441–467.
- Pertwee, R.G. (2006). The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes (Lond)* 30 Suppl 1, S13–S18.
- Pertwee, R.G. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.* 153, 199–215.
- Pertwee, R.G. (2015). Endocannabinoids and Their Pharmacological Actions. *Handb Exp Pharmacol* 231, 1–37.
- Pertwee, R.G., Howlett, A.C., Abood, M.E., Alexander, S.P.H., Di Marzo, V., Elphick, M.R., Greasley, P.J., Hansen, H.S., Kunos, G., Mackie, K., et al. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol. Rev.* 62, 588–631.
- Picardo, M., and Ottaviani, M. (2014). Skin microbiome and skin disease: the example of rosacea. *J. Clin. Gastroenterol.* 48 Suppl 1, S85–S86.
- Picardo, M., Ottaviani, M., Camera, E., and Mastrofrancesco, A. (2009). Sebaceous gland lipids. *Dermatoendocrinol* 1, 68–71.

- Poblet, E., Jiménez-Acosta, F., Hardman, J.A., Escario, E., and Paus, R. (2015). Is the eccrine gland an integral, functionally important component of the human scalp pilosebaceous unit? *Exp. Dermatol.*
- Polyánka, H., Szabó, K., Tax, G., Göblös, A., Kinyó, Á., Tubak, V., Újfaludi, Z., Boros, I., Bata-Csörgő, Zs., Kemény, L., and Széll, M. (2013). Characterization of UV-B induced cellular processes in a keratinocyte cell line (HPV-KER) immortalized with the HPV-E6 oncogene *J. Invest Dermatol.* 133:(1), S218.
- Porter, A.M. (2001). Why do we have apocrine and sebaceous glands? *J R Soc Med* 94, 236–237.
- Poucher, S.M., Keddie, J.R., Singh, P., Stoggall, S.M., Caulkett, P.W., Jones, G., and Coll, M.G. (1995). The in vitro pharmacology of ZM 241385, a potent, non-xanthine A2a selective adenosine receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 115, 1096–1102.
- Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 17, 1063–1072.
- Pucci, M., Pasquariello, N., Battista, N., Tommaso, M.D., Rapino, C., Fezza, F., Zuccolo, M., Jourdain, R., Agrò, A.F., Breton, L., et al. (2012). Endocannabinoids Stimulate Human Melanogenesis via Type-1 Cannabinoid Receptor. *J. Biol. Chem.* 287, 15466–15478.
- Pucci, M., Pirazzi, V., Pasquariello, N., and Maccarrone, M. (2011). Endocannabinoid signaling and epidermal differentiation. *Eur J Dermatol* 21 Suppl 2, 29–34.
- Pucci, M., Rapino, C., Di Francesco, A., Dainese, E., D’Addario, C., and Maccarrone, M. (2013). Epigenetic control of skin differentiation genes by phytocannabinoids. *Br. J. Pharmacol.* 170, 581–591.
- Qin, N., Neep, M.P., Liu, Y., Hutchinson, T.L., Lubin, M.L., and Flores, C.M. (2008). TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 28, 6231–6238.
- Raboune, S., Stuart, J.M., Leishman, E., Takacs, S.M., Rhodes, B., Basnet, A., Jameyfield, E., McHugh, D., Widlanski, T., and Bradshaw, H.B. (2014). Novel endogenous N-acyl amides activate TRPV1-4 receptors, BV-2 microglia, and are regulated in brain in an acute model of inflammation. *Front Cell Neurosci* 8, 195.
- Rattner, A., Hsieh, J.C., Smallwood, P.M., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nathans, J. (1997). A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2859–2863.
- Rawlings, A.V. (2010). Recent advances in skin “barrier” research. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 671–677.
- Rawlings, A.V. (2014). Emerging acne treatments. In: Zouboulis, C.C., Katsambas, A.D. és Kligman, A.M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 441–448. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Reddy, A.S., and Zhang, S. (2013). Polypharmacology: drug discovery for the future. *Expert Rev Clin Pharmacol* 6, 41–47.
- Reitamo, S., and Remitz, A. (2014). An update on current pharmacotherapy options in atopic dermatitis. *Expert Opin Pharmacother* 15, 1517–1524.

- Rey, A.A., Purrio, M., Viveros, M.-P., and Lutz, B. (2012). Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Neuropsychopharmacology* 37, 2624–2634.
- Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M.L., Vitoretti, L.B., Mariano-Souza, D.P., Quinteiro-Filho, W.M., Akamine, A.T., Almeida, V.I., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F., et al. (2012). Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 678, 78–85.
- Rigopoulos, D., and Korfitis, C. (2014). Acne and smoking. In: Zouboulis C. C., Katsambas A. D. és Kligman A. M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 167-170. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Rigopoulos, D., Larios, G., and Katsambas, A.D. (2010). The role of isotretinoin in acne therapy: why not as first-line therapy? facts and controversies. *Clin. Dermatol.* 28, 24–30.
- Roelandt, T., Heughebaert, C., Bredif, S., Giddel, C., Baudouin, C., Msika, P., Roseeuw, D., Uchida, Y., Elias, P.M., and Hachem, J.-P. (2012). Cannabinoid receptors 1 and 2 oppositely regulate epidermal permeability barrier status and differentiation. *Exp. Dermatol.* 21, 688–693.
- Rosini, M. (2014). Polypharmacology: the rise of multitarget drugs over combination therapies. *Future Med Chem* 6, 485–487.
- Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* 66, 105–143.
- Ross, M.H., Romrel, L.J. és Kaye, G.I. (2007). A kultakaró. In: Coryell, P.A. (szerk.) *Szövektan Kézikönyv és atlasz* Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt. 4, 400-433.
- Ross, R.A. (2009). The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 156–163.
- Russo, E.B. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1344–1364.
- Russo, E.B., Burnett, A., Hall, B., and Parker, K.K. (2005). Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem. Res.* 30, 1037–1043.
- Saitta, P., Keehan, P., Yousif, J., Way, B.V., Grekin, S., and Brancaccio, R. (2011a). An update on the presence of psychiatric comorbidities in acne patients, part 1: overview of prevalence. *Cutis* 88, 33–40.
- Saitta, P., Keehan, P., Yousif, J., Way, B.V., Grekin, S., and Brancaccio, R. (2011b). An update on the presence of psychiatric comorbidities in acne patients, Part 2: Depression, anxiety, and suicide. *Cutis* 88, 92–97.
- Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, I.J., Hernández-Tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., Vázquez, P., Blázquez, C., Torres, S., García, S., et al. (2009). Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J. Clin. Invest.* 119, 1359–1372.
- Salazar, M., Lorente, M., García-Taboada, E., Hernández-Tiedra, S., Davila, D., Francis, S.E., Guzmán, M., Kiss-Toth, E., and Velasco, G. (2013). The pseudokinase tribbles

- homologue-3 plays a crucial role in cannabinoid anticancer action. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 1573–1578.
- Schneider, M.R., and Paus, R. (2010). Sebocytes, multifaceted epithelial cells: lipid production and holocrine secretion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 181–185.
- Schriever, S.C., Deutsch, M.J., Adamski, J., Roscher, A.A., and Ensenaer, R. (2013). Cellular signaling of amino acids towards mTORC1 activation in impaired human leucine catabolism. *J. Nutr. Biochem.* 24, 824–831.
- Shi, H., Halvorsen, Y.D., Ellis, P.N., Wilkison, W.O., and Zemel, M.B. (2000). Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiol. Genomics* 3, 75–82.
- Shirakawa, M., Uramoto, K., and Harada, F.A. (2006). Treatment of acne conglobata with infliximab. *J. Am. Acad. Dermatol.* 55, 344–346.
- Shoyama, Y., Sugawa, C., Tanaka, H., and Morimoto, S. (2008). Cannabinoids act as necrosis-inducing factors in *Cannabis sativa*. *Plant Signal Behav* 3, 1111–1112.
- Sivamani, R.K. (2014). Eicosanoids and Keratinocytes in Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3, 476–481.
- Skopp, G., Stroheck-Kuehner, P., Mann, K., and Hermann, D. (2007). Deposition of cannabinoids in hair after long-term use of cannabis. *Forensic Sci. Int.* 170, 46–50.
- Spergel, J.M. (2010). From atopic dermatitis to asthma: the atopic march. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 105, 99–106; quiz 107–109, 117.
- Ständer, S., Schmelz, M., Metze, D., Luger, T., and Rukwied, R. (2005). Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J. Dermatol. Sci.* 38, 177–188.
- Stanley, C.P., Hind, W.H., Tufarelli, C., and O’Sullivan, S.E. (2015). Cannabidiol causes endothelium-dependent vasorelaxation of human mesenteric arteries via CB1 activation. *Cardiovasc. Res.* 107, 568–578.
- Starova, A., and Aly, R. (2005). The safety and efficacy of ciclopirox olamine for the treatment of seborrheic dermatitis. *Expert Opin Drug Saf* 4, 235–239.
- Stotz, S.C. és Clapham, D.E. (2015). Transient Receptor Potential channels: TRPV2. Utoljára módosítva 2015. április 2-án. *IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY*, <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=508>. Letöltve 2015. október 28-án.
- Straus, S.E. (2000). Immunoactive cannabinoids: therapeutic prospects for marijuana constituents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9363–9364.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15545–15550.
- Sugawara, K., Bíró, T., Tsuruta, D., Tóth, B.I., Kromminga, A., Zákány, N., Zimmer, A., Funk, W., Gibbs, B.F., Zimmer, A., et al. (2012). Endocannabinoids limit excessive mast cell maturation and activation in human skin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 726–738.e8.
- Sula, B. (1975). Early diffusion and folk uses of hemp. In Rubin, V. és Comitas, L. (szerk.): *Cannabis and Culture*. 39–49.

- Susin, S.A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 151–165.
- Szabó, K., and Kemény, L. (2011). Studying the genetic predisposing factors in the pathogenesis of acne vulgaris. *Hum. Immunol.* 72, 766–773.
- Szegedi, K., Göblös, A., Bacsá, S., Antal, M., Németh, I.B., Bata-Csörgő, Z., Kemény, L., Dobozy, A., and Széll, M. (2012). Expression and functional studies on the noncoding RNA, PRINS. *Int J Mol Sci* 14, 205–225.
- Takahashi, Y., Ohoka, N., Hayashi, H., and Sato, R. (2008). TRB3 suppresses adipocyte differentiation by negatively regulating PPARgamma transcriptional activity. *J. Lipid Res.* 49, 880–892.
- Tanaka, A., and Matsuda, H. (2011). Evaluation of itch by using NC/NgaTnd mice: a model of human atopic dermatitis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 790436.
- Telek, A., Bíró, T., Bodó, E., Tóth, B.I., Borbíró, I., Kunos, G., and Paus, R. (2007). Inhibition of human hair follicle growth by endo- and exocannabinoids. *FASEB J.* 21, 3534–3541.
- Thody, A.J., and Shuster, S. (1989). Control and function of sebaceous glands. *Physiol. Rev.* 69, 383–416.
- Thomas, A., Baillie, G.L., Phillips, A.M., Razdan, R.K., Ross, R.A., and Pertwee, R.G. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 150, 613–623.
- Tiede, S., Kloepper, J.E., Ernst, N., Poeggeler, B., Kruse, C., and Paus, R. (2009). Nestin in human skin: exclusive expression in intramesenchymal skin compartments and regulation by leptin. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2711–2720.
- Togsverd-Bo, K., Lerche, C.M., Philipsen, P.A., Poulsen, T., Wulf, H.C., and Haedersdal, M. (2012). Porphyrin biodistribution in UV-exposed murine skin after methyl- and hexyl-aminolevulinate incubation. *Exp. Dermatol.* 21, 260–264.
- Tóth, B.I., Dobrosi, N., Dajnoki, A., Czifra, G., Oláh, A., Szöllosi, A.G., Juhász, I., Sugawara, K., Paus, R., and Bíró, T. (2011a). Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1095–1104.
- Tóth, B.I., Géczy, T., Griger, Z., Dózsa, A., Seltmann, H., Kovács, L., Nagy, L., Zouboulis, C.C., Paus, R., and Bíró, T. (2009). Transient receptor potential vanilloid-1 signaling as a regulator of human sebocyte biology. *J. Invest. Dermatol.* 129, 329–339.
- Tóth, B.I., Oláh, A., Szöllosi, A.G., and Bíró, T. (2014). TRP channels in the skin. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2568–2581.
- Tóth, B.I., Oláh, A., Szöllosi, A.G., Czifra, G., and Bíró, T. (2011b). “Sebocytes’ makeup”: novel mechanisms and concepts in the physiology of the human sebaceous glands. *Pflugers Arch.* 461, 593–606.
- Tsatsou, F., and Zouboulis, C.C. (2014). Anatomy of the sebaceous gland. In: Zouboulis C. C., Katsambas A. D. és Kligman A. M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 27-33. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>

- Tubaro, A., Giangaspero, A., Sosa, S., Negri, R., Grassi, G., Casano, S., Della Loggia, R., and Appendino, G. (2010). Comparative topical anti-inflammatory activity of cannabinoids and cannabivarin. *Fitoterapia* 81, 816–819.
- Varley, C.L., Bacon, E.J., Holder, J.C., and Southgate, J. (2009). FOXA1 and IRF-1 intermediary transcriptional regulators of PPARgamma-induced urothelial cytodifferentiation. *Cell Death Differ.* 16, 103–114.
- Vega, J., Sánchez-Velicia, L., and Pozo, T. (2010). [Efficacy of etanercept in the treatment of acne conglobata]. *Actas Dermosifiliogr* 101, 553–554.
- Vergara, D., White, K.H., Keepers, K.G., and Kane, N.C. (2015). The complete chloroplast genomes of *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. *Mitochondrial DNA* 1–2.
- Weise, C., Heunemann, C., Loddenkemper, C., Herz, U., van Tol, E.A.F., and Worm, M. (2011). Dietary docosahexaenoic acid in combination with arachidonic acid ameliorates allergen-induced dermatitis in mice. *Pediatr Allergy Immunol* 22, 497–504.
- Welty, T.E., Luebke, A., and Gidal, B.E. (2014). Cannabidiol: promise and pitfalls. *Epilepsy Curr* 14, 250–252.
- Wilkinson, J.D., and Williamson, E.M. (2007). Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis. *J. Dermatol. Sci.* 45, 87–92.
- Wilson, S.M., Whiteford, M.L., Bovell, D.L., Padiani, J.D., Ko, W.H., Smith, G.L., Lee, C.M., and Elder, H.Y. (1994). The regulation of membrane 125I- and 86Rb+ permeability in a virally transformed cell line (NCL-SG3) derived from the human sweat gland epithelium. *Exp. Physiol.* 79, 445–459.
- Wilson, S.R., Thé, L., Batia, L.M., Beattie, K., Katibah, G.E., McClain, S.P., Pellegrino, M., Estandian, D.M., and Bautista, D.M. (2013). The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell* 155, 285–295.
- Won Oh, J., Kloepper, J., Langan, E.A., Kim, Y., Yeo, J., Kim, M.J., Hsi, T.-C., Rose, C., Yoon, G.S., Lee, S.-J., et al. (2015). A guide to Studying Human Hair Follicle Cycling In Vivo. *J. Invest. Dermatol.*
- Wu, M., Xu, L.-G., Zhai, Z., and Shu, H.-B. (2003). SINK is a p65-interacting negative regulator of NF-kappaB-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 278, 27072–27079.
- Xia, L.Q., Zouboulis, C., Detmar, M., Mayer-da-Silva, A., Stadler, R., and Orfanos, C.E. (1989). Isolation of human sebaceous glands and cultivation of sebaceous gland-derived cells as an in vitro model. *J. Invest. Dermatol.* 93, 315–321.
- Xiang, L.F., and Gollnick, H.P.M. (2014). Lasers and phototherapy in acne. In: Zouboulis, C.C., Katsambas, A.D. és Kligman, A.M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 519–526. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Yabuta, N., Onda, H., Watanabe, M., Yoshioka, N., Nagamori, I., Funatsu, T., Toji, S., Tamai, K., and Nojima, H. (2006). Isolation and characterization of the TIGA genes, whose transcripts are induced by growth arrest. *Nucleic Acids Res.* 34, 4878–4892.
- Yamaori, S., Kushihara, M., Yamamoto, I., and Watanabe, K. (2010). Characterization of major phytocannabinoids, cannabidiol and cannabinol, as isoform-selective and potent inhibitors of human CYP1 enzymes. *Biochem. Pharmacol.* 79, 1691–1698.

- Yang, Y., Tarapore, R.S., Jarmel, M.H., Tetreault, M.-P., and Katz, J.P. (2012). p53 mutation alters the effect of the esophageal tumor suppressor KLF5 on keratinocyte proliferation. *Cell Cycle* 11, 4033–4039.
- Yasumizu, M., Sugawara, K., Paus, R., and Tsuruta, D. (2014). Cannabinoid receptor (CB)1 regulates laminin-511 expression in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 134 Suppl. S26.
- Zhang, L.L., Yan Liu, D., Ma, L.Q., Luo, Z.D., Cao, T.B., Zhong, J., Yan, Z.C., Wang, L.J., Zhao, Z.G., Zhu, S.J., et al. (2007). Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ. Res.* 100, 1063–1070.
- Zou, T., Liu, W.-J., Li, S.-D., Zhou, W., Yang, J.-F., and Zou, C.-G. (2011). TRB3 mediates homocysteine-induced inhibition of endothelial cell proliferation. *J. Cell. Physiol.* 226, 2782–2789.
- Zouboulis, C.C. (2014). Introduction. In: Zouboulis, C.C., Katsambas, A.D. és Kligman, A.M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, XXV-XXVIII. DOI: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8_69375-8
- Zouboulis, C.C. és Dessinioti, C. (2014a). A new concept of acne pathogenesis. In: Zouboulis, C.C., Katsambas, A.D. és Kligman, A.M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 105-106. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Zouboulis, C.C. és Dessinioti, C. (2014b). Experimental models of the sebaceous gland. In: Zouboulis, C.C., Katsambas, A.D. és Kligman, A.M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 44-48. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Zouboulis, C.C. és Makrantonaki, E. (2014). The role of the sebaceous glands. In: Zouboulis, C.C., Katsambas, A.D. és Kligman, A.M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 77-86. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Zouboulis, C.C., Baron, J.M., Böhm, M., Kippenberger, S., Kurzen, H., Reichrath, J., and Thielitz, A. (2008). Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Exp. Dermatol.* 17, 542–551.
- Zouboulis, C.C., Dessinioti, C. és Antoniou, C. (2014a). Acne epidemiology and socioeconomic aspects. In: Zouboulis, C.C., Katsambas, A.D. és Kligman, A.M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 54-56. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>
- Zouboulis, C.C., Eady, A., Philpott, M., Goldsmith, L.A., Orfanos, C., Cunliffe, W.C., and Rosenfield, R. (2005). What is the pathogenesis of acne? *Exp. Dermatol.* 14, 143–152.
- Zouboulis, C.C., Jourdan, E., and Picardo, M. (2014b). Acne is an inflammatory disease and alterations of sebum composition initiate acne lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 28, 527–532.
- Zouboulis, C.C., Liakou, A.I. (2014). Evidence-based treatment of acne. In: Zouboulis, C.C., Katsambas, A.D. és Kligman, A.M. (szerk.) *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1, 379-382. DOI: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69375-8>

- Zouboulis, C.C., Nestoris, S., Adler, Y.D., Orth, M., Orfanos, C.E., Picardo, M., Camera, E., and Cunliffe, W.J. (2003). A new concept for acne therapy: a pilot study with zileuton, an oral 5-lipoxygenase inhibitor. *Arch Dermatol* 139, 668–670.
- Zouboulis, C.C., Seltsmann, H., Neitzel, H., and Orfanos, C.E. (1999). Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J. Invest. Dermatol.* 113, 1011–1020.
- Zuardi, A.W., Crippa, J. a. S., Hallak, J.E.C., Moreira, F.A., and Guimarães, F.S. (2006a). Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 421–429.
- Zuardi, A.W., Hallak, J.E.C., Dursun, S.M., Morais, S.L., Sanches, R.F., Musty, R.E., and Crippa, J.A.S. (2006b). Cannabidiol monotherapy for treatment-resistant schizophrenia. *J. Psychopharmacol. (Oxford)* 20, 683–686.

11. Tárgyszavak

A_{2A} receptor, *acne*, *atopias dermatitis*, endokannabinoid rendszer, FAAH, FAAH-gátló, gyulladás, faggyúmirigy, kannabidiol, keratinocita, NRIP1, szebocita, TRIB3, TRPV csatorna.

12. Key words

A_{2A} receptor, *acne*, *atopic dermatitis*, cannabidiol, endocannabinoid system, FAAH, FAAH-inhibitor, inflammation, keratinocyte, NRIP1, sebaceous gland, sebocyte, TRIB3, TRPV channel.

13. Köszönetnyilvánítás

Egy hosszú út végén és reménység szerint egy másik elején állva a következőkben szeretném megragadni az alkalmat, hogy köszönetet mondjak mindazoknak, akik hozzájárultak a disszertáció létrejöttéhez részint az emberi és anyagi háttér biztosítása, részint pedig gyakorlati, szakmai tanácsaik, segítségük révén.

Köszönetet mondok mindenekelőtt a DE ÁOK Élettani Intézet jelenlegi és volt igazgatójának **Prof. Dr. Csernoch László** és **Prof. Dr. Kovács László** professzor uraknak, akik előbb TDK, majd PhD hallgató koromban biztosították a munkámhoz szükséges feltételeket.

Köszönöm témavezetőmnek **Prof. Dr. Bíró Tamás** egyetemi tanárnak az évek során nyújtott szakmai és emberi segítséget, a belém vetett bizalmat és azt, hogy számomra mind szakmai, mind emberi szempontból fontos példát adott, és nagyon sokat tanulhattam tőle.

Köszönet illeti a labor és az intézet korábbi és jelenlegi dolgozóit, PhD és TDK hallgatóit, akik ha szükséges volt, mindig önzetlenül siettek a segítségemre. Köztük is különösen legközvetlenebb munkatársaim, **Dr. Tóth István Balázs, Dr. Mihály Johanna, Dr. Szöllősi Attila Gábor, Dr. Dobrosi Nóra, Dr. Czifra Gabriella, Dr. Géczy Tamás, Dr. Borbíró István, Ambrus Lídia, Angyal Ágnes, Herczeg-Lisztos Erika, Zákány Nóra, Balogh Norbert, Dr. Szabó Imre Lőrinc, Dr. Vasas Nikolett, Markovics Arnold, Szabó-Papp Judit, Uzonyi Renáta, Hollósi Erika, Furin Lilla, Bánhalminé Szilágyi Szilvia, Galicz Anita** és „pótanyánk”, **Dr. Varga Attiláné „Ibcsike”** segítségével vagyok múlhatatlanul hálás.

Köszönöm kollaborációs partnereink (**Prof. Dr. Ralf Paus, Prof. Dr. Christoph Abels, Dr. Michael Soeberdt, Prof. Dr. Mauro Picardo, Prof. Dr. Christos C. Zouboulis** és még sokan mások) felbecsülhetetlen értékű segítségét.

Az évek során az a szerencse ért, hogy számos kimagaslóan tehetséges, odaadó, a tudomány iránt elkötelezett és szorgalmas TDK hallgató társtémavezetője lehettem. Hálásan köszönöm **Dr. Aranyász Andrea, Dr. Bereczki Dániel, Dr. Czakó Nóra, Daubner Roland, Fazekas Eszter, Dr. Paragh Lilla, Sós Katalin Eszter, Dr. Szabó Pálma Tímea és Takács Erika** munkáját; mindig nagy örömmel gondolok az együtt töltött időre.

Nehéz szavakba önteni azt a hálát, amit szüleim és testvérem iránt érzek, hiszen nélkülük nem jutottam volna el eddig a pontig. Még náluk is nagyobb köszönet illeti azonban feleségemet, aki hősiesen tűrte az olykor hetven-nyolcvan órás munkaheteket, a sok távollétet, stresszt és fáradtságot a „jó, csak még be kell szaladnom egy kicsit az Élettanra” típusú komplikációkat, és olyan szeretettel vett körül, ami mindig feltöltött energiával az új kihívások előtt.

Köszönöm!

„Solī Deo Gloria.”

A kutatás a Richter Gedeon Talentum Alapítvány, valamint a Nemzeti Kiválóság Program Jedlik Ányos Doktorjelölti Ösztöndíj (TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001) támogatásával, a „Lendület” program keretében (LP2011-003/2015) valósult meg.

14. Függelék – Saját közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/274/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

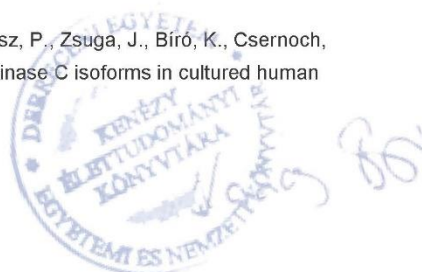
Jelölt: Oláh Attila
Neptun kód: ZGIB8K
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10034478

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Oláh, A.**, Ambrus, L., Nicolussi, S., Gertsch, J., Tubak, V., Kemény, L., Soeberdt, M., Abels, C., Bíró, T.: Inhibition of fatty acid amide hydrolase exerts cutaneous anti-inflammatory effects both in vitro and in vivo.
Exp. Dermatol. "Accepted by Publisher" (2016)
IF:3.762 (2014)
2. **Oláh, A.**, Tóth, I.B., Borbíró, I., Sugawara, K., Szöllősi, A.G., Czifra, G., Pál, B., Ambrus, L., Kloepper, J., Camera, E., Ludovici, M., Picardo, M., Voets, T., Zouboulis, C.C., Paus, R., Bíró, T.: Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes.
J. Clin. Invest. 124 (9), 3713-3724, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI64628>
IF:13.215

További Közlemények

3. Ambrus, L., **Oláh, A.**, Oláh, T., Balla, G., Saleem, M.A., Orosz, P., Zsuga, J., Bíró, K., Csernoch, L., Bíró, T., Szabó, T.: Inhibition of TRPC6 by protein kinase C isoforms in cultured human podocytes.
J. Cell. Mol. Med. 19 (12), 2771-2779, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12660>
IF:4.014 (2014)



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



4. Kovács, D., Lovászi, M., Pólska, 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)
5. Tóth, I.B., **Oláh, A.**, Szöllősi, A.G., Bíró, T.: TRP channels in the skin.
Br. J. Pharmacol. 171 (10), 2568-2581, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12569>
IF:4.842
6. Szöllősi, A.G., **Oláh, A.**, Tóth, I.B., Papp, F., Czifra, G., Panyi, G., Bíró, T.: Transient receptor potential vanilloid-2 mediates the effects of transient heat shock on endocytosis of human monocyte-derived dendritic cells.
FEBS Lett. 587 (9), 1440-1445, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.03.027>
IF:3.341
7. **Oláh, A.**, Szöllősi, A.G., Bíró, T.: The channel physiology of the skin.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 163, 65-131, 2012.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007%2F112_2012_7
IF:1
8. Géczy, T., **Oláh, A.**, Tóth, I.B., Czifra, G., Szöllősi, A.G., Szabó, T., Zouboulis, C.C., Paus, R., Bíró, T.: Protein Kinase C Isoforms Have Differential Roles in the Regulation of Human Sebocyte Biology.
J. Invest. Dermatol. 132 (8), 1988-1997, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.94>
IF:6.193
9. Tóth, I.B., **Oláh, A.**, Szöllősi, A.G., Czifra, G., Bíró, T.: "Sebocytes' makeup": Novel mechanisms and concepts in the physiology of the human sebaceous glands.
Pflügers Arch. 461 (6), 593-606, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-011-0941-6>
IF:4.463





10. Tóth, I.B., Dobrosi, N., Dajnoki, A., Czifra, G., **Oláh, A.**, Szöllősi, A.G., Juhász, I., Sugawara, K., Paus, R., Bíró, T.: Endocannabinoids Modulate Human Epidermal Keratinocyte Proliferation and Survival via the Sequential Engagement of Cannabinoid Receptor-1 and Transient Receptor Potential Vanilloid-1.

J. Invest. Dermatol. 131 (5), 1095-1104, 2011.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.421>

IF:6.314

11. Borbíró, I., Lisztes, E., Tóth, I.B., Czifra, G., **Oláh, A.**, Szöllősi, A.G., Szentandrassy, N., Nánási, P.P., Paus, R., Kovács, L., Bíró, T.: Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth.

J. Invest. Dermatol. 131 (8), 1605-1614, 2011.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.122>

IF:6.314

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 57,22

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 16,977

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

Debrecen, 2016.01.06.

