

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS

**Az endocannabinoid rendszer szerepe humán
bőr eredetű sejtek biológiai folyamatainak
szabályozásában**

Dobrosi Nóra

Témavezető: Dr. Bíró Tamás, egyetemi docens



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
BEVEZETÉS.....	4
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
<i>A cannabinoidok.....</i>	<i>5</i>
<i>Cannabinoid receptorok.....</i>	<i>8</i>
<i>Cannabinoid rendszer a szervezetben</i>	<i>9</i>
<i>Cannabinoid rendszer a bőrben</i>	<i>11</i>
<i>A faggyúmirigy és az azt alkotó sebocyták modellje: az SZ95 sejtvonal</i>	<i>12</i>
<i>A humán epidermális keratinocyták és modelljük: a HaCaT sejtvonal</i>	<i>15</i>
<i>Célkitűzések.....</i>	<i>17</i>
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	19
<i>Kísérleteinkben alkalmazott kémiai anyagok.....</i>	<i>19</i>
<i>Az SZ95 sebocyták tenyésztése</i>	<i>19</i>
<i>Az NHEK sejtek és a HaCaT keratinocyták tenyésztése</i>	<i>19</i>
<i>Az SZ95 sejtek endocannabinoid tartalmának meghatározása.....</i>	<i>20</i>
<i>Immuncitokémia</i>	<i>20</i>
<i>Immunhisztokémia</i>	<i>21</i>
<i>In situ „skin organ culture”</i>	<i>21</i>
<i>Western blot.....</i>	<i>22</i>
<i>Szemi-kvantitatív reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR).....</i>	<i>23</i>
<i>Kvantitatív valós idejű PCR (Q-PCR).....</i>	<i>24</i>
<i>A sejtek életképességének meghatározása.....</i>	<i>25</i>
<i>Az apoptotikus folyamatok vizsgálata</i>	<i>26</i>
<i>A cytotoxicitás/sejtnekrózis vizsgálata</i>	<i>27</i>
<i>Az intracelluláris lipidtartalom meghatározása</i>	<i>28</i>
<i>RNS interferencia (siRNS).....</i>	<i>29</i>
<i>Az intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_{IC}$) vizsgálata</i>	<i>30</i>
<i>Statisztikai analízis</i>	<i>30</i>
EREDMÉNYEK.....	31
1. Kísérletek humán sebocytákon.....	31
<i>Humán faggyúmirigyben a CB1 és a CB2 receptor, míg SZ95 sebocytákon csupán a CB2 receptor fejeződik ki</i>	<i>31</i>
<i>Az SZ95 sebocyták endocannabinoidokat termelnek</i>	<i>33</i>
<i>Az endocannabinoidok fokozzák az SZ95 sebocyták lipidszintézisét, és apoptózist indukálnak</i>	<i>33</i>
<i>Az AEA CB2-mediált úton fejt ki hatását</i>	<i>37</i>
<i>Az AEA celluláris hatásának kifejlődésében a MAPK útvonal is résztvesz</i>	<i>40</i>
<i>Az endocannabinoidok fokozzák a lipidszintézis szabályozásában szerepet játszó gének expresszióját</i>	<i>41</i>
2. Kísérletek humán epidermális keratinocytákon	43
<i>A humán keratinocyták egyaránt expresszálják a CB1-et, a CB2-t és a TRPV1-t.....</i>	<i>43</i>
<i>Az AEA csökkenti a sejtek életképességét és apoptózist indukál in vitro</i>	<i>44</i>
<i>A humán bőrben az AEA in situ is kifejti antiproliferatív és proapoptotikus hatásait („skin organ culture” technika)</i>	<i>46</i>

<i>Az AEA celluláris hatásait a CB1 és a TRPV1 közvetíti</i>	<i>47</i>
<i>Az AEA celluláris hatásait feltehetően egy szekvenciálisan aktiválódó jelátviteli mechanizmus (CB1 → TRPV1 → Ca²⁺-beáramlás) mediálja humán keratinocytákban</i>	<i>49</i>
MEGBESZÉLÉS.....	53
<i>A humán SZ95 sebocyták funkcionális, konstitutív aktivitással bíró endocannabinoid rendszerrel rendelkeznek.....</i>	<i>53</i>
<i>Az AEA humán keratinocytákon kifejtett hatását a CB1 és a TRPV1 egymást követő aktivációja közvetíti.....</i>	<i>56</i>
ÖSSZEFOGLALÁS.....	59
SUMMARY.....	60
IRODALOMJEGYZÉK.....	61
DOBROSI NÓRA IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEINEK JEGYZÉKE.....	73
TÁRGYSZAVAK	74
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	75
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	77
FÜGGELÉK.....	78

BEVEZETÉS

Eleinte a cannabinoid rendszer létezéséről a vadkender (*Cannabis sativa*) pszichoaktív alkotója, a (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol révén voltak csak elképzeléseink. Az intenzív kutatások eredményeként kiderült ugyanakkor, hogy maga az emberi szervezet is rendelkezik cannabinoid vegyületekkel. Az elsőként felfedezett és leginkább kutatások középpontjában álló endogén cannabinoid az N-arachidonoylethanolamide, másnéven anandamid (AEA). A cannabinoidokkal végzett vizsgálatok receptor mediálta mechanizmusra utaltak, és ez igazolódott is az 1990-es évek elején, amikor két cannabinoid receptort (CB1 és CB2) azonosítottak. Az 1-es típusú cannabinoid receptort először a központi idegrendszerben, míg a 2-es típusút az immunrendszerben írták le. Idővel azonban kiderült, hogy a receptorok ezen lokalizációja nem ilyen egyértelmű. Az endocannabinoid rendszer működését és aktivitását azóta már számos szövetben, szervben – többek között a bőrben is – leírták.

Laboratóriumunk korábbi kísérletei során kimutatta a rendszer bizonyos tagjainak – pl. cannabinoid receptorok, endocannabinoidok (AEA, 2-arachidonoil-glicerol) – funkcionális jelenlétét a szőrtüsző különféle elemeiben (Telek és mtsai, 2007). Ständer és munkatársai 2005-ben kimutatták a bőr számos függelékének, többek között *in situ* faggyúmirigy sebocytáinak CB1 és CB2 immunpozitivitását. Azonban a rendszer szerepét ezidáig még nem sikerült tisztázni a pilosebaceous egység ezen másik tagján.

A faggyúmirigy az egyik legfontosabb szerepet játsza a bőr homeosztázisában. Ezen homeosztatis viszonyok felborulásával alakulhat ki egy ismert bőrbetegség, az acne vulgaris. Az acne terepiájának fejlesztésében fontos szerepet játszhat a cannabinoid rendszer sebocytákon való jelenlétének tisztázása. Elsősorban ezért választottuk a faggyúmirigyet, illetve az abból származtatott SZ95 sebocyta sejtvonalat kísérleteink első részének alanyául.

A cannabinoid receptorokat és az endocannabinoid AEA metabolizmusában szerepet játszó enzimeket már leírták normál humán epidermális keratinocytákon és immortalizált HaCaT keratinocytákon (Maccarrone és mtsai, 2003), azonban az endocannabinoidok szerepét ezidáig még nem tisztázták. Ezért kísérleteink második felében az AEA humán epidermális keratinocyták életfolyamataira gyakorolt szabályozó szerepét vizsgáltuk *in vitro* és *in situ* körülmények között:

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A cannabinoidok

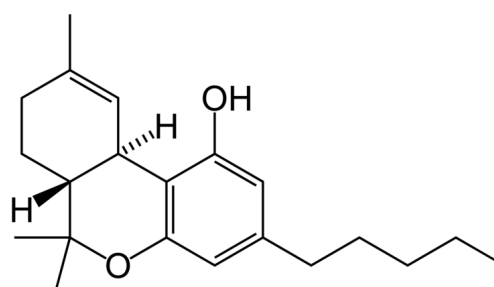
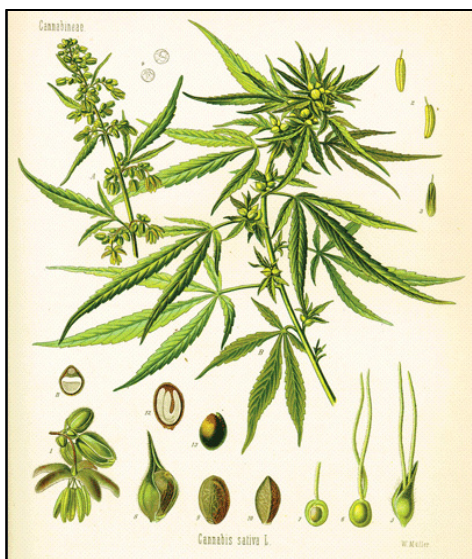
A cannabinoidok a *Cannabis sativa* növényben található természetes anyagok csoportja, valamint ezek szintetikus megfelelői vagy metabolitjai. Kémiaileg a dibenzopirén- vagy monoterpenoidok származékai. A *Cannabis sativa* több mint 420 különböző kémiai összetevőt tartalmaz, amelyek közül a legfontosabbak: (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) és cannabinol (CBN).

A *Cannabis sativa*, azaz a „hasznos kender” (cannabis: kender, sativa: hasznos) könnyen felismerhető jellegzetes, tenyeresen összetett, fogazott leveleiről (**1. ábra**). A név jelentése egyértelművé válik, ha tisztában vagyunk azzal, milyen fontos ipari növényről van szó. Eredetileg ugyanis nem táplálkozási céllal, hanem rostjáért termesztették: a kínaiak már i. e. 2800 évvel is szöveteket és köteleket készítettek belőle, mielőtt a pamutot megismerték volna. A kender fontos textilipari nyersanyagként vitorlavásznak, ponyvák, zsákok, kötelek, zsinegek alapanyaga volt (Zilahi, 1953).

A növény fő pszichoaktív és egyben legismertebb komponense a THC, ami elsősorban fájdalomcsökkentő és neuroprotektív hatással rendelkezik. A növény másik ismert hatóanyaga a CBD, amely a THC eufórikus hatását módosítja; görcsoldó, gyulladáscsökkentő, szorongásoldó és antiemetikus hatású (Pickens, 1981). Ismert még a THC-metabolizáció elsődleges terméke, a CBN, ami kevésbé pszichoaktív; inkább nyugtató, kábító hatással bír (Karniol és mtsai, 1975; Mahadevan és mtsai, 2000).

A növényt a fűvészkönyvekben gyakran mint „minden bajra enyhülést adó gyógyírt” említették (Goodman és Gilman, 1996); a cannabist ugyanis alkalmasnak találták, többek között, a daganatos betegek kemoterápiás kezelése során fellépő táplálkozási nehézségek kezelésére, illetve a glaucomás betegek intraoculáris nyomásának csökkentésére (Ungerleider és mtsai, 1982; Meritt és mtsai, 1981). A különböző klinikai vizsgálatok a marihuánának káros és jótékony hatásait is feltárták, továbbá rámutattak arra, hogy a szer hatása nagyon is sokféle lehet az alkalmazott dózistól és a használat egyéb jellemzőitől (például időtartamától) függően, továbbá egyénenként is változhat (Hall és Degenhardt, 2000). Jellemző például a tudatállapot és az érzékelés megváltozása, enyhe eufória, emelkedett libidó, elégedettség- és ellazultságérzés, de mindemellett letargia, paranoia és szorongás is jelentkezhethet (Hall és Solowij, 1998).

Nem ismert, hogy a krónikus cannabis-abúzus az agyfunkciókban tartós elváltozást okoz-e, mindenesetre a szer krónikus adagolása állatokban a hippocampus károsodását váltotta ki (Drew és mtsai, 1980). Ismeretes, hogy fiatalok rendszeres marihuána-fogyasztása igen gyakran vezet más, keményebb drogok használatához. A vizsgálatok szerint nem zárható ki teljes bizonyossággal a szer genetikai károsító hatása sem, különösen krónikus, hosszan tartó alkalmazás során (Leonard, 1992).



1. ábra: *Cannabis sativa* és legismertebb pszichoaktív hatóanyaga, a Δ^9 -tetrahydrocannabinol. Forrás: http://cannabis.com/faqs/about_cannabis_FAQ/index.html

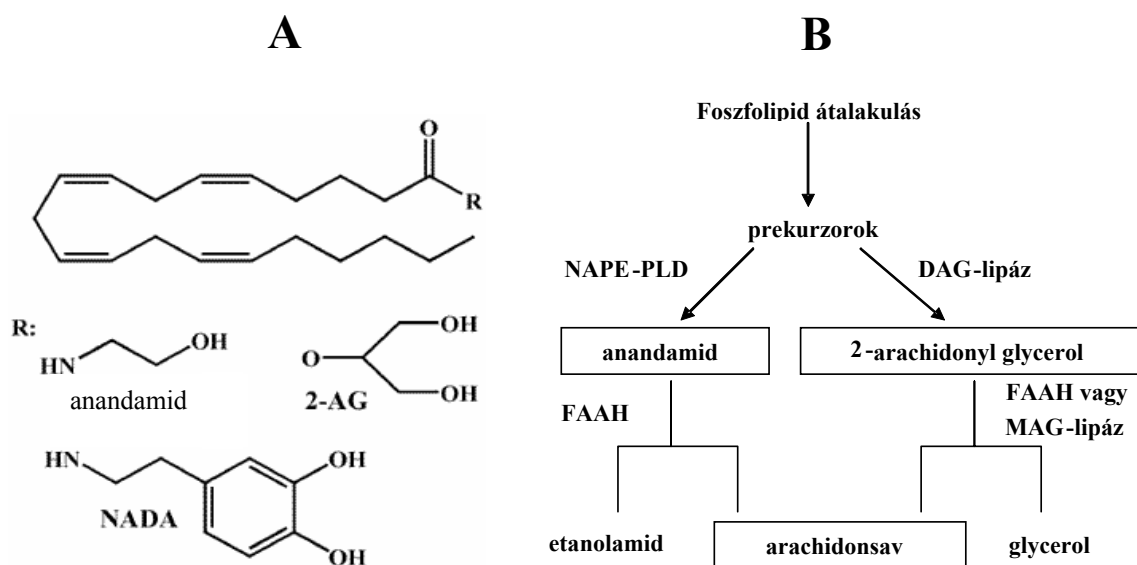
Az intenzív kutatások rávilágítottak arra, hogy maga az emberi szervezet is rendelkezik cannabinoid vegyületekkel és azok receptoraival. Az elsőként felfedezett és leginkább a kutatások középpontjában álló **endogén cannabinoid** az *N-arachidonylethanolamide*, másnéven anandamid (AEA), melyet 1992-ben Devane és munkatársai mutattak ki emlős agyból. A név a boldogságot jelentő szanszkrit eredetű „ananda” szóból származik. Az arachidonsav (AA) származék AEA kémiaiilag az eicosanoidok közé tartozó, 22 szénatomból álló vegyület, mely a legszélesebb körben vizsgált endogén cannabinoid (Howlett és mtsai, 2002) (**2. A ábra**). Az AEA a preszinaptikus membránon retrográd hírvivőként gátolja többek között a szerotonin és az acetilkolin felszabadulását (Fride, 2005).

Az endocannabinoidok közé tartozik az AEA mellett a *2-arachidonoyl glycerol* (2-AG), a *noladin ether*, a *virodhamine* és az *N-arachidonoyl-dopamine* (NADA) is. Az AEA *in vivo* egy membránlipid-prekurzorból, az *N-arachidonoil-foszfátidol-etanol-amid*ből (NAPE) képződik, s a folyamatban, a jelenlegi ismeretek szerint, több enzim is részt vehet (foszfolipáz

D, foszfolipáz C). A 2-AG a diacil-glicerolból (DAG) képződik a DAG-lipáz segítségével (**2. B ábra**). Az endocannabinoidok nem tárolódnak, hanem a „szükségletnek” megfelelő ütemben termelődnek és szabadulnak fel. Az extracelluláris térben lévő endocannabinoidokat egy szelektív „uptake” mechanizmus, az úgynevezett anandamid membrán-transzporter (AMT) röviddel keletkezésüket követően eltávolítja, hogy aztán a sejtekben a zsírsavamid-hidroláz (FAAH) (Di Marzo és mtsai, 1994) vagy a 2-AG esetében a monoacilglicerol-lipáz (MAG-lipáz) (Dinh és mtsai, 2004) segítségével metabolizálódjanak.

Azt is meg kell említenünk, hogy az eredetileg endocannabinoidként leírt AEA endovanilloid vegyületként is ismert, azaz a tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1) közvetlen aktivációjára is képes (Zygmunt és mtsai, 1999; Dinis és mtsai, 2004). Kiderült az is, hogy a TRPV1 aktivációja (például kapszaicinnel) AEA felszabadulást vált ki szenzoros neuronokon (Ahluwalia és mtsai, 2003).

A **szintetikus cannabinoidok** köre is egyre bővül a cannabinoid rendszer vizsgálatának középpontba kerülésével. Ebbe az osztályba tartoznak többek között a kísérleteink során is használt CB1 agonista *arachidonoyl-2-chloro-ethylamide* (ACEA), valamint a CB2 agonista JWH-015.



2. ábra: Az endocannabinoidok szerkezeti képletei és metabolizmusa

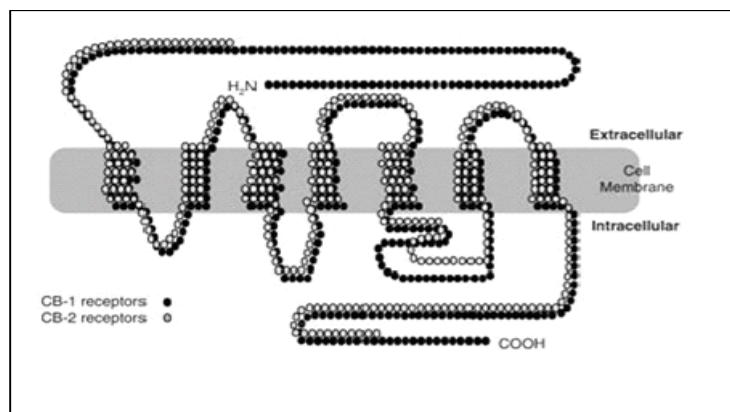
A: A legismertebb endogén cannabinoidok (az AEA, a 2-AG és a NADA) az esszenciális zsírsav arachidonsav (AA) származékai. **B:** Az endocannabinoidok a szükségletnek megfelelően szintetizálódnak a sejtmembrán lipidjeiből. A szintézisükhöz és a lebontásukhoz szükséges, igen komplex enzimszisztéma eddig feltérképezett tagjai: NAPE-PLD: N-arachidonoyl-foszfátidil-ethanolamid foszfolipáz D, FAAH: zsírsavamid-hidroláz, MAG-lipáz: monoacilglicerol-lipáz. Forrás: Di Marzo és mtsai, 1998.

Cannabinoid receptorok

Az 1990-es évek elején sikerült két cannabinoid receptort azonosítani (Matsuda és mtsai, 1990, Munro és mtsai, 1993). Az 1-es típusú cannabinoid receptort (CB1) először a központi idegrendszerben írták le. Egyebek mellett szabályozó szerepet tölt be a szinaptikus folyamatokban, a memóriában és a motoros tanulásban (Freund, és mtsai, 2003, Wilson és mtsai, 2001, Martini és mtsai, 2007). A 473 aminosavból álló, 60 kDa tömegű receptor szerkezetileg a 7-transzmembrán (7-TM) fehérjék közé tartozik. A CB1 G-protein mediált jelátvitellel működő, metabotróp receptor, mely az adenilát-cikláz (AC) gátlásával csökkenti a cAMP szintet, ezzel gátolja a protein kináz A-t (PKA) és így különböző fehérjék foszforilációját csökkenti. A receptorhoz feltehetőleg nem csupán inhibitorikus G-protein kapcsolódhat, így a cAMP koncentrációja attól függően változik a sejtben, hogy milyen típusú G-protein aktiválódik. A G-proteinek aktivációjának hatására a membránban különböző Ca^{2+} - és K^{+} -csatornák is megnyílhatnak, emellett a receptor stimulálása a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) szignalizációs útvonalon keresztül génexpressziós változásokat is elindíthat (Derkinderen és mtsai, 2001; Powles és mtsai, 2005).

A 2-es típusú cannabinoid receptort (CB2) először az immunrendszer sejtjeiben és a hemopoetikus rendszerben (lép, thymus, tonsillák, T- és B sejtek) találták meg (Bátkai és mtsai, 2001; Pacher és mtsai, 2005 és 2006; Klein és Cabral, 2006). A protein 360 aminosavból áll és 44% -os homológiát mutat a CB1 receptorral (a két receptor transzmembrán régiójában 68%-os a homológia) **(3. ábra)**. A CB2 - hasonlóan a CB1-hez - hatását G-proteinen keresztül fejti ki: az AC gátlásával csökkenti a cAMP szintet (Bayewitch és mtsai, 1995), ugyanakkor képes a MAPK stimulálására is (Bouaboula és mtsai, 1996). Leírták, hogy a CB2 aktiválása a MAPK-Erk kaszkád beindításán keresztül génexpressziós változásokat okozhat (Mackie és Stella, 2006).

Az utóbbi időben kiderült az is, hogy a receptorhoz kötődő agonista függvényében ugyanazon receptor aktivációja különböző jelátvivő rendszerek aktiválódásához vezethet (Pacher és mtsai, 2006). Fontos emellett hangsúlyozni, hogy a farmakológiai vizsgálatok szerint a két ismert receptor más receptorok aktiválására – pl. TRP-csatornák (Jordt és mtsai, 2006), PPAR-ok (Liu és mtsai, 2003), GPR55 (Brown és Robin, 2009) – is képes.



3. ábra: A cannabinoid receptor szerkezete.

A két receptortípus szerkezeti hasonlósága: a CB2 receptor 44%-os homológiát mutat a CB1 receptorral, a transzmembrán régiójuk 68%-ban egyezik meg. Forrás: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Nemrégiben kiderült, hogy a receptorok fentebb említett lokalizációja mégsem ilyen egyértelmű. 2006-ban megdőlt az az elmélet, miszerint a CB2 nem fejeződik ki a központi idegrendszerben: Onaivi és munkatársai (1999) megtalálták a kisagyban, valamint a hippocampusban a CB2-t kódoló mRNS-t. Kimutatták továbbá, hogy a receptornak funkcionális szerepe van pl. a motoros folyamatok, valamint a viselkedés szabályozásában. Más kutatócsoport is beszámolt a CB2 jelenlétéről az agy különböző régióiban (Gong és mtsai, 2006). A CB2 receptor szelektív stimulálása különböző neurodegeneratív kórképek, illetve gliasejtes tumorok kezelésében is jótékony hatásúnak bizonyult kísérletes körülmények között, ráadásul a CB2 szelektivitás miatt nem alakultak ki a pszichoaktív mellékhatások sem (Fernandez-Ruiz és mtsai, 2007).

Cannabinoid rendszer a szervezetben

Nehéz teljes képet adni az endocannabinoid rendszer működéséről és hatásáról, hiszen manapság szinte nincs az orvostudománynak és a kutatásnak olyan ága és területe, ahol ne bukkanna fel a rendszer valamilyen szerepe; ezért az alábbiakban csupán néhány kiragadott példával szeretnénk szemléltetni a rendszer sokszínűségét.

Számos központi idegrendszeri eltérésben vizsgálták az endocannabinoid rendszer jelentőségét. Így szerepet játszik pl. az akut (neurotrauma, ischaemiás stroke) és krónikus (sclerosis multiplex, Alzheimer-kór) idegkárosodás elleni neuroprotekciónak kialakulásában (Ramos és mtsai, 2005). Az egyik hipotézis szerint, a pszichiátriai megbetegedések közül a schizofréniában az endocannabinoid rendszer hiperaktivációja hiperdopaminerg és

hipoglutaminerg állapothoz vezet, amelyek együttesen tehetők felelőssé a tünetek egy részéért (Laviolette és mtsai, 2006).

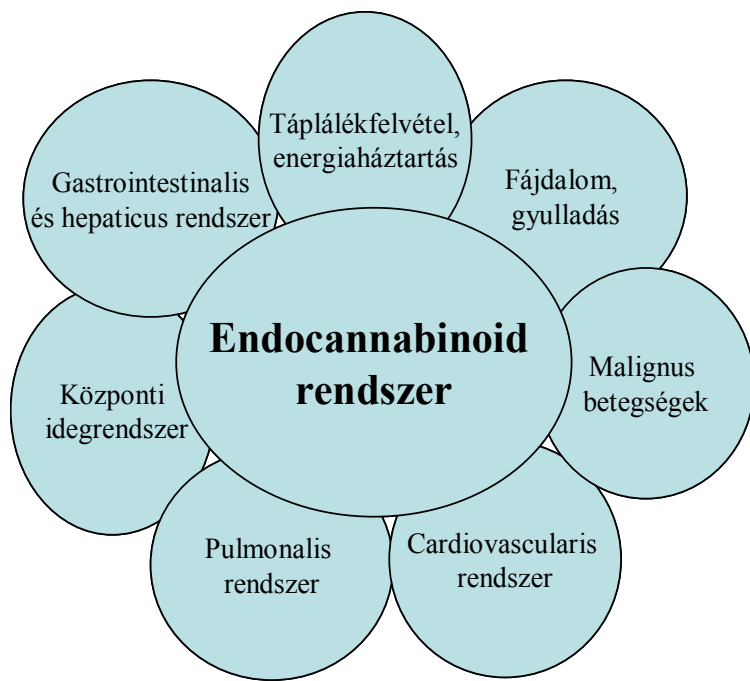
Hasonlóan a cannabis már ókorban leírt fájdalomcsillapító hatásához, az is ismert, hogy a phyto- és endocannabinoidok jelentős mértékű analgetikus hatással rendelkeznek emberben és állatokban (Johnson és mtsai, 1981; Börner és mtsai, 2006). Miután az immunrendszer sejtjeiben is igazolták az endocannabinoid rendszer jelenlétét (Pacher és mtsai, 2006; Klein, 2005; Klein és Cabral 2006), kiterjedt kutatásokat végeztek a gyulladásos folyamatokban játszott szerepéről. A cannabinoid receptor aktiváció a T- és B-lymphocytákon, valamint az antigénprezentáló sejteken olyan citokinek termelődéséhez vezet, amelyek gátolják az 1-es és fokozzák a 2-es típusú helper T-sejtek működését (Klein, 2005). A cannabinoidok antiasthmaticus hatásának is egyik alapvető oka e vegyületek gyulladásgátló tulajdonsága (Klein, 2005).

A cannabinoidok mellett, hogy gyulladásgátló hatásúak, csökkentik a gastrointestinalis motilitást és a szekréciót is. Preklinikai adatok alapján gyulladásos bélbetegségekben (colitis ulcerosa, Crohn-betegség) kompenzatórikusan aktiválódik az endocannabinoid rendszer, mely a motilitást és a gyulladást gátló endogén védőmechanizmust indít be (Klein, 2005; Kunos és Pacher, 2004).

Évezredes megfigyelés, hogy cannabisfogyasztás hatására nő az étvágy, melyet a testsúly fokozatos gyarapodása követ. Mai tudásunk szerint az endocannabinoid rendszer három különböző területen hat a táplálékfogyasztás és az energiaháztartás szabályozására: jelen van a hypothalamusban (Cota és mtsai, 2003), kimutatták a limbikus rendszerben (Kirkham és mtsai, 2002) és leírták a rendszer jelenlétét a zsírsejteken (Cota, és mtsai, 2003). Emellett igazolódott, hogy endocannabinoidok hatására a májban fokozódik a lipogenesis (Osei-Hyiaman és mtsai, 2005), illetve a pancreas béta-sejtjeiben az inzulinszekréció (Mathias és mtsai, 2006).

Számos adat bizonyítja, hogy az endocannabinoidok a szív- és érrendszer majdnem minden elemének működését képesek befolyásolni, így alkalmazásuk összességében jelentős fokú vérnyomáscsökkentéshez vezet. Direkt vazodilatátor hatásuk van (Járai és mtsai, 1999), valamint negatív inotróp hatással rendelkeznek (Bonz és mtsai, 2003), mely hatások döntő többségét lényegében a CB1 receptorok mediálják. Érdekes megfigyelés volt Steffens munkacsoportja részéről 2005-ben, hogy az atheroscleroticus plakkokban levő immunsejtekben CB2-receptor jelenlétét mutatták ki, és e receptorok blokkolása specifikus antagonistával gátolta a cannabinoidok antiatherogén hatását.

Az endocannabinoidok, aktiválva az ocularis CB1-receptorokat, részt vesznek az intraocularis nyomás szabályozásában (lokális vasodilatatio, kapilláris nyomáscsökkenés) (Jarvinen és mtsai, 2002) Emellett védő hatásúnak tűnnek különböző retinopathiákban is, hiszen a CB1-aktiváció segít megőrizni a vér-retina gát épségét (El-Remessy és mtsai, 2006).



4. ábra: Az endocannabinoid rendszer széleskörű és alapvető fiziológiás jelentőséggel bír.

Az endocannabinoid rendszer működését és aktivitását számos szövetben, szervben igazolták, mint például a központi idegrendszerben, a gastrointestinalis és a hepaticus rendszerben. Vizsgálták pulmonális vonatkozásait, szerepét a malignus betegségekben, valamint jelentőségét a fájdalom és a gyulladás mechanizmusában. Szerepet játszik a táplálékfelvétel és az energiaháztartás szabályozásában is.

Forrás: www.endocannabinoid.net
The Endocannabinoid System Handbook.

Cannabinoid rendszer a bőrben

Az elmúlt évek kutatásainak eredményeként a cannabinoid rendszert a bőrben is leírták. Maccarrone és munkatársai 2003-ban közölték, hogy mind normál humán epidermális keratinocyták (NHEK), mind pedig az abból származtatott immortalizált humán epidermális HaCaT keratinocyták kifejezik az AEA metabolizmusában szerepet játszó enzimeket (NAPE-PLD, FAAH). Ezen kívül kimutatták a sejtmembránon keresztüli transzportot biztosító AMT jelenlétét is.

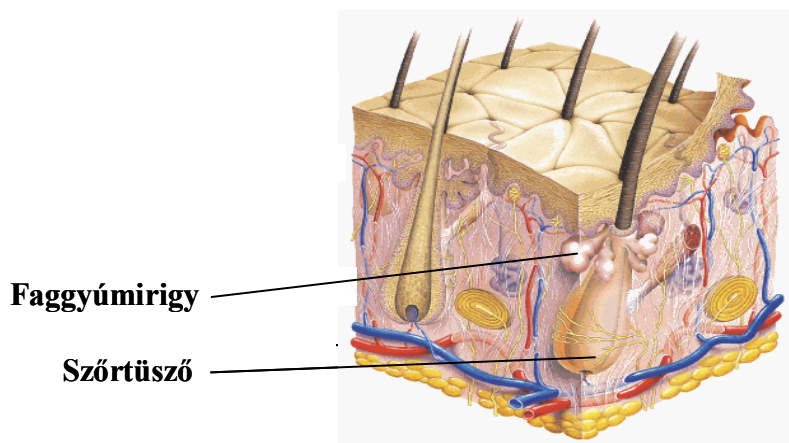
Casanova és munkatársai emellett 2003-ban igazolták, hogy a cannabinoid receptorok stimulálása apoptózist indukál epidermális eredetű tumorsejtekben, míg az egészséges sejtekre a vegyületeknek nem volt hatása. A receptorok aktiválása tumorelles hatású lehet melanomában is, hiszen a cannabinoidok alkalmazása csökkentette a sejtproliferációt és fokozta az apoptotikus folyamatokat (Blazquez és mtsai, 2006). Dvorak és munkatársai szerint (2003) a cannabinoidok antipruriceptív hatással is rendelkeznek: a hisztamin által kiváltott viszketést csökkentette a cannabinoid agonista HU-210 alkalmazása. A CB2 funkcionális szerepét vizsgálva Ibrahim és munkatársai (2005) arra a fontos felfedezésre

jutottak, hogy a receptor stimulálása csökkenti az akut, gyulladásos és neuropathiás fájdalmat anélkül, hogy központi idegrendszeri mellékhatásokat okozna. Johanek és Simone is (2004) a cannabinoid rendszer antinociceptív hatásáról számoltak be: a CB1 receptor stimulálása lokálisan képes csökkenteni hő hatására kialakuló, úgynevezett thermalis hyperalgesziát. Karsak és munkatársai 2007-ben CB1/CB2 kettős knockout egereken végzett, klinikai szempontból is fontos kísérleti eredményükről számoltak be, miszerint az endocannabinoidok képesek csökkenteni az allergiás kontakt dermatitis tüneteit. Nagy jelentőséggel bír Ständer és munkatársainak 2005-ben közölt eredménye is, hogy a CB1 és CB2 receptor a humán bőr számos szöveti elemében kifejeződik.

Laboratóriumunk emellett nemrégiben a CB1 receptor funkcionális jelenlétét igazolta a szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában. Humán szőrtüsző szervkultúrát alkalmazva kimutattuk, hogy endo- és exocannabinoidok – feltehetően CB1 mediálta jelátviteli útvonal beindításán keresztül – a csökkenték a szőrszál elongációját és a mátrix keratinocyták proliferációját, valamint fokozott apoptózissal járó katagén transzformációt indukálnak a humán szőrtüszőben (Telek és mtsai, 2007).

A faggyúmirigy és az azt alkotó sebocyták modellje: az SZ95 sejtvonal

A faggyúmirigy (glandula sebacea) a bőr dermisében található holokrin elválasztású mirigy. A szőrtüsző külső gyökérhüvelyének kitüremkedése és a proliferáló gyökérhüvelybimbók differenciálódása során kialakuló alveoláris szerkezetű képlet az esetek többségében a szőrtüszőhöz kapcsoltnak, az úgynevezett pilosebaceus egységet képezve helyezkedik el (**5. ábra**). A test néhány területén, ahol szőrtüszők nem fejlődnek (pl. ajkak, száj sarkai, emlők), a faggyúmirigyek szőrtüsző nélkül fordulnak elő, és kivezetőcsövük közvetlenül a bőr felületére nyílik. Általában azonban több (2-5) acinus egy rövid, közös kivezetőcsővel előbb az úgynevezett canalis pilosebaceusba (szőrcsatornába) nyílik, majd ezen keresztül jut a faggyú (sebum) a bőr felszínére. A faggyú a bőrfelszínen vízhatlan védőréteget képezve hozzájárul a bőr víztartalmának megőrzéséhez. Ezen kívül az állatvilágban például a bunda impregnálása, a hőszigetelés, sőt, a terület megjelölésében, a társak felismerésében szerepet játszó feromonokat is tartalmaz. A faggyúmirigy nem csupán egy evolúciós maradvány, hanem számos parakrin, endokrin és immunológiai funkciójával döntően hozzájárul a bőr normál homeosztatikus működésének kialakításához, és résztvesz azok szabályozásában (Zouboulis és Bohm, 2004; Zouboulis és mtsai, 2008).



5. ábra: A pilosebaceous egység

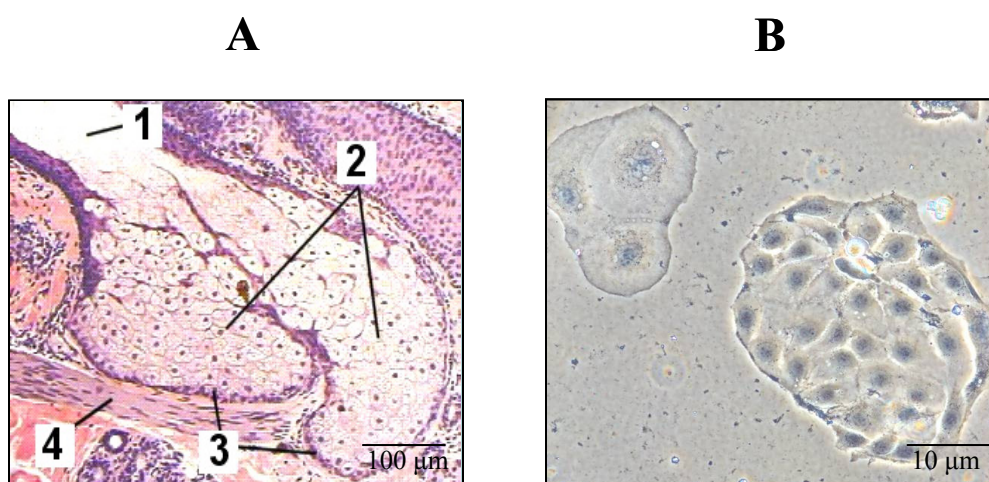
A dermisben található faggyúmirigyek a szőrtüszővel együtt funkcionális egységet alkotnak. A mirigyből a faggyú a szőrcsatornába ömlik, onnan pedig a bőrfelszínre távozik.
Forrás: [www. ishtarskinlights. com/acatalog/acne.html](http://www.ishtarskinlights.com/acatalog/acne.html)

A sebum neutrális lipidekben (főleg di- és trigliceridekben, szabad zsírsavakban, koleszterinben, viaszészterekben és szkvalénben) gazdag váladék, melyet a faggyúmirigy sejtjei, a sebocyták termelnek (Thody és Shuster, 1989). A mirigyek felépítésére (6. A ábra). jellemző, hogy a sejtek végkamrákba, úgynevezett acinusokba csoportosulnak, amelyek széli részén található bazális sejtsor folyamatos proliferáció révén gondoskodik a sejtek utánpótlásáról. A faggyúmirigy mindig a musculus arrector pili tapadása felett helyezkedik el. A bazális sejtsor proliferáló sebocytáiból származó utódsejtek egy része megőrzi osztódó képességét (fenntartva ezáltal a bazális sejtsor állományát), az utódsejtek másik csoportja pedig differenciálódni kezd, miközben folyamatosan az acinus középpontja felé nyomul. A folyamat végén a sejtmembránok feltöredeznek, a sejtek szétesnek, és a citoplazmájukban felhalmozott lipidek (egyéb sejttermeléssel együtt) a sebum alapanyagát alkotva a kivezetőcsövekbe kerülnek. Ezt a mirigysejtek teljes szétesésével járó folyamatot holokrin szekréciónak nevezzük.

Születéskor a faggyúmirigyek erőteljesen aktívak, az acinusok nagyok, a posztnatális élet során aktivitásuk és nagyságuk jelentősen csökken. Pubertás idején ugyanakkor mindkét nemben fokozódik a faggyúmirigyek szekréciós aktivitása, a heréből, illetve a mellékvesekéregből származó androgének hatására. Az ösztrogének hatása ellentétes, ezért a pubertás után nőkben a faggyúmirigyek szekréciója lényegesen alacsonyabb, mint férfiakban. A nagy mennyiségben termelődő sebum beékelődhet a hiperkeratinizációt mutató kivezetőcsőbe, ami a comedo (mitesszer) kialakulásához vezet. A pangó váladékban baktériumok szaporodhatnak el (főként a természetes bőrflorában élő *Propionibacterium acnes* vagy *Staphylococcus epidermidis*), lokális gyulladást okozva ezzel. A háttérben álló komplex szabályozási folyamatok, melyek a sebocyták terminális differenciálódási programját irányítják, a mai napig nincsenek részletesen feltérképezve, pedig a sebocyták

megváltozott proliferációs és differenciációs képessége számos bőrbetegség (mint például a rosacea, a rhinophyma, a seborrhoea vagy az acne vulgaris) etiológiájában játszhat központi szerepet.

A faggyúmirigy funkcióinak feltérképezésében megfelelő kísérletes állatmodell hiányában a kutatások középpontjába a humán sebocyták *in vitro* tenyésztetei kerültek (Zouboulis és mtsai, 1998). Mivel a primer tenyésztetek fenntarthatóságát nagyban limitálja a sejtek alapvető funkciójából adódó sajátságuk, a terminális differenciálódás (Rosenfield, 1989; Fujie és mtsai, 1996), ezért a kutatások számára igen hasznosnak bizonyultak a humán faggyúmirigyből létrehozott sejtvonalak, mint a SEB-1 (Thiboutot és mtsai, 2003), vagy a jelen kísérleteinkben is használt SZ95 (Zouboulis és mtsai, 1999) sejtvonal (**6. B ábra**).



6. ábra: A humán faggyúmirigy (A) és az abból származó SZ95 sebocyták (B)

A: 1. kivezetőcső, 2. lipidcseppekkel telített sebocyták, 3. bazális sejtsor, 4. musculus arrector pili. HE-festés, (Forrás: www.up.ac.za/telemed/Hist/095/095me04.html)

B: A sejtek megőrizték jellegzetes fenotípusos sajátságait (ilyen például a polimorf, epiteliális megjelenés, különböző differenciáltságú sejtek egyidejű jelenléte, differenciálódás során 4-5-szörösére növekvő méret, lipidcseppek a citoplazmában). Fáziskontraszt mikroszkópia (saját felvétel)

Az SZ95 sejtek „előállításához” a plasztikai sebészeti mintákból származó sebocytákat az SV40 vírus „nagy T” antigénjével stabilan transzfektálták. A „nagy T” antigén az SV40 vírus fő onkogénje, amely a transzfektált sejtekben stabil, inaktív komplexet képez olyan fontos a proliferációt gátló, valamint a sejtosztódás kulcslépéseit ellenőrző fehérjékkel, mint például a p53, egyes ciklinek (ciklin A és B) és a p34. Az ily módon immortalizált sebocyták fenotípusos sajátságait megőrizve bizonyítottan jól használhatók a normál humán sebocyták biológiai folyamatainak modellezésére.

Az SZ95 sebocyták a normál humán sebocytákra nagyon jellemző lipideket termelnek (ilyenek például a viaszészterek vagy a szkvalén (Smith és Thiboutot, 2008)) és expresszálják ezen sejtek citokeratin markereit is (citokeratin 7, 13, 19) (Zouboulis és mtsai, 1999).

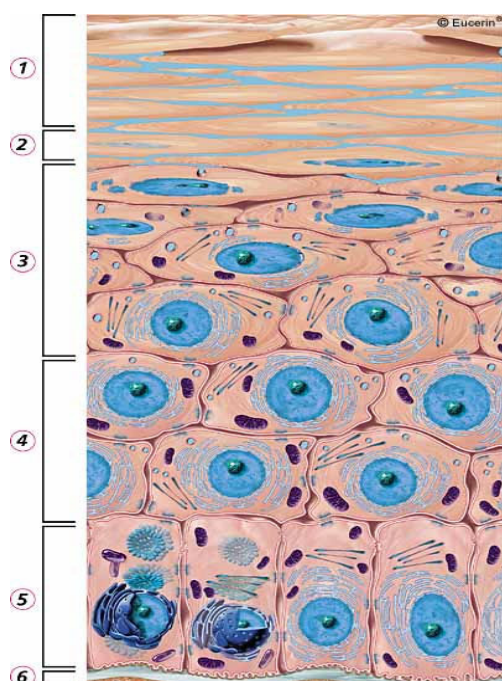
Az immortalizált SZ95 sejtekkel végzett *in vitro* kísérletek során sikerült fényt deríteni például arra is, hogy a sejtek terminális differenciálódását kísérő lipidfelhalmozódás kialakulásában a peroxiszóma proliferátor aktiválta receptoroknak (PPAR) is fontos szerepük van (Rosenfield és mtsai, 1998; Chen és mtsai, 2003; Trivedi és mtsai, 2006). A nukleáris receptorok közé tartozó PPAR-ok központi szerepet játszanak a lipidanyagcsere szabályozásában számos szövet sejtjeiben (Desvergne és Wahli, 1999; Lee és mtsai, 2003). A sebocyták differenciálódása a PPAR ligandok mellett arachidonsavval (AA) is indukálható, minek hatására fokozódik a lipidek felhalmozódása és a sejtek apoptózisa (Wróbel és mtsai, 2003). Alestas és munkatársai arról számoltak be (2006), hogy az AA más gyulladásos mediátorok, valamint proinflammatorikus citokinek termelődését is képes fokozni az SZ95 sejt kultúrákban. Kimutatták, hogy képesek különböző citokinek (interleukin IL-6, IL-1 β , tumor necrosis factor- α , TNF- α), valamint lipid természetű gyulladásos mediátorok (leukotrién LTB₄, prosztaglandin PGE₂) termelésére, aminek szabályozásában a PPAR-ok szintén szerepet játszhatnak (Alestas és mtsai, 2006; Zhang és mtsai, 2006).

A humán epidermális keratinocyták és modelljük: a HaCaT sejt vonal

A keratinocyták a bőr legkülső rétegében, az epidermisben elhelyezkedő sejtek, és annak létrehozásáért, valamint fenntartásáért felelősek. Feladatuk a külső környezet és a test belső része közötti olyan fiziko-kémiai barrier kialakítása, mely védelmet nyújt a külvilág káros hatásaival szemben. A keratinocyták a barrier állandóságának biztosítása és fenntartása érdekében folyamatosan proliferálnak, majd differenciálódnak, és kialakítják az epidermis jellemző rétegeit (**7. ábra**) (Fuchs, 1990).

A sejtek proliferációja a stratum basale rétegében történik. A rétegből felfelé helyeződő sejtekben beindul az apoptózis folyamata és különböző citoszkeletális fehérjéket kezdenek felhalmozni. A keratinképződés a stratum spinosum felső sejt soraiban kezdődik és az ezt követő sejt sorokban folytatódik, majd a keratinizáció végeredményeként a legfelső, elhalt sejteket tartalmazó réteg, a stratum corneum jön létre. A felsőbb rétegben, a stratum granulosumban a differenciálódás során speciális proteinek, differenciálódási markerek jelennek meg, mint például a keratin 17, a fillagrin (Harding és Scott, 1983), a loricrin és az involucrin (Watt, 1983). Ezeket a fehérjéket egy keratinocyta-specifikus transzglutamináz kapcsolja össze izopeptid kötéseket létrehozva, így a terminális differenciálódás alkalmával a

keratinocyták plazmamembránja alatt kialakul az úgynevezett cornified envelope (Thacher és Rice, 1985). A granuláris réteg felett a sejtek olyan sűrűn összezsúfolódnak, hogy összeragadnak és a magjukat elvesztik; ezáltal a sejtek megkülönböztethetetlenek egymástól. A sejtek egy fénytörési kapacitással rendelkező anyagot, eleidint tartalmaznak. Ez a rétegnek áttetsző megjelenést kölcsönöz – innen ered a világos réteg, a stratum lucidum elnevezés. Mire a sejtek eléri a stratum corneumot, a lapos, mag nélküli elhajt sejtek teljes mértékben keratinizálódnak. A sejtek között epidermális sejtek helyezkednek el. A rétegekből a felszínhez legközelebb eső sejtek rendszeresen leválnak a hámlás folyamata során. A sejtek szorosan összezsúfolt belső rétegei permeabilitási barriert alkotnak, amely megvédi a bőrt a környezeti tényezőkkel szemben (Fuchs, 1990).



7. ábra: Az epidermis.

A bazális sejtek a differenciálódás során mag nélküli lapos hámsejtté alakulnak.

1. Szaruréteg (stratum corneum)
2. Világos sejtek rétege (stratum lucidum)
3. Granuláris réteg (stratum granulosum)
4. Tüskés sejt réteg (stratum spinosum)
5. Bazális sejtréteg (stratum basale)
6. Bazális membrán

Forrás: <http://www.eucerin.hu/skin>

A keratinocytákra jellemző, hogy számos, az auto-, para- és endokrin szabályozásban kulcsfontosságú szerepet játszó mediátor szintézisére is képesek (Bos és Kapsenberg, 1993). *In vivo* és *in vitro* körülmények között is például számos citokint és növekedési faktort – így pl. IL-1, IL-8, granulocita-macrophag colony stimulating factor (GM-CSF), TNF- α , nerve growth factor (NGF), platelet-derived growth factor (PDGF) – termelnek bizonyos ingerek (pl. UV-sugárzás, tumor promóterek) hatására (Bos és Kapsenberg, 1993; Mitev és Miteva, 1999). A felszabadult anyagok bizonyos sejteket (pl. neutrophil granulocyták, memória T sejtek) aktiválhatnak, így a keratinocyták fontos szerepet játszanak a bőrbe került kórokozók

és antigének által kiváltott immunválasz kialakításában (Barker és mtsai, 1991), emellett megfelelő receptorhoz kötődve jelátviteli útvonalakat (pl. tirozin-kináz) indíthatnak be, mely útvonalak egymással kapcsolódva bonyolult hálózatokat alkothatnak.

A humán bőrrel foglalkozó kutatások során gyakran felmerül az a probléma, hogy az NHEK sejtek a primer tenyészetükben beinduló differenciálódás során az apoptotikus folyamatoknak köszönhetően gyorsan elhalnak. Ezért szükségessé vált egy olyan sejtvonal megalkotása, ami *in vitro* jó modellje az NHEK sejtfolyamatainak, ugyanakkor hosszútávon tenésztethető illetve fenntartható. Ezért Boukamp és munkatársai 1988-ban létrehozták a HaCaT sejtvonalat, melynek a neve a „Human Adult skin keratinocytes, low Ca²⁺, elevated Temperature” rövidítéséből ered. A sejteket egy 62 éves, melanómában szenvedő férfibeteg tumorosan nem infiltrált bőrterületéből izolálták. A sejteket alacsony extracelluláris kalciumkoncentráció mellett magasabb hőmérsékleten tartották, ennek hatására azok spontán immortalizálódtak. A sejtek bizonyítottan nem szenvedtek malignus transzformációt, ugyanakkor *in vitro* proliferációs kapacitásuk, valamint *in vivo* tumorgenikus potenciáljuk megnövekedett a differenciálódási képességük rovására (Breitkreutz és mtsai, 1991; Fusenig és Boukamp, 1998). Mindezen változások ellenére a HaCaT sejtek számos, a NHEK-ra jellemző működési sajátosságot mutatnak (sejtfelszíni adhéziós molekulák, MHC receptorok, valamint komplement receptorok expressziója, citokinek termelése), így a NHEK egyik legjobb modelljének tekinthetők olyan folyamatok tanulmányozásában, mint a proliferáció, transzformáció és a tumorprogresszió (Fusenig és Boukamp, 1998; Schoop és mtsai, 1999).

Célkitűzések

Laboratóriumunk korábbi kísérletei során sikerrel igazolta az endocannabinoid rendszer bizonyos tagjainak – pl. cannabinoid receptorok, endocannabinoidok (anandamid, 2-AG) – funkcionális jelenlétét a szőrtüsző különféle elemeiben (Telek és mtsai, 2007). Ständer és munkatársai emellett 2005-ben kimutatták a bőr számos függelékének, többek között *in situ* faggyúmirigy sebocytáinak CB1 és CB2 immunpozitivitását. Azonban a rendszer szerepét ezidáig még nem sikerült tisztázni a pilosebaceous egység ezen másik tagján.

Fontos hangsúlyoznunk, hogy a faggyúmirigyben számos, az anandamidhoz hasonló zsírsav található (Smith és Thibout, 2008). Emellett a faggyúmirigy az egyik legfontosabb szerepet játsza a bőr homeosztázisában, mely homesztatikus viszonyok felborulása olyan nagy prevalenciájú bőrbetegség kialakulását vezethet, mint pl. az acne vulgaris. Mivel, reményeink szerint, az acne terepiájának fejlesztésében, fontos szerepet játszhat a cannabinoid

rendszer sebocytákon való jelenlétének tisztázása, kísérleteink első felében a faggyúmirigyet, illetve az abból származtatott SZ95 sebocyta sejtvonalat tanulmányoztuk. A vizsgálatok során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- ❖ A humán faggyúmirigyekhez hasonlóan kifejeződik-e a CB1 és/vagy a CB2 receptor az SZ95 sebocytákon?
- ❖ Hogyan befolyásolják az endocannabinoidok a sebocyták olyan alapvető biológiai folyamatait, mint az életképesség, a proliferáció és a differenciálódás (faggyútermelés)?
- ❖ Mely receptor(ok) közvetítésével fejtik ki celluláris hatásukat az endocannabinoidok?
- ❖ Milyen jelátviteli útvonalak/génexpressziós változások közvetíthetik az endocannabinoidok hatásait?

Habár a cannabinoid receptorokat és az endocannabinoid AEA metabolizmusában szerepet játszó enzimeket korábban epidermális keratinocytákon is leírták (Maccarrone és mtsai, 2003), a Bevezetés fejezetben említett számos tudományos eredmény dacára nem áll rendelkezésünkre pontos információ az endocannabinoidok szerepéről a keratinocyták növekedésének szabályozásában. Ezért kísérleteink második felében az AEA humán epidermális keratinocyták életfolyamataira gyakorolt szabályozó szerepét vizsgáltuk *in vitro* és *in situ* körülmények között. A vizsgálatok során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- ❖ Hogyan befolyásolja az AEA a primer NHEK, illetve az azok modelljéül szolgáló immortalizált HaCaT keratinocyták alapvető életfolyamatait?
- ❖ Az AEA *in situ* körülmények között is képes kifejteni celluláris hatásait?
- ❖ Mely receptor(ok) közvetítésével, illetve milyen jelátviteli útvonalakon keresztül fejtik ki hatásait az AEA?

A fenti kérdésekre kombinált farmakológiai eljárások és molekuláris biológiai technikák felhasználásával végzett kísérleteinkben kerestük a válaszokat.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteinkben alkalmazott kémiai anyagok

A kísérletek során alkalmazott AEA, 2-AG, ACEA, AM-251, iodo-reziniferatoxin (I-RTX), kapszaicin (CAPS), kapszazepin (CPZ) és GF109203X (GF) a Sigma-Aldrich-től (Taufkirchen, Németország), míg a JWH-015 és a GW9662 a Cayman Chemical Company-től (Ann Arbor, Michigan, USA) származott. A PD098059-et és a Wortmannint a Calbiochem-től (Nottingham, Egyesült Királyság), az AM630-at pedig a Tocris Bioscience-től szereztük be (Ellisville, Missouri, USA). A felsorolt anyagokból abszolút etanolban (Spektrum-3D, Debrecen, Magyarország) oldva 1000-szeres töménységű törzsoldatokat készítettünk, amit 20°C-on tároltunk. A törzsoldatokból közvetlenül a kezelések előtt készítettük el a szükséges koncentrációkat a sejtek tenyésztő oldatában 1000-szeres hígítást alkalmazva. Így az oldószer koncentrációja a kezelések folyamán maximum 0,1% volt. A kísérletek során kontrollként az önmagában alkalmazott oldószer azonos hígítását használtuk.

Az SZ95 sebocyták tenyésztése

A humán faggyúmirigy sejtjeiből származó SZ95 sejteket (Zouboulis és mtsai, 1999) Sebomed Basal Medium-ban (Biochrom, Berlin, Németország) tenyésztettük, amelyet 10%, hővel inaktivált embrionális borjú szérummal (FBS) (Invitrogen, Paisley, Egyesült Királyság), 1 mM CaCl_2 -dal, 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktorról (Sigma-Aldrich), valamint 50 IU/ml penicillinnel és 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinnel (mindkettő TEVA, Debrecen, Magyarország) egészítettük ki. A tenyésztést 5% CO_2 tartalmú légtérben, 37 °C-on végeztük. A tápoldatot kétnaponta lecseréltük, majd a sejteket a 80-90%-os konfluenciaszint (szubkonfluens állapot) elérésekor passzáltuk, elkerülve ezáltal is a sejtek idő előtti terminális differenciálódását.

Az NHEK sejtek és a HaCaT keratinocyták tenyésztése

Az NHEK tenyésztéséhez a bőrminták plasztikai műtéten átesett nőkből származtak. A keratinocytákat éjszakai diszpáz II (2.4 U/ml, Roche Diagnostics, Germany) történő inkubálás után tripszines emésztéssel szeparáltuk. Az NHEK sejteket EpiLife szérumban mentes keratinocytá médiumban (Invitrogen) tenyésztettük, melyet 1 μM inzulinnal, 1 μM kortizollal

(mindkettő Sigma-Aldrich), 100 µg/ml streptomycinnel, 100 IU/ml penicillinnel, 50 ng/ml amphotericin B-vel (mind TEVA), 0,4% borjú hypophysis kivonattal (Invitrogen) és 0,06 mM CaCl₂-dal (Sigma-Aldrich) egészítettünk ki. A tenyésztést 5% CO₂ tartalmú légtérben, 37°C-on végeztük. A tápoldatot két-háromnaponta lecseréltük, a sejteket a 60-70%-os konfluenciaszint elérésekor passzáltuk.

A HaCaT keratinocytaikat 10% FBS-t, 2 mM L-glutamint (mindkettő Invitrogen), 50 U/ml penicillint és 50 µg/ml streptomycint (mindkettő TEVA) tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle's tenyésztőoldatban (DMEM, Sigma-Aldrich), 5% CO₂ tartalmú légtérben, 37 °C-on tenyésztettük. A tápoldatot két-háromnaponta lecseréltük, a sejteket a 70-80%-os konfluenciaszint elérésekor passzáltuk.

Az SZ95 sejtek endocannabinoid tartalmának meghatározása

A sejtek endocannabinoid tartalmának meghatározását kollaborációs partnereink végezték tömegspektrometria segítségével. A kromatográfiás mérések Agilent 1100 sorozatszámú, LC-MSD készülékkel készültek. Az eszköz az AEA, a ²H₄-AEA és a 2-AG mennyiségét mérte. A sejtek AEA és a 2-AG tartalmának meghatározása fordított lineáris regressziós eljárással történt. A kapott értékeket fmol/mg és pmol/mg nedves szövet mértékegységben adtuk meg (Bátkai és mtsai, 2007; Telek és mtsai, 2007).

Immuncitokémia

A sejteket 24 lyukú tenyésztőedénybe helyezett steril fedőlemezekben tenyésztettük és 5 perces acetonos fixálást követően 0,1%-os foszfát pufferben (PBS) oldott Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) oldattal permeabilizáltuk (10 perc) szobahőmérsékleten. Ezután PBS-sel mostuk a fedőlemezeket, majd 1%-os, foszfátpufferben (PBS) oldott borjú szérum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) oldattal blokkoltuk az aspecifikus kötőhelyeket. A sejteket ezután egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on a CB1- és CB2-ellenes, valamint nyúlban termeltetett TRPV1-ellenes elsődleges antitestekkel – hígítások: a CB1-nél 1:150, a CB2-nél 1:200 (Cayman), míg a TRPV1 esetén 1:100 blokkoló oldatban (Sigma-Aldrich). A sejteket tartalmazó fedőlemezeket másnap háromszor mostuk PBS-ben, majd 60 percen keresztül inkubáltuk 37 °C-on kecskében termeltetett, fluoreszcein-izothiociáttal (FITC) konjugált, nyúl immunglobulin Fc-szakasza elleni másodlagos antitesttel (1:200 arányban PBS-ben hígítva; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Végül, újabb háromszori PBS-es mosást

követően, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) fluoreszcens magfestőt tartalmazó Vectashield fedőmédiummal (Vector Laboratories) lefedtük a lemezeket, majd a sejtekről Nikon Eclipse E600 típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk (Nikon, Tokió, Japán). Negatív kontrollként azokat a megfestett fedőlemezeinket használtuk, melyeken az antitesteket szintetikus blokkolópeptiddel együtt alkalmaztuk.

Immunhisztokémia

A CB1 és CB2 humán faggyúmirigyben történő kimutatására szolgáló szövetminták plasztikai sebészeti beavatkozásokból származtak, a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával. 24 órás 4%-os formalinos fixálást követően a paraffinba ágyazott szövetdarabokból 4 µm-es metszeteket készítettünk. A deparaffinálást, majd az antigénfeltárást követően (8 mM TrisHCl puffer, pH 8,4; 15 perc mikrohullámú sütőben, 750 W), a szövetben előforduló endogén peroxidázok blokkolását peroxidáz blokkoló oldat segítségével végeztük el (DAKO, Glostrup, Dánia) (10 perc, szobahőmérséklet). A Protein Block szérumentes reagenssel (DAKO) történő, 5 perces, szobahőmérsékleten végzett inkubáció az elsődleges antitest nonspecifikus kötődésének gátlására szolgált. A metszeteket a CB1- és CB2-ellenes antitesttel (CB1 esetén 1:150, CB2 esetén 1:200; Cayman) egy éjszakán át inkubáltuk, majd nyúl immunglobulin Fc-szakasza elleni EnVision+®-nel (DAKO) inkubáltuk 30 percen keresztül szobahőmérsékleten. Az EnVision+® rendszer egy biotin-független előhívási mód, amely jól használható immunhisztokémiai reakciók során, mivel kevés műtermékkel jár. A módszer egy konjugált biopolimer alkalmazásán alapul: az immunreakciót a DAKO Cytomation EnVision+® System/HRP rendszerével erősítjük fel, amely egy másodlagos antitestekkel és tormaperoxidáz (HRP) enzimekkel konjugált dextrán szál. A peroxidáz-aktivitás kimutatására diamino-benzidint (DAB) (Vector Laboratories), míg magfestésre Mayer-féle hematoxilint (Sigma-Aldrich) használtunk. A reakció specificitásának ellenőrzésére negatív kontrollként az elsődleges antitestet szintetikus blokkolópeptiddel (Cayman) inkubáltuk. A metszetekről Nikon Eclipse E600 típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével készítettünk felvételeket.

In situ „skin organ culture”

Az epidermális keratinocyta *in situ* vizsgálatát kollaborációs partnereink végezték. A humán bőrből származó meghatározott méretű fragmenteket szérumban William's E Mediumban

(Biochrom) tenyésztették, kiegészítve 2 mM L-glutaminnal 10 ng/ml hydrocortisonnal (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml insulinnal és penicillin/streptomycin elegyével (PAA Laboratories, Pasching, Ausztria) (Lu és mtsai, 2007; Tiede és mtsai, 2009). A tenyészetekben a proliferáló és az apoptotikus sejtek egy idejű kimutatására a Ki-67/TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) kettős festést alkalmaztak (Foitzik és mtsai, 2000; Lindner és mtsai, 2000). Az eljárás során az osztódó sejtek jelenlétéről a Ki-67 proliferációs marker immunhisztokémiai kimutatása ad felvilágosítást, az apoptotizáló sejtek megjelenítése pedig a DNS-fragmentáció során keletkezett szabad 3' végek jelölésén alapul. A kísérleti protokoll szerint a kettős festéshez a fagyasztott metszeteket 1%-os paraformaldehidben és etanol-jégecet 2:1 arányú oldatában fixálták. Első lépésként a metszeteket reakciópuffer–terminális deoxinukleotidil transzferáz (TdT) enzim (mindkettő ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit, Intergen, NY, USA) 70-30%-os elegyével inkubálták 37 °C-on 60 percen keresztül, mely során a TdT enzim a reakciópufferben található digoxigenin jelölt nukleotidokat az apoptotikusan fragmentált DNS 3' OH végeihez kapcsolta. A reakció leállítása és 10%-os kecske normál szérumos (DAKO, PBS-ben) kezelést követően a metszeteket egy éjszakán át inkubálták egérben termeltetett Ki-67 ellenes antitesttel (1:20, 2% kecske normál szérum jelenlétében). Utolsó lépésként a digoxigenin-jelölt DNS-fragmentumokhoz FITC-konjugált digoxigenin-ellenes antitestet kapcsoltak (TUNEL kit), a Ki-67 ellenes antitesthez pedig Texas Red-del jelölt kecske-ellenes IgG-t (1:200, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) kötöttek, végül DAPI-val magfestést végeztek. A TdT enzim, illetve a Ki-67 ellenes antitest elhagyása szolgált a festés negatív kontrolljaként.

Western blot

A cannabinoid receptorok és a TRPV1 protein szintű kimutatását a laboratóriumunkban korábban alkalmazott protokollnak megfelelően (Bíró és mtsai, 1998; Papp és mtsai, 2003) végeztük. A tenyésztett sejteket hideg PBS-ben mostuk, lízis-pufferben [20 mM TRIS-HCl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid, 20 µM leupeptin, pH 7,4 (Sigma-Aldrich)] homogenizáltuk, majd jégen ultrahangos feltárást (szonikálás) végeztünk. Az így nyert lizátumok proteintartalmát módosított BCA protein assay-vel (Pierce, Rockford, IL, USA) határoztuk meg. A fehérjetartalmat SDS-mintapufferrel (5% β-merkaptóetanol, 10% glicerin, 2% Na-dodecil-szulfát (SDS), 0,062 M Tris, 20 mM ditiotritol, 0,0025 g brómfenolkék, mind Sigma-Aldrich) 2 mg/ml-re állítottuk be, majd 10

perces főzéssel denaturáltuk, végül felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Kísérleteink során SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE), mintánként 60 µg proteint választottunk szét 7,5%-os gélen 100 V konstans feszültséggel. Ezután a fehérjéket BioBond nitrocellulóz membránra (Whatman, Maidstone, Egyesült Királyság) transzferáltuk, 2x45 percen keresztül, 100 V konstans feszültséggel. A membrán szabad kötőhelyeit 5% sovány tejport tartalmazó PBS-ben (5% tej-PBS) 30 percig blokkoltuk. Ezután a membránokat 5%-os tej-PBS-ben hígított nyúlban termeltetett elsődleges CB1- és CB2- (Cayman), valamint nyúlban termeltetett TRPV1-ellenes antitesttel (Sigma-Aldrich) (CB1 esetén 1:150, CB2 esetén 1:200, TRPV1 esetén 1:100), nyúlban termeltetett Erk-1/2 ellenes (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), valamint egérben termelt foszforilált Erk-1/2 ellenes elsődleges antitesttel (pErk-1/2, Santa Cruz) inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on (1:1500 mindkét antitest esetén). A membránok 3x10 perces mosását (PBST, 0,1% Tween-20 PBS-ben, Sigma-Aldrich) követően azokat – a TRPV1 kivételével, melyet HRP-konjugált nyúlban termeltetett kecske ellenes IgG-vel fedtünk (1:1000, Bio-Rad, Hercules CA, USA) – a fentebb leírt elven működő nyúl-, illetve egér-ellenes EnVision+®-nel (DAKO) inkubáltuk 30 percen keresztül. Az immunjeleket minden esetben kemilumineszcens SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Pierce, Rockford, IL, USA) segítségével tettük láthatóvá, Intelligent Dark Box (Fujifilm, Tokió, Japán) készülék felhasználásával. A kemilumenszcencia intenzitását az optikai denzitás meghatározásával számszerűsítettük Image Pro Plus 4.5.0 szoftver (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) segítségével. Annak megállapítására, hogy a minták felvitele egyformán történt-e, belső kontrollként a citokróm C expresszióját vizsgáltuk. A membránokat ezután egérben termeltetett citokróm C ellenes antitesttel (1:100 tej-PBS) (Santa Cruz) festettük meg, majd az előzőekhez hasonlóan elemeztük az intenzitásokat.

Szemi-kvantitatív reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)

A CB1, a CB2 és a TRPV1 mRNS szintű expresszióját szemi-kvantitatív RT-PCR (Bodó és mtsai, 2004) segítségével mutattuk ki. A reverz-transzkripció során a teljes RNS 2 µg-ját 10 percre 70 °C-ra melegítettük, majd jégen gyorsan lehűtöttük és hozzáadtuk a következő oldatokat: 1x reverz transzkriptáz puffer (10 mM TrisHCl, pH=9), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100), 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 0,05 IU/µl rekombináns RNasin ribonukleáz inhibitor, 1 IU/µl AMV reverz transzkriptáz és 0,5 µg/ml random primer (mind Promega, Madison, WI, USA). A reakcióelegyet 42 °C-on 15 percig, 95 °C-on 5 percig, végül 4 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd az elegy aliquotjait használtuk a PCR reakció templájaként a

következő, specifikus primerek segítségével (mind Invitrogen): CB1 forward: CAAGCCCGCATGGACATTAGGTTA, reverz: TCCGAGTCCCCCATGCTGTTATC; CB2 forward: TCCCACTGATCCCCAATGACTACC, reverz: AGGATCTCGGGGCTTCTTCTTTTG; TRPV1 forward: CTCCTACAACAGCCTGTAC; reverz: AAGGCCCAGTGTTGACAGTG; glyceraldehyd 3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) forward: ATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC, reverz: GCTGACAATCTTGAGGGAGT. A PCR reakciót GeneAmp® PCR System 2400 DNA Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük és az alábbi hőprofil alkalmaztuk: 94 °C 2 perc; majd 94 °C 1 perc, 65 °C 1 perc, 72 °C 90 másodperc 35 cikluson keresztül; végül 72 °C 10 perc. A termékeket ethidium-bromidot (0,5 mg/ml, Sigma-Aldrich) tartalmazó 1,5 %-os agaróz gélen választottuk el, UV-fény alatt tettük láthatóvá, majd az analízist Image Pro Plus 4.5.0 szoftver felhasználásával végeztük.

Kvantitatív valós idejű PCR (Q-PCR)

A Q-PCR kivitelezése az ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) segítségével történt, az 5' nukleáz módszer felhasználásával. A teljes RNS 2 µg-jából kiindulva 15 IU AMV reverz-transzkriptázt (Promega) és 0,025 µg/µl random primert (Promega) felhasználva állítottunk elő cDNS-t. A PCR amplifikáció TaqMan primerek és próbák alkalmazásával történt (Assay ID: PPAR α forward: CATTACGGAGTCCACGCGT, reverz: ACCAGCTTGAGTCGAATCGTT, PPAR α próba FAM-AGGCTGCAAGGGCTTCTTTCGGCG-TAMRA; PPAR δ forward: AGCATCCTCACCGGCAAAG, reverz: CCACAATGTCTCGATGTCGTG, PPAR δ próba FAM-CAGCCACACGGCGCCCTTTG-TAMRA; PPAR γ forward: GATGACAGCGACTTGGCAA, reverz: CTTCAATGGGCTTCACATTCA, PPAR γ próba FAM-CAACCTGGGCGGTCTCCACTGAG-TAMRA; adipose differentiation-related protein (ADRP) forward: TGACTGGCAGTGTGGAGAAGA, reverz: ATCATCCGACTCCCCAAGA, ADRP próba FAM-TCTGTGGTCAGTGGCAGCATTAACACA-TAMRA; PPAR γ -regulated angiopoietin-related protein (PGAR) forward: TCCGCAGGGACAAGAACTG reverz: CGGAAGTACTGGCCGTTGA, PGAR próba FAM-TTGGAATGGCTGCAGGTGCCA-TAMRA; cyclooxygenase-2 (COX-2) (Applied Biosystems, assay ID: Hs00153133_m1). Belső kontrollként humán cyclophilin-A-t használtunk (forward: ACGGCGAGCCCTTGG, reverz: TTTCTGCTGTCTTTGGGACCT, próba FAM-

CGCGTCTCCTTTGAGCTGTTTGCA-TAMRA). A relatív expressziókat a cyclophilin-A-expresszióra vonatkoztatva a Δ CT módszert alkalmazva adtuk meg.

A CB1, a CB2 és a TRPV1 mRNS szintű vizsgálatokor a teljes RNS 3 μ g-jából kiindulva állítottunk elő cDNS-t, majd alábbi primereket és próbákat tartalmazó TaqMan assay-eket használtuk: CB1 assay ID: Hs00275634_m1; CB2 assay ID: Hs00361490_m1; TRPV1 assay ID: Hs00218912_m1, mind Applied Biosystems). A relatív expressziókat a belső kontrollként használt glyceraldehid 3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH: Hs99999905_m1, Applied Biosystems) expresszióra normalizáltuk.

A sejtek életképességének meghatározása

A viabilitás vizsgálatokor kolorimetriás MTT assay-t alkalmaztunk. A módszer lényege, hogy a sárga színű metilthiazol-tetrazólium-bromid (MTT) (3-{4,5-dimetilthiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazólium bromid) (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 20000 sejt/lyuk denzitásban, majd a megfelelő anyagok különböző koncentrációival kezeltük őket meghatározott ideig (általában 1-4 napig). A tenyésztőoldat eltávolítása után minden lyukba 100 μ l 0,5 mg/ml végkoncentrációjú MTT oldatot pipettáztunk [PBS-ben vagy a sebocyták esetében szérumentes Sebomed Basal Mediumban feloldva (Biochrom)], majd 37°C-on 3 órán át inkubáltuk a sejteket. Ezután az MTT oldatot eltávolítottuk, és minden lyukhoz 100 μ l „MTT szolubilizáló oldatot” [81 v/v% 2-propanol, 9 v/v% 1 M HCl, 10 v/v% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)] adtunk, majd tizenöt percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket közepesen intenzív rázatás mellett. Így a sejtekben keletkező formazán kristályokat feloldottuk, koncentrációjukat pedig kolorimetriás úton határoztuk meg 550 nm-en. A mért abszorbancia arányos az élő sejtek számával, amit a kontroll százalékában adtunk meg. A kontrollhoz viszonyított növekményt a sejtprolifерáció fokozódásaként értelmeztük, míg a kontrollhoz viszonyított csökkenés esetén további vizsgálatokat végeztünk annak megállapítására, hogy csak a proliferáció gátlásáról, vagy a sejtek pusztulásáról van-e szó. Minden kezelést 3-5 alkalommal ismételtünk meg, míg az adatokat átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg.

Az apoptotikus folyamatok vizsgálata

Az apoptózis vizsgálatára számos módszer áll rendelkezésünkre laboratóriumunkban. Ekert és munkatársai 1999-ben dolgozták ki azt az eljárást, amelyen a pro-apoptotikus kaszpázok aktivitásának fluorimetriás mérése alapul (Poly Caspases Detection Kit, Invitrogen). A karboxyfluorescein csoporttal (FAM) ellátott reagens a sejtmembránon áthatolva (FLICA™ = Fluorescent-Labeled Inhibitor of CASpases) kovalens kötést képes kialakítani az aktiválódott kaszpáz aktív centrumával, fluoreszcensen jelölve azt. A keratinocytákat 96-lyukú fekete falú átlátszó aljú lemezekben (Grenier Bio-One, Frickenhausen, Németország) tenyésztettük, és 24 órán keresztül kezeltük az anyagok különböző dózisaival. A gyártó utasításainak megfelelően eljárva, 30x-os FLICA törzsoldatból 1x-es FLICA munkaoldatot készítettünk tápoldatban, amiben a sejteket 1 órán keresztül inkubáltuk. Az inkubációt követően a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd FlexStation³⁸⁴ II FLuorescence Image microPlate Reader (FLIPR, Molecular Devices, San Francisco, CA USA) segítségével 490 nm-en gerjesztve, 530 nm-en detektáltuk a fluoreszcencia intenzitást.

Az apoptózis vizsgálatára szolgáló további módszerünk az Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich). A technika elve azon alapul, hogy az apoptotikus sejtek membránjában externalizálódó foszfátidil-szerinhez specifikusan fluoreszcensen jelölt annexin kötődik, melynek fluoreszcencia intenzitását mérni tudjuk (Kuypers és mtsai, 1996; van Engeland és mtsai, 1998). A keratinocyták esetén a sejteket fekete falú, átlátszó aljú 96 lyukú lemezekre (Greiner Bio-One) szélesztettük, és kezeltük a különböző vegyületekkel. Az Annexin V-öt 1:100 arányban 1x-es binding pufferben hígítottuk a gyártó protokolljának megfelelően, majd ezzel a sejteket 15 percig inkubáltuk. A PBS-sel történt mosást követően a fluoreszcencia intenzitást 490 nm-es hullámhosszon gerjesztve és 520 nm-en detektálva mértük FLIPR (Molecular Devices) segítségével.

A mitokondriális membránpotenciál-csökkenés detektálása szintén a korai apoptotikus folyamatok kimutatásának egyik szenzitív módszere (Green és Reed, 1998; Susin és mtsai, 1998). Kísérleteinkben ezért a különböző farmakonokkal történő kezelések után elvégeztük a sejtek mitokondriális membránpotenciáljának fluorimetriás mérését a MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit (Molecular Probes-Invitrogen) segítségével. A kísérlet során alkalmazott festék a mitokondriális membránpotenciál nagyságának függvényében akkumulálódik a sejtek mitokondriumaiban, ezért a korai apoptotikus jeleket mutató sejtekben csökkent fluoreszcencia intenzitást detektálhatunk. A sejteket 20000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük fekete falú, átlátszó aljú 96 lyukú lemezekre (Greiner Bio-One), majd az adott anyagok

különböző koncentrációival 1-2 napig kezeltük őket. A felülúszó eltávolítása után a sejteket 30 percig inkubáltuk 37 °C-on DiIC₁(5) munkareagenssel (50 µl/lyuk) a gyártó által megadott protokoll szerint (1:200-as hígítás szérumentes tápoldatban), majd PBS-sel kétszer mostuk őket. A fluoreszcencia intenzitást 630 nm-es hullámhosszon gerjesztve és 670 nm-en detektálva mértük FLIPR segítségével. Minden kezelést 3-5 alkalommal ismételtünk meg, míg a relatív fluoreszcenciát a kontroll százalékában, átlag±SEM formában adtuk meg.

A cytotoxicitás/sejtnekrózis vizsgálata

Az akut (24 órás) kezelés cytotoxikus hatásának vizsgálata a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD) enzim felszabadulásának mérésével történt. A sejthalál mértékét egy kétlépéses enzimatis folyamat segítségével határoztuk meg, melynek során a resazurin redukcióján keresztül narancs-fluoreszcens resorufin képződött (G6PD Cytotoxicity Assay Kit – Invitrogen). A sejteket 96-lyukú fekete falú átlátszó aljú lemezekben (Grenier Bio-One) tenyésztettük, és 24 órán keresztül kezeltük az anyagok különböző dózisaival. A kétszeres töménységű reakcióoldatot a gyártó protokollja alapján állítottuk össze, és 1:1 arányú hígításban adtuk a sejtekről eltávolított médiumhoz, majd 37 °C-on húsz percig inkubáltuk. A keletkező resorufin mennyiségét FLIPR segítségével, 545 nm excitációs és 590 nm emisszós hullámhossz mellett detektáltuk.

A sejtekből felszabaduló G6PD aktivitása 24 óra után jelentősen csökkenhet, ezért a hosszútávú kezelések esetleges cytotoxikus hatását SYTOX Green (Molecular Probes-Invitrogen) jelöléssel vizsgáltuk. A festék csak a nagymértékben sérült, dezintegrálódott plazma-, illetve magmembránon keresztül képes bejutni a sejtmagba, ahol azután a duplaszálú DNS-hez kötődik; így az ép sejtmembránnal rendelkező sejtekbe a festék nem képes bejutni. Mindez tehát azt jelenti, hogy a nekrotikus sejtek esetében magas fluoreszcencia intenzitást detektálhatunk, míg az ép sejtmembránnal rendelkező sejtek esetében ez az érték alacsonynak adódik. A sejteket fekete falú, átlátszó aljú 96 lyukú lemezekre (Greiner Bio-One) szélesztettük 20000 sejt/lyuk denzitásban, majd a megfelelő anyagok különböző koncentrációival két napig kezeltük őket. Ezt követően a felülúszót eltávolítottuk, majd a sejteket szérumentes tápoldatban hígított SYTOX Green (Invitrogen) reagenssel (végkoncentráció 1 µM) 30 percen át 37 °C-os hőmérsékleten inkubáltuk (50 µl/lyuk). Az inkubációt követően a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd FLIPR segítségével 490 nm-en gerjesztve, 520 nm-en detektáltuk a fluoreszcencia intenzitást. Minden kezelést 3-5-szörös ismétléssel végeztünk, a relatív fluoreszcencia intenzitást a kontroll százalékában átlag±SEM

formában adtuk meg. A SYTOX Green, illetve az apoptózis vizsgálatához használt DilC₁(5) festék eltérő gerjesztési és detektálási spektrumának köszönhetően, valamint a festési protokollok nagyfokú hasonlósága következtében az apoptotikus folyamatokat, illetve a sejtnekrózist lehetőségünk nyílt – a két festéket egyszerre adva a munkaoldatunkhoz – ugyanabban a mintában megvizsgálni. Összehasonlító vizsgálatokat követően megállapítottuk, hogy a festékek egy időben történő használata nem okoz jelentős különbséget a csak egyetlen festéket tartalmazó munkaoldattal elvégzett mérésekkel összehasonlítva. További kísérleteink során tehát a SYTOX Green, illetve DilC₁(5) jelölést egyszerre végeztük.

Az SZ95 sebocyták esetében az apoptotikus és nekrotikus sejtpopulációk arányát annexin V–propidium jodid kettősfestéssel egyidejűleg vizsgálhattuk Annexin-V-FITC/Propidium Iodide Apoptosis Kit (Sigma-Aldrich) segítségével, a laboratóriumunkban korábban alkalmazott protokollnak megfelelően (Bodó és mtsai, 2005, Papp és mtsai, 2003, Griger és mtsai, 2007). Mint ahogy fentebb említettük, az apoptotikus sejtek membránjában externalizálódó foszfatidil-szerinhez fluoreszcensen jelölt annexin tud kötődni, melynek fluoreszcencia intenzitását tudjuk mérni. A propidium jodidos jelölés viszont csak a sérült membránú, halott sejteken végezhető el, a festék számára az intakt membrán áthatolhatatlan. A sejteket a tripszinezést és festést követően FACS-pufferben, azaz 1% borjú szérumból albumint (BSA), valamint 0,4% azidot (mindkettő Sigma-Aldrich) tartalmazó Ca²⁺- és Mg²⁺-mentes foszfát puffer oldatban (CMF-PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM foszfát, pH: 7,4) szuszpendáltuk, majd a fluoreszcencia intenzitást Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) áramlási citométer segítségével mértük. Az adatok kiértékelését a WinMDI 2.8 számítógépes program (Joseph Trotter, La Jolla, CA, USA) segítségével végeztük.

Az intracelluláris lipidtartalom meghatározása

A sebocyták lipidtartalmának szemikvantitatív vizsgálatára a sejteket Oil-Red O (Sigma-Aldrich) festésnek vetettük alá. A sejteket üveg fedőlemezen tenyésztettük és a fentebb említett farmakonokkal 48 órán keresztül kezeltük. Ezután a fedőlemezeket kétszer mostuk PBS-sel, majd a sejteket 4%-os paraformaldehiddel (Sigma-Aldrich) fixáltuk fél órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően újabb két mosás következett PBS-sel és egy mosás 60%-os 2-propanollal (Spektrum 3D), amit a frissen készített Oil-Red O oldattal (60%-os izopropanolban oldva) történő festés követett (20 perc, 37 °C-on). Újabb PBS-sel történő

mosás után a sejtmagokat Mayer-féle hematoxilinnal (Sigma-Aldrich) festettük 20 másodpercen keresztül. Az így megfestett sejteket vizes bázisú beágyazó médiummal (DAKO) fedtük, majd fénymikroszkóppal vizsgáltuk (Wróbel és mtsai, 2003).

A kvantitatív vizsgálatokhoz fluoreszcens Nile Red jelölést alkalmaztunk. A sejteket fekete falú, átlátszó aljú 96 lyukú lemezre (Greiner Bio-One) szélesztettük 20000 sejt/lyuk denzitásban, majd elvégeztük a megfelelő kezeléseket. A felülúszó eltávolítása után 100 µl PBS-ben oldott Nile Red oldatot (Sigma-Aldrich) mértünk a sejtekre 1 µg/ml végkoncentrációban, majd 20 percen keresztül 37°C-on inkubáltuk őket. Az egyes lyukak fluoreszcencia intenzitását FLIPR készülék segítségével detektáltuk. A mért intenzitásértékeket a kontroll százalékában adtuk meg relatív fluoreszcencia intenzitás formájában (RF). Ismert, hogy a Nile Red excitációs és emissziós spektruma változik a közeg polaritásának függvényében, így a sebocyták citoplazmájában felhalmozódó, jórészt neutrális lipidekkel kitöltött vakuólumok elkülöníthetővé váltak a membránjukat döntő többségben alkotó poláros lipidektől. Az eltérő gerjesztési és detektálási hullámhosszok miatt (neutrális lipidek: excitáció 485 nm-en, emisszió 565 nm-en; poláros lipidek: excitáció 540 nm-en, emisszió 620 nm-en) lehetőségünk nyílt a kétféle lipidtartalom egymás melletti detektálására. Mivel a sebocyták 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 felhalmozódásuk leginkább a sejtszám növekedésével korrelált. Minden kezelést 3-5 alkalommal ismételtünk, a kapott eredményeket pedig átlag±SEM formában adtuk meg.

RNS interferencia (siRNS)

A sejteket 6 lyukú lemezekben tenyésztettük az „Az SZ95 sebocyták tenyésztése” című fejezetben leírtak szerint kiegészített, de antibiotikum-mentes tápoldatban. Az 50-70%-os konfluencia elérésekor a tápoldatot szérumentes OptiMEM médiumra (Invitrogen) cseréltük, majd a sejteket 40 nM humán TRPV1, valamint CB1 és CB2 specifikus, duplaszálú kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal (Stealth RNAi – Invitrogen, TRPV1: HSS111305 és HSS111306; CB1: HSS102082; CB2: HSS102085, HSS102086 és HSS102087) transzfektáltuk Lipofectamine 2000 (Invitrogen) transzfekciós reagens segítségével. Kontrollként a sejteket Stealth RNAi Negative Control (Invitrogen) duplaszálú siRNS-sel transzfektáltuk, ami semmilyen ismert mRNS szekvenciájával nem mutat

homológiát („scrambled” siRNS). A géncsendesítés hatékonyságát a transzfekciót követően 4 napon keresztül naponta ellenőriztük Western blot és RT-PCR segítségével.

Az intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_{IC}$) vizsgálata

A keratinocyták esetében a TRPV1 aktiválást követő intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_{IC}$) változásának mérésére a laboratóriumunkban korábban optimalizált protokollt használtuk (Lázár és mtsai, 2003). A fedőlemezre szélesztett keratinocytákat 5 μ M kalcium érzékeny fluoreszcens fura 2 festék acetoximetilészter formájával (fura 2-AM, Molecular Probes-Invitrogen) 60 percig inkubáltuk 37 °C-on. A fura 2-AM-rel feltöltött sejteket tartalmazó fedőlemezeket ezután invertáló fluoreszcens mikroszkóp (Diaphot, Nikon) tárgyasztalára helyeztük. Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk kettős monokromátor, valamint on-line kapcsolt számítógép segítségével (PTI Deltascan készülék, Photon Technology International, Birmingham, NJ, USA), majd a fluoreszcens emissziót 510 nm-en detektáltuk 10 Hz-es mintavételi frekvenciát használva egy fotoelektron-sokszorozóval. Kísérleteink során a sejteket lassú perfúzióval folyamatosan Tyrode oldatban (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$, 11,8 mM HEPES-NaOH, 1 g glükóz, mind Sigma-Aldrich; pH 7,4) mostuk. A vizsgált anyagokat a sejtek közvetlen közelébe helyezett gyors perfúziós rendszerrel adagoltuk. A $[Ca^{2+}]_{IC}$ -t a 340 (F_{340}) és 380 nm-en (F_{380}) történő gerjesztés hatására emittált fluoreszcenciaintenzitás-hányadossal (F_{340}/F_{380}) jellemeztük. Kísérleteinket szobahőmérsékleten (22-23°C) végeztük.

Statisztikai analízis

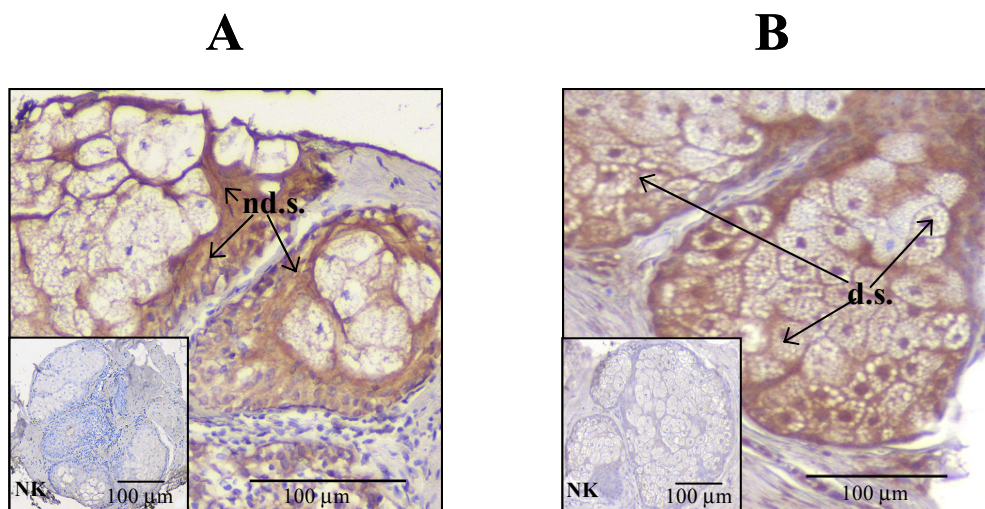
Adataink feldolgozásához a Microcal Software Inc. által kifejlesztett Origin Pro Plus 6.0 szoftvert használtuk (Microcal, Northampton, MA, USA). Mérési eredményeinket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. Az átlagok különbségét összetartozó minták esetén páros *t*-próbával, egyéb esetekben független mintás *t*-próbával, kettőnél több csoport esetén pedig egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA), valamint Bonferoni és Dunett post-hoc tesztekkel vizsgáltuk SPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) statisztikai szoftver segítségével. Szignifikánsnak a 0,05 szignifikancia szint alatti különbségeket fogadtuk el ($p < 0,05$).

EREDMÉNYEK

1. Kísérletek humán sebocytákon

Humán faggyúmirigyben a CB1 és a CB2 receptor, míg SZ95 sebocytákon csupán a CB2 receptor fejeződik ki

Kísérleteink során először a CB receptorok jelenlétét vizsgáltuk *in situ* humán faggyúmirigyben. Ständer és munkatársainak 2005-ös eredményeivel összhangban laboratóriumunk is markáns CB1 és CB2 immunpozitivitást tapasztalt a faggyúmirigy epithel sejtjeiben. Míg ők a CB1 jelenlétéről elsősorban a központi differenciált, a CB2-ről főleg a kevésbé differenciált sebocyták esetén számoltak be, addig mi azt tapasztaltuk, hogy a CB1 expressziója főként a faggyúmirigy perifériáján elhelyezkedő differenciálatlan sejtekre (**8. A ábra**), míg a CB2 receptor jelenléte inkább a centrálisan elhelyezkedő sejtekre, illetve azok membránjára jellemző (**8. B ábra**).

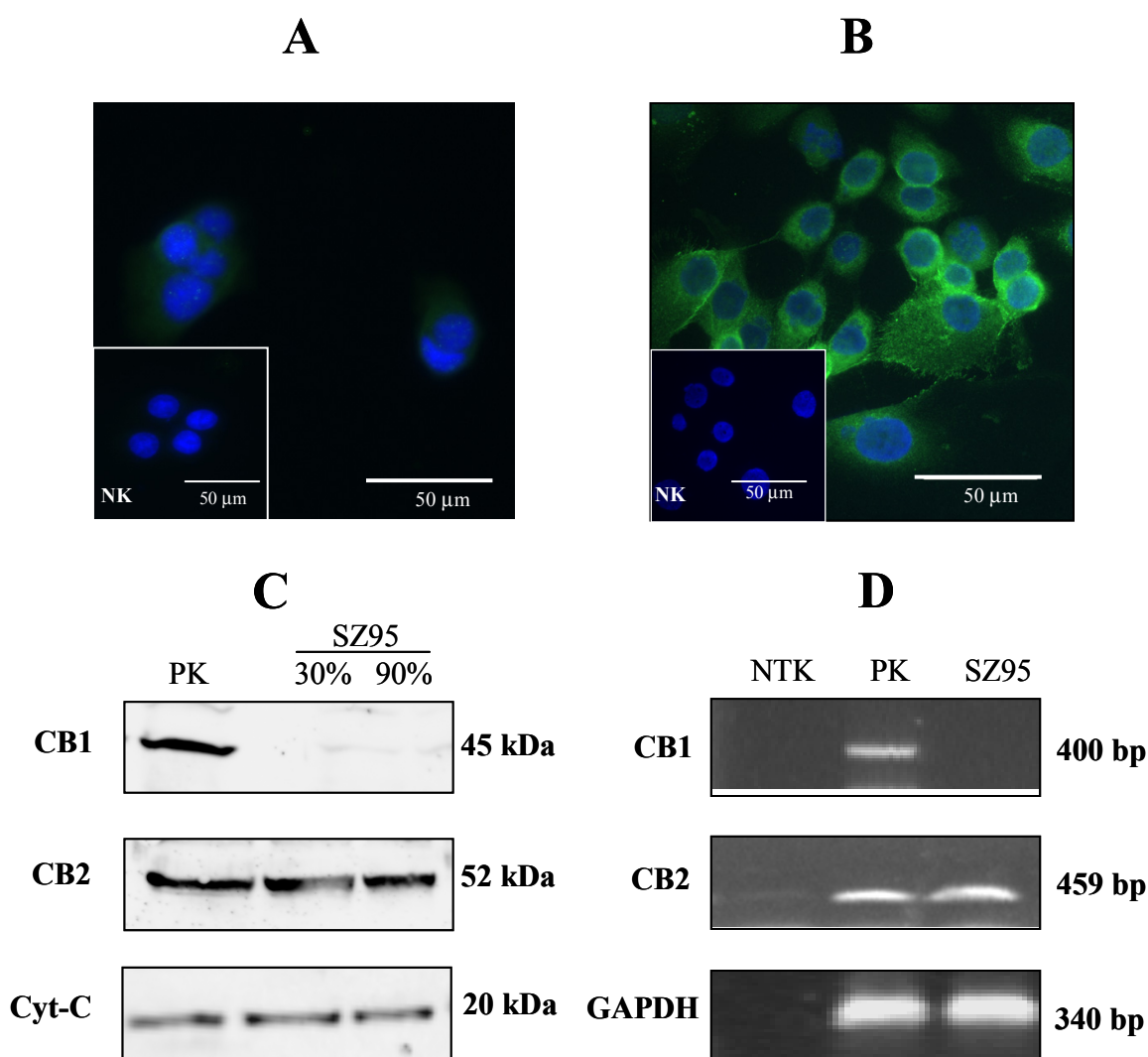


8. ábra: A CB1 és CB2 receptorok *in situ* kifejeződnek humán faggyúmirigyben

A CB1 és a CB2 expresszióját DAB kromogénnel (barna szín) mutattuk ki. **A:** A CB1 immunpozitivitás inkább a nem differenciálódott, periférián elhelyezkedő sebocytákra (nd.s.) jellemző. **B:** A CB2 a centrálisabb helyzetű, differenciálódott sebocytákra (d.s.) és a sejtmembránban mutat erőteljesebb immunreaktivitást. **NK:** preabszorpciós negatív kontroll.

Ezt követően megvizsgáltuk a két receptor kifejeződését a humán faggyúmirigy eredetű SZ95 sejtvonalon is. A sebocytákon immuncitokémiával és Western blot technikával csupán a CB2 receptor erőteljes expresszióját tapasztaltuk, míg a CB1 jelenlétét nem sikerült igazolnunk (**9. A, B és C ábra**). Ezt az eredményt támasztották alá a sejtvonalon végzett génexpressziós vizsgálatok is: reverz transzkripciót követő PCR segítségével a CB2 receptor

jelenlétét sikerült kimutatnunk. CB1 esetében pozitív kontrollként humán szőrtüszőt (Telek és mtsai, 2007), míg CB2 esetében humán monocytákat (Onaivi és mtsai, 1999) használtunk (9. C és D ábra). Western blotnál citokróm C, míg RT-PCR-nál a GAPDH szolgált belső kontrollként. Vizsgáltuk a receptorok expressziójának konfluencia függését is, viszont nem tapasztaltunk különbséget az egyes tenyészetek között. Eredményeink szerint a CB2 receptor expressziója nem változik a sejtek konfluencia-indukált differenciálódásának előrehaladtával (9. C ábra).



9. ábra: SZ95 sebocytákon csupán a CB2 receptor expressziója figyelhető meg

Az SZ95 sebocytákon a CB1 (A) és CB2 (B) kimutatását specifikus fluoreszcens FITC-jelöléssel végeztük immuncitokémia során. Csak a CB2 receptor jelölése esetén láthatunk erős immunfestődést. A receptorok protein szintű jelenlétét Western blot segítségével (C), valamint mRNS szintű expresszióját RT-PCR technikával (D) vizsgáltuk. Előzetes kísérleteink során nem tapasztaltunk expresszió változást az egyes konfluenciák között. A D ábrán látható mintákat különböző konfluenciájú minták poolozásából vittük fel. Pozitív kontrollként humán szőrtüszőt (CB1), valamint monocytákat (CB2) használtunk. Ugyanazon kísérletek során meghatároztuk a minták belső kontrollként használt citokróm C (Cyt-C), illetve GAPDH expresszióját is. NK: negatív kontroll, PK: pozitív kontroll, NTK: templát cDNS nélküli kontroll.

Az SZ95 sebocyták endocannabinoidokat termelnek

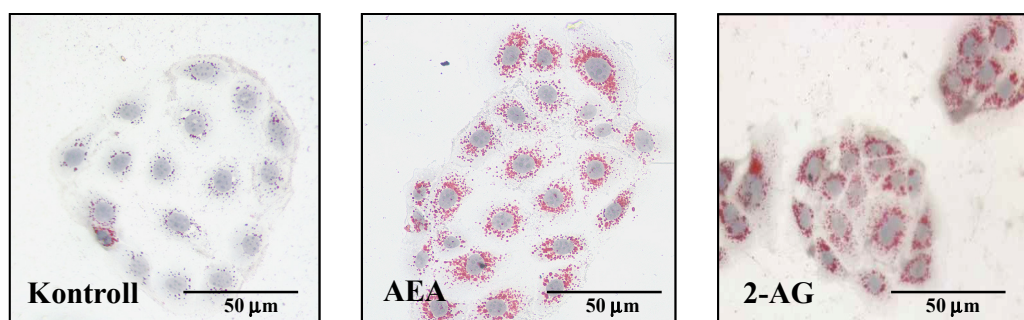
A CB2 receptor expressziójának igazolása után arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a sebocyták képesek-e a receptor ligandjainak termelésére is. A sebocyták endogén cannabinoid tartalmának meghatározása során azt tapasztaltuk, hogy a sejtek jelentős mennyiségű AEA-ot ($66,7 \pm 10$ fmol/mg szövet) és 2-AG-t ($6,2 \pm 1$ pmol/mg szövet) (átlag $\pm$ SEM, N=4) tartalmaznak. Ez a mennyiség összevethető a korábban leírt, különböző bőrterületeken talált endocannabinoid koncentrációkkal; 50 fmol/mg szövet AEA-ot mutattak ki a patkány talp- és egér fülmintákban (Calignano és mtsai, 1998; Karsak és mtsai, 2007), míg 20-30 pmol/mg szövet 2-AG-t mértek az egérfülből származó szövetekben (Karsak és mtsai, 2007). Ezek az értékek mintegy 10-szeres mennyiségben meghaladják a laboratóriumunk által a humán follikulusokban leírt koncentrációkat (6,6-11,2 fmol/mg szövet AEA; 0,3 fmol/mg szövet 2-AG, Telek és mtsai, 2007).

Az endocannabinoidok fokozzák az SZ95 sebocyták lipidszintézisét, és apoptózist indukálnak

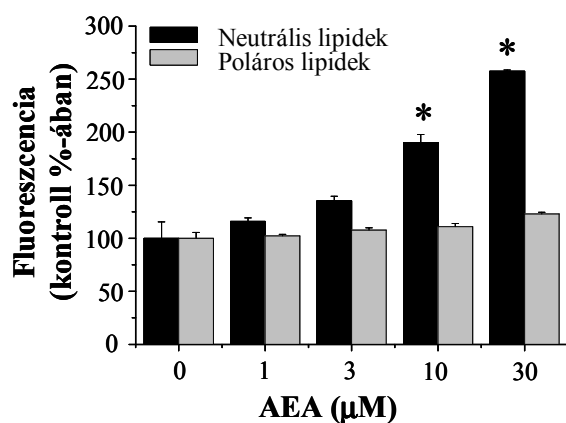
A továbbiakban az endocannabinoid rendszer lehetséges funkcionális szerepének vizsgálatát tűztük ki célul a sebocyták olyan alapvető sejtfolymataiban, mint a lipidtermelés, a differenciálódás és a sejtproliferáció. A sebocyták egyik legfontosabb feladata a jellegzetes összetételű sebum termelése; ezért megvizsgáltuk a két legismertebb endocannabinoid, az AEA és a 2-AG hatását az SZ95 sejtek lipidszintézisére. A sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk a két említett endocannabinoid különböző koncentrációival (1-30 μ M). A sejtekben a felhalmozódó lipidcseppeket szemikvantitatív Oil-Red O festéssel láthatóvá téve azt tapasztaltuk, hogy kontrollhoz képest mindkét anyag hatására jelentősen megnőtt a lipidcseppek száma, illetve azok mérete (**10. A ábra**).

A lipidek akkumulációját kvantitatív módon is megvizsgáltuk a neutrális és a poláros lipideket festő fluoreszcens Nile Red jelöléssel FLIPR segítségével. Eredményeink szerint mind az AEA, mind pedig a 2-AG dózisfüggő módon, a kontrollhoz viszonyítva legalább kétszeresére fokozta a differenciálódást jelző neutrális lipidek termelődését (**10. B és C ábra**).

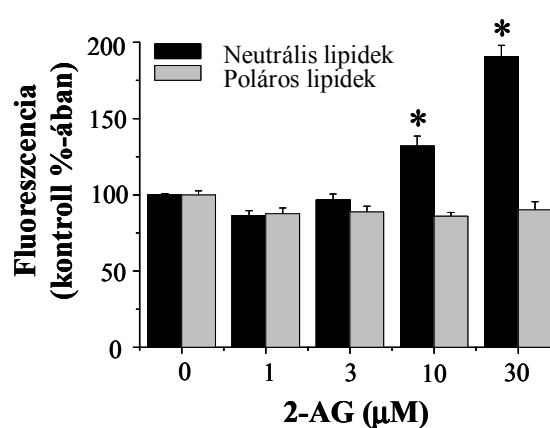
A



B



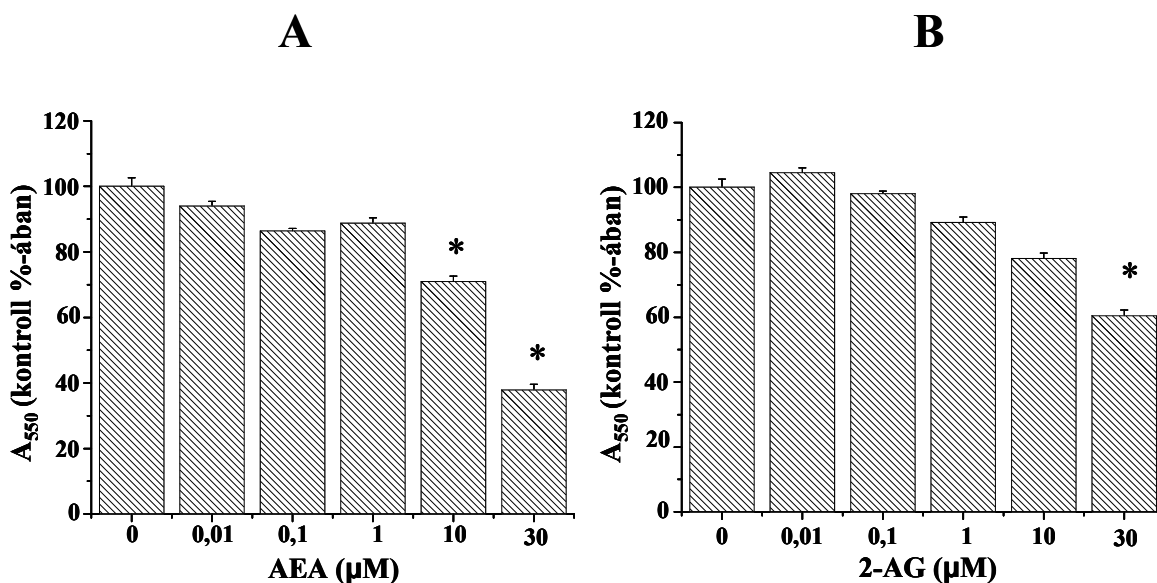
C



10. ábra: Az endocannabinoidok fokozzák a sebocyták lipidszintézisét

A: A reprezentatív ábrán 24 órán át 30 µM AEA-dal és 2-AG-lal kezelt SZ95 sebocyták fénymikroszkópos képei láthatók. A sejtek fixálását követően az intracelluláris lipidcseppeket Oil Red O festéssel jelöltük, a sejtmagokat pedig Mayer-féle hematoxilinnal tettük láthatóvá. **B, C:** A sejteket szintén 24 órán keresztül kezeltük AEA és 2-AG fent látható koncentrációival, majd Nile Red jelölést követő kvantitatív fluorimetriás mérés segítségével vizsgáltuk a sejtek lipidszintézisét. Az ábrák 5 független kísérlet átlag±SEM értékeit mutatják. *: $p < 0,05$ a kontrollhoz viszonyítva.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az endocannabinoidok befolyásolják-e a sebocyták életképességét. A sejteket 4 napon keresztül kezeltük az anyagok különböző koncentrációival, és azt tapasztaltuk, hogy mind az AEA, mind a 2-AG dózistól függően, jelentősen csökkentette az élő sejtek számát (**11. ábra**).



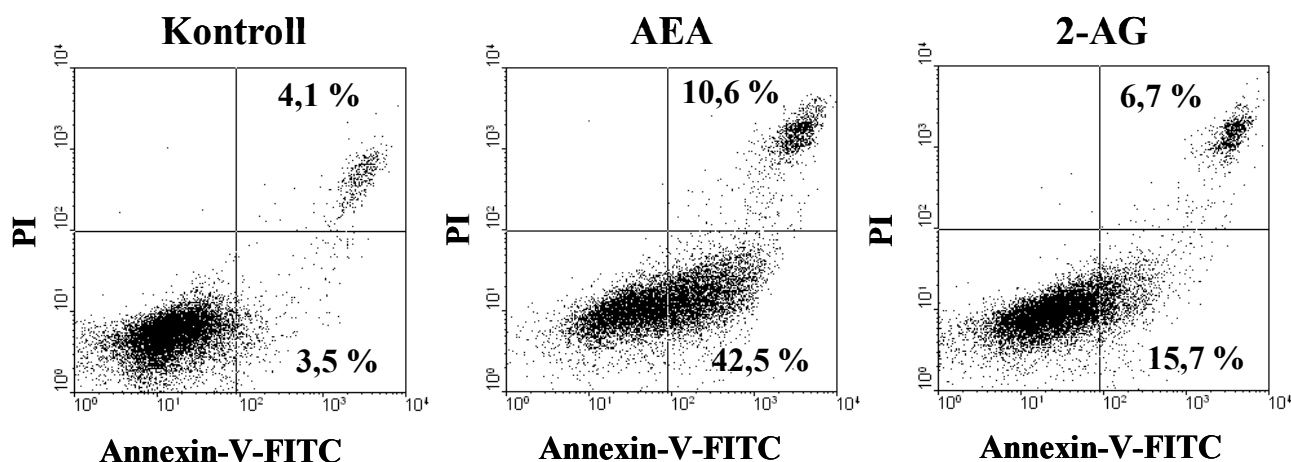
11. ábra: Az endocannabinoidok csökkentik az SZ95 sebocyták életképességét

A sejteket 4 napon keresztül kezeltük AEA-dal (A) és 2-AG-lal (B) az ábrán bemutatott koncentrációkban, majd a sejtek életképességét kolorimetriás MTT assay-vel vizsgáltuk az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak alapján. Az ábrán átlag±SEM értékeket tüntettünk fel, N=5, * $p < 0,05$, a kezetlen kontrollhoz képest.

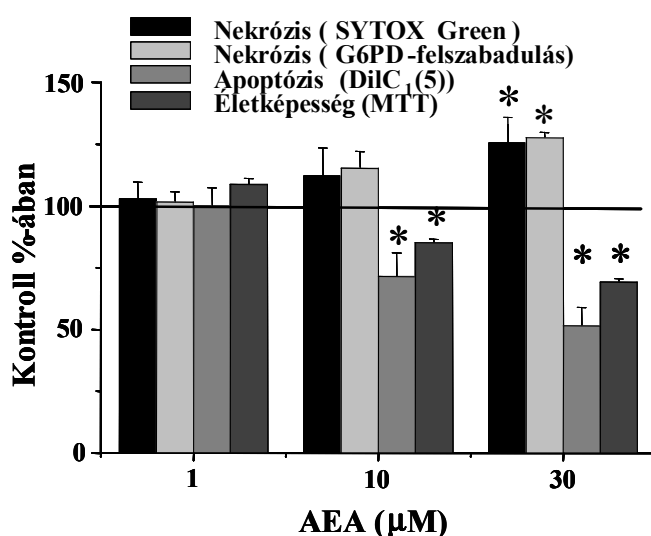
Hogy a csökkenő sejtszám háttérében álló folyamatokat kiderítsük, fluoreszcens módszerek segítségével apoptózis és nekrosis vizsgálatokat végeztünk. Áramlásos citometriás mérések során azt tapasztaltuk, hogy az AEA és a 2-AG jelentősen megemelte az apoptotikus (Annexin-V+/propidium-jodid–) sejtek arányát, míg a nekrotikus (Annexin-V+/propidium-jodid+) sejtek számát csak kismértékben fokozta a tenyészetekben (12. A ábra).

Ezen eredményeink megerősítésére további kvantitatív fluorimetriás assay-eket is végeztünk. A sejteket mitokondriális membránpotenciál függő festékkel, a DilC₁(5)-tel, illetve a halott sejtek nukleáris DNS-ét festő SYTOX Green-nel jelöltük, és vizsgáltuk a nekrotikus sejtekből történő G6PD-felszabadulását is. Azt tapasztaltuk, hogy az AEA jelentősen lecsökkentette a mitokondriális membránpotenciál értékét (apoptózis), míg a legmagasabb alkalmazott koncentrációja ezen drasztikus csökkenés mellett már jelentős SYTOX Green akkumulációt és G6PD-felszabadulást is kiváltott (nekrosis) (12. B ábra). Ezen eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az endocannabinoidok jórészt apoptózist, míg nagyobb koncentrációkban alkalmazva apoptózist és/vagy nekrozist indukálnak az SZ95 sebocytákban.

A



B

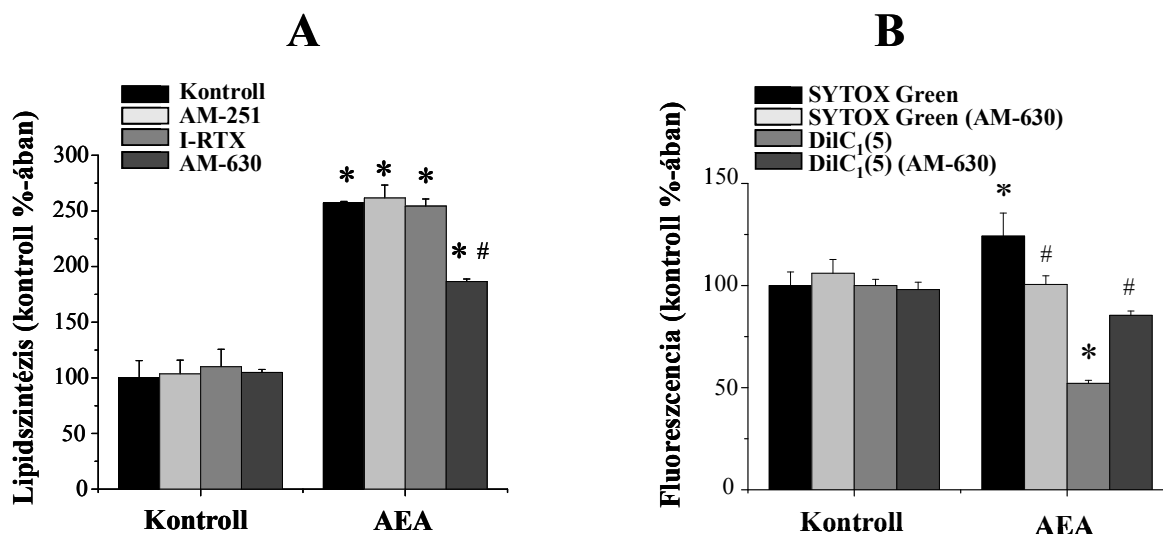


12. ábra: Az endocannabinoidok sejthalált indukálnak az SZ95 sebocytákban

A: A sejteket 48 órán keresztül 30 μM AEA-dal és 30 μM 2-AG-lal kezeltük. Az áramlási citometriás vizsgálatok során FITC-konjugált annexin-V és propidium-jodid kettős festés segítségével a sejthalál apoptotikus és nekrotikus formáit vizsgáltuk. Az annexin-V-pozitivitás az apoptotizáló sejtekre utal (jobb alsó kvadráns), míg az annexin-V-és PI-pozitivitás a nekrotikus sejteket mutatja (jobb felső kvadráns). N=2. **B:** A sejteket 24-48 órán keresztül kezeltük 96 lyukű tenyésztőedényben. A nekrotikus folyamatokat 24 óra elteltével a felülúszóból G6PD felszabadulás vizsgálatával, valamint 48 óra elteltével SYTOX Green assay segítségével, míg az apoptózist DilC₁(5) jelöléssel követtük nyomon. Az élő sejtek számában bekövetkező változások megállapítására MTT-assayt végeztünk. Az ábrán átlag±SEM értékek vannak feltüntetve, N=4, *p<0,05, kezeletlen kontrollhoz (mint 100%-hoz) képest (vízszintes vonal).

Az AEA CB2-mediált úton fejt ki hatását

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy az AEA a cannabinoid receptorok (CB1 és CB2) mellett a TRPV1 receptor agonistája is (Pacher és mtsai, 2006; Di Marzo és mtsai, 2002; Van Der Stelt és mtsai, 2004), mely molekula jelenlétét laboratóriumunk sikerrel igazolta SZ95 sebocytákon (Tóth és mtsai, 2009). Hogy kiderítsük, melyik receptor közvetítésével fejt ki az AEA a hatását, CB1, CB2 és TRPV1 specifikus antagonisták (rendre AM-251, AM-630 és I-RTX) jelenlétében is elvégeztük fent bemutatott kísérleteinket. Mind a CB1, mind a TRPV1 gátlása hatástalannak bizonyult; ezzel szemben a CB2 specifikus antagonisták AM-630 képes volt kivédeni az AEA lipidakkumulációt stimuláló hatását (**13. A ábra**). Kimutattuk azt is, hogy az AM-630 nemcsak az AEA indukálta lipidszintézist gátolta, hanem annak sejtszámcsökkentő és apoptózist indukáló hatását is (**13. B ábra**). Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a CB2 receptor szerepet játszik az AEA által kifejtett celluláris hatások kialakulásában.

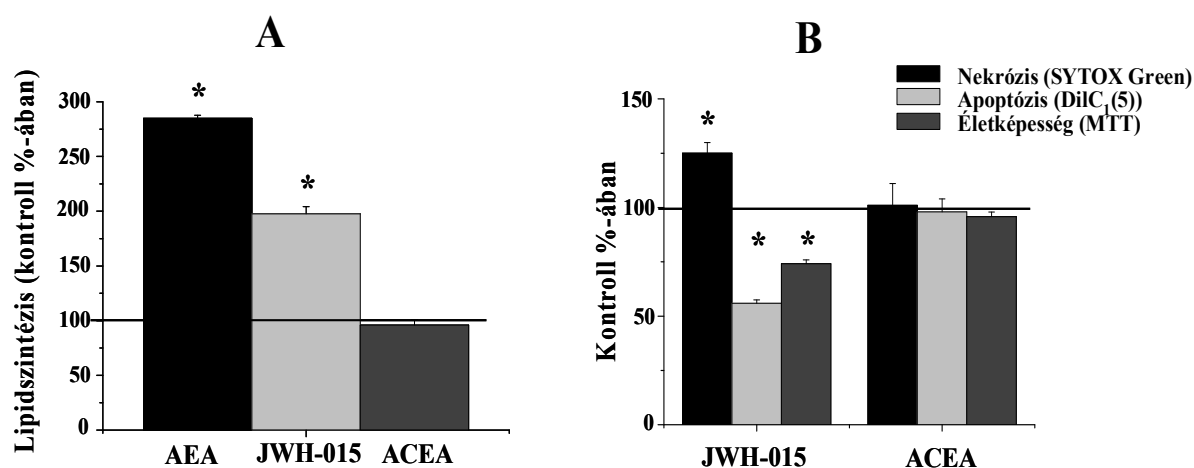


13. ábra: Az AEA CB2 receptoron keresztül fejt ki celluláris hatásait az SZ95 sebocytákban

A: A sebocytákat 24 órán keresztül kezeltük az ábrán látható specifikus gátlószerekkel (CB1 antagonisták 1 μ M AM-251; TRPV1 specifikus inhibitor 50 nM I-RTX, CB2 antagonisták 10 μ M AM-630) AEA alkalmazása mellett. A neutrális lipidek szintjét a korábban leírtak szerint Nile Red jelölést követően határoztuk meg. A gátlószerek önmagukban nem módosítják a sejtek lipidtartalmát. $N=3$, átlag $\pm$ SEM, * $p<0,05$, a kezeletlen kontrollhoz képest; # $p<0,05$, a kizárólag AEA-kezelt sejtekhez képest. **B:** Az apoptotikus folyamatokra utaló mitokondriális membránpotenciál változást DiI C₁(5) jelöléssel követtük nyomon. A nekrotikus folyamatokat SYTOX-Green jelölést követően fluorimetriás méréssel vizsgáltuk. Az értékeket az oldószerrel kezelt kontroll értékének százalékában adtuk meg. $N=3$, átlag $\pm$ SEM, * $p<0,05$, a kezeletlen kontrollhoz képest; # $p<0,05$, az inhibitor hatása AEA-kezelt kontrollhoz képest.

Ezt az elképzelésünket támasztotta alá az az eredményünk is, miszerint lipidszintézis vizsgálatakor a szintetikus, CB2-receptor specifikus agonista JWH-015 az AEA-dal

megegyező hatást produkált, míg a szintetikus, CB1-receptor specifikus agonista ACEA nem változtatta meg a sejtek zsírtermelését. A sejtek életképességének esetleges változását is vizsgáltuk a szintetikus agonisták alkalmazása után. A JWH-015 csökkentette a sejtek életképességét és apoptózis-domináns sejthalált indukált, ezzel szemben a CB1 specifikus agonista ACEA teljesen hatástalannak bizonyult (**14. A és B ábra**). Ezen mérések során kapott eredményeink tehát megerősítették azt a hipotézisünket, hogy a CB2 receptor funkcionális szereppel bír az SZ95 sebocyták legalapvetőbb biológiai folyamatainak szabályozásában.



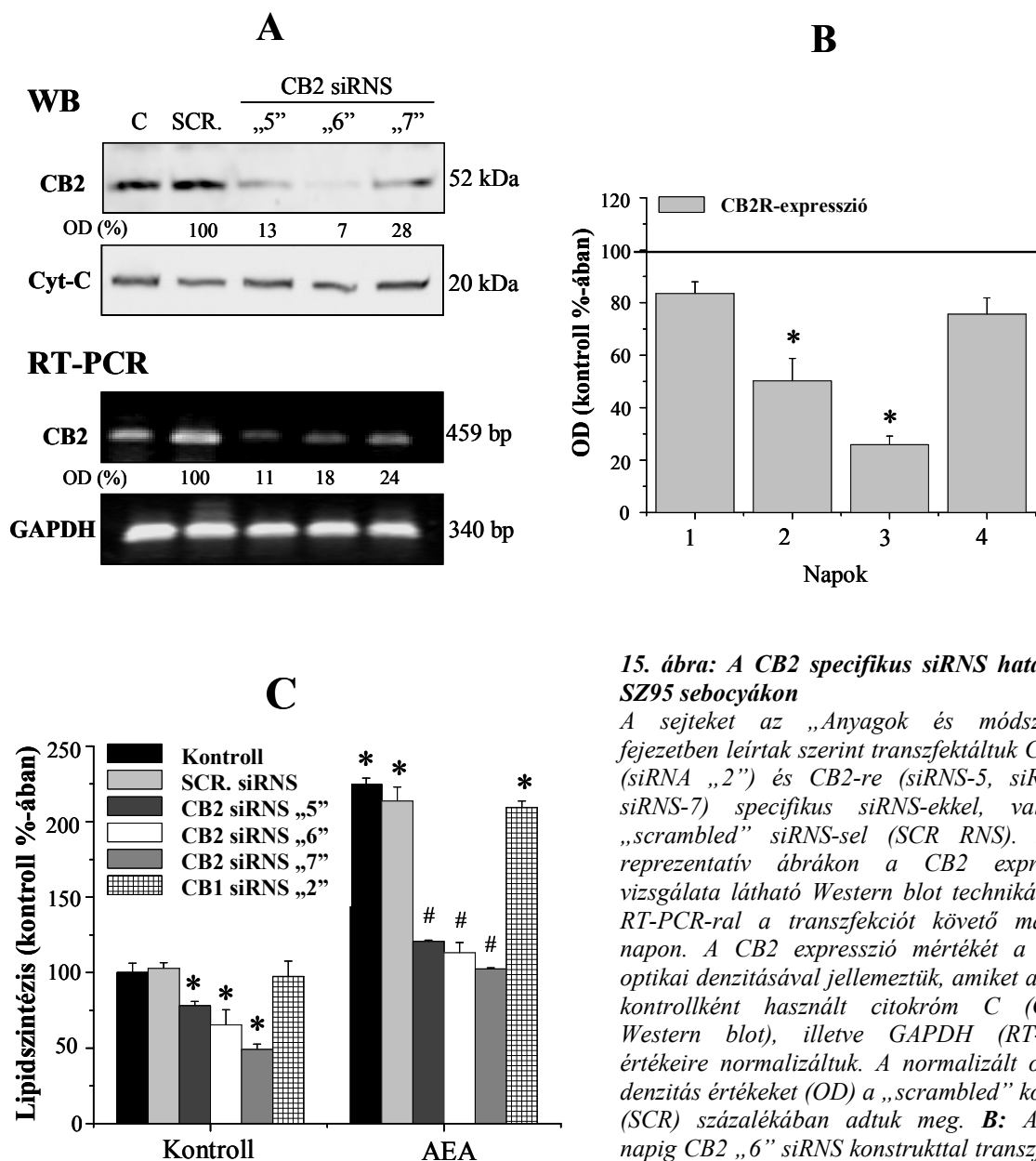
14. ábra: A szintetikus CB2 agonista JWH-015 mimikálja az AEA hatását

A sejteket 96 lyukú tefasztőedényben kezeltük AEA-dal, CB2 specifikus agonista JWH-015-tel és CB1 specifikus agonista ACEA-dal (mind 30 μ M), majd 24 óra elteltével vizsgáltuk a lipidszintézis változását (A), 48 óra múlva pedig az apoptotikus és nekrotikus folyamatokat, valamint az élő sejtek számában bekövetkező változásokat (B). Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg, a kezeletlen kontroll százalékában (vízszintes vonal); * $p < 0,05$, a kezeletlen kontrollhoz képest.

Végezetül siRNS technikát alkalmazva is megvizsgáltuk a CB2 szerepét az AEA lipidszintézist fokozó hatásában. Az SZ95 sebocytákat három eltérő, de a CB2 mRNS-ére egyaránt specifikus siRNS próbával is transzfektáltuk az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint. Az ábrán reprezentatív Western blot-tal és RT-PCR-ral (**15. A ábra**) kapott eredményeink láthatók a sebocytákon végzett, 2 napos CB2 siRNS transzfekció után (transzfekció szempontjából a 2. és a 3. nap bizonyult leghatékonyabbnak (**15. B ábra**)). A CB2 szelektív géncsendesítés mindhárom esetben sikeres volt, hiszen mindhárom konstrukt jelentősen lecsendesítette a CB2 receptor expresszióját a kontrollhoz, valamint a negatív kontrollként alkalmazott „scrambled” siRNS-hez képest.

A CB2 „csendesített” sebocytákon funkcionális vizsgálatokat is végeztünk. A transzfekciót követő második napon, amikor a géncsendesítés a leghatékonyabbnak bizonyult, a sejteket a korábbiakhoz hasonlóan 24 órán keresztül kezeltük AEA-dal, majd megvizsgáltuk

a lipidszintézist. A kezelés során azt az érdekességet tapasztaltuk, hogy a CB2 siRNS-sel kezelt sejtek bazális lipidtermelése lényegesen alacsonyabb volt, mint a kezeletlen kontrollé vagy a „scrambled” RNS-sel kezelt sejteké. Amint az várható volt, a CB1 siRNS-sel transzfektált sejtek lipidtartalmában nem tapasztaltunk változást. Ezen túlmenően az is bebizonyosodott, hogy CB2 géncsökkentett sebocytákban az AEA nem tudta kifejteni lipidtermelést fokozó hatását (míg a kontrollként alkalmazott CB1 lecsökkentése nem befolyásolta azt) (15. C ábra).



15. ábra: A CB2 specifikus siRNS hatása az SZ95 sebocytákon

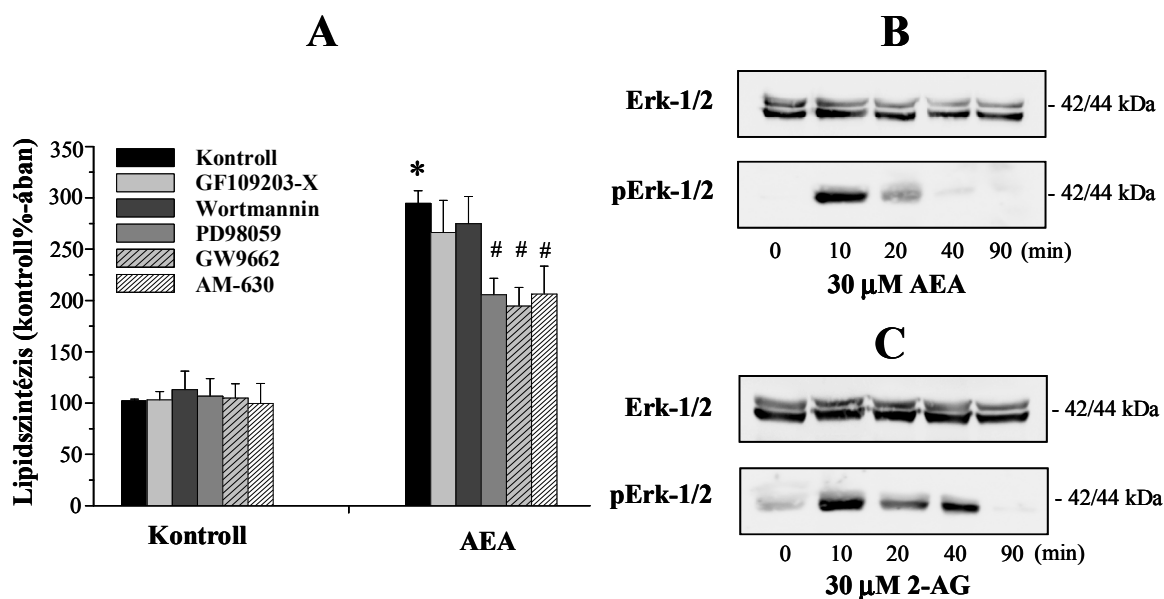
A sejteket az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint transzfektáltuk CB1-re (siRNA „2”) és CB2-re (siRNS-5, siRNS-6, siRNS-7) specifikus siRNS-ekkel, valamint „scrambled” siRNS-sel (SCR RNS). **A:** A reprezentatív ábrákon a CB2 expresszió vizsgálata látható Western blot technikával és RT-PCR-rel a transzekciót követő második napon. A CB2 expresszió mértékét a sávok optikai denzitásával jellemeztük, amiket a belső kontrollként használt citokrom C (Cyt-C, Western blot), illetve GAPDH (RT-PCR) értékeire normalizáltuk. A normalizált optikai denzitás értékeit (OD) a „scrambled” kontroll (SCR) százalékában adtuk meg. **B:** Az 1-4 napig CB2 „6” siRNS konstrukttal transzfektált sejteken 3 független Western blot kísérlet

statisztikai analizését végeztük el. * $p < 0,05$, a „scrambled” kontroll (SCR) százalékához képest (vékony vonal). **C:** Az ábrán a kontroll és siRNS-sel transzfektált sejtek lipidszintézise látható kontroll körülmények között és AEA kezelést követően. Az SZ95 sejteket a transzekció másnapján 96 lyukú tenyésztőlemezre szélesztettük, majd 24 óra múlva (vagyis a transzekciót követő második napon) kezeltük 30 μ M AEA-dal. Ezt követően újabb 24 óra elteltével Nile Red jelölést követően mértük a lipidek mennyiségét fluorimetriás úton. * $p < 0,05$, átlag $\pm$ SEM a „scrambled” kontrollhoz képest; # $p < 0,05$ az AEA-kezelt „scrambled” kontrollhoz képest.

Az AEA celluláris hatásának kifejlődésében a MAPK útvonal is résztvesz

Számos sejttípus esetén leírták már, hogy az aktív cannabinoid receptorok több intracelluláris útvonalat is aktiválhatnak, ilyen például a protein kináz C (PKC), a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) vagy a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) útvonal (Melck és mtsai, 1999; Derkinderen és mtsai, 2003; Velez-Pardo és mtsai, 2006), ezért a továbbiakban a CB2-mediált jelátviteli útvonal alkotóit próbáltuk feltérképezni a humán SZ95 sebocytákban.

Az AEA lipidtermelődést fokozó hatását nem tudtuk kivédeni sem a PKC inhibitor GF109203X-al, sem pedig a PI3K-t gátló wortmanninnal. Ezzel szemben a MAPK inhibitor PD098059 szignifikánsan csökkentette az anandamid hatását (**16. A ábra**). Ezt alátámasztják a Western blottal kapott eredményeink is, miszerint az AEA a MAPK Erk-1/2 jelentős, átmeneti foszforilációját váltotta ki SZ95 sebocytákban (**16. B ábra**). Western blot kísérletünket elvégeztük a 2-AG jelenlétében is, és az AEA-hoz hasonló eredményeket kaptunk (**16. C ábra**). Ezek alapján feltételezhető, hogy a CB2-mediált sejtfolyamatokban a MAPK útvonal aktiválódása is szerepet játszhat humán sebocyták esetén.



16. ábra: A CB2-mediált sejtfolyamatokban a MAPK útvonal is aktiválódik

A: A sebocytákat 24 órán keresztül kezeltük az ábrán látható farmakonokkal (PKC antagonist 100 nM GF109203X; PI3K inhibitor 100 nM wortmannin; MAPK inhibitor 10 μ M PD98059; PPAR γ inhibitor 5 μ M GW9662; CB2 antagonist 10 μ M AM-630), valamint azokat 30 μ M AEA-dal kombinálva. A neutrális lipidek szintjét a korábban leírtak szerint Nile Red jelölést követően határoztuk meg. $N=3$, átlag $\pm$ SEM, * $p<0,05$, a kezeletlen kontrollhoz képest; # $p<0,05$, az AEA-kezelt (azaz inhibitor nélküli) kontrollhoz képest. **B, C:** Az SZ95 sebocytákat 30 μ M AEA-dal (**B**), illetve 30 μ M 2-AG-lal (**C**) kezeltük, majd az ábrán látható időpontokban learattuk. Ezt követően Western blot segítségével vizsgáltuk az Erk-1/2 és foszforilált formájának (pErk-1/2) expresszióját. 2 megismételt kísérletünk azonos eredményt hozott.

Az endocannabinoidok fokozzák a lipidszintézis szabályozásában szerepet játszó gének expresszióját

Mint azt a Bevezetésben már említettük, a nukleáris receptorok közé tartozó PPAR-ok központi szerepet játszanak a lipidanyagcsere szabályozásában számos sejtféleségben (Desvergne és Wahli, 1999; Lee és mtsai, 2003). Az SZ95 és a SEB-1 sejtekkel végzett korábbi kísérletek során kiderült, hogy a sejtek terminális differenciálódását kísérő lipidfelhalmozódás kialakulásában a PPAR-oknak is fontos szerepük van (Rosenfield és mtsai, 1998; Chen és mtsai, 2003; Trivedi és mtsai, 2006). Felvetődött tehát a kérdés, hogy az endocannabinoidok lipidszintézist fokozó hatásában szerepet játszhat-e a génexpressziójukban bekövetkező változás is?

Megvizsgáltuk a PPAR-ok expresszióját és az expresszió változását az endocannabinoidok hatására. Kvantitatív valós idejű PCR segítségével mindhárom ismert PPAR izoforma (PPAR α , PPAR δ és PPAR γ) mRNS transzkriptjét detektáltuk. Dózsa és munkatársai (még nem közölt eredmény) sikerrel igazolták olyan PPAR γ target gének expresszióját mind humán faggyúmirigyben, mind SZ95 sebocytákon, melyeket eddig makrofágokban, adipocytákban vagy dendritikus sejtekben írtak le (Yoon és mtsai, 2000; Shappell és mtsai, 2001; Vosper és mtsai, 2001). Kíváncsiak voltunk arra, hogy a PPAR-ok részt vesznek-e az endocannabinoidok aktiválta jelátviteli utakban, ezért megvizsgáltuk a PPAR γ target gének – a COX2 (Cyclooxygenase-2), az ADRP (Adipose differentiation-related protein), valamint a PGAR (PPAR γ -regulated angiopoietin-related protein) – expressziós szintjében endocannabinoidok hatására esetlegesen bekövetkező változásokat. Az 1. táblázatban bemutatott adatokból jól látszik, hogy mind az AEA, mind a 2-AG 24 óra elteltével (mely időn belül hatékonyan fokozták a sejtek lipidszintézisét is) jelentősen fokozta a PPAR δ és γ génexpresszióját a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. A PPAR α gén szintjét 24 óra elteltével csak a 2-AG volt képes szignifikánsan megemelni. A további vizsgált géneknél (COX-2, ADRP, PGAR) már 12 óra elteltével drámaian, mintegy 10-15-szörösére fokozódott a génexpresszió mértéke, ami ugyancsak a PPAR γ endocannabinoidok általi aktiválódását támasztja alá. Mindez arra utal, hogy az endocannabinoidok faggyútermelést fokozó hatásában szerepet játszik a lipidszintézist pozitívan reguláló gének expressziójának fokozása (**1. táblázat**). Ezen eredményünket az is megerősíti, hogy az SZ95 sebocytákon a PPAR γ szelektív inhibitor, a GW9662 (Zhang és mtsai, 2006) képes volt csökkenteni az anandamid lipogén hatását (**16. A ábra**).

Génexpresszió	30 μ M AEA		30 μ M 2-AG	
	12 h	24 h	12 h	24 h
PPARα	0,84 $\pm$ 0,12	0,96 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,08	1,44 $\pm$ 0,06*
PPARδ	1,67 $\pm$ 0,12*	2,07 $\pm$ 0,11*	1,33 $\pm$ 0,12*	2,28 $\pm$ 0,16*
PPARγ	1,00 $\pm$ 0,07	1,49 $\pm$ 0,01*	1,03 $\pm$ 0,08	2,22 $\pm$ 0,15*
COX2	2,06 $\pm$ 0,14*	6,93 $\pm$ 0,65*	1,59 $\pm$ 0,16*	2,45 $\pm$ 0,93*
ADRP	1,77 $\pm$ 0,07*	2,59 $\pm$ 0,22*	4,44 $\pm$ 0,45*	3,82 $\pm$ 0,34*
PGAR	9,95 $\pm$ 1,23*	11,6 $\pm$ 1,92*	16,0 $\pm$ 1,26*	13,4 $\pm$ 1,21*

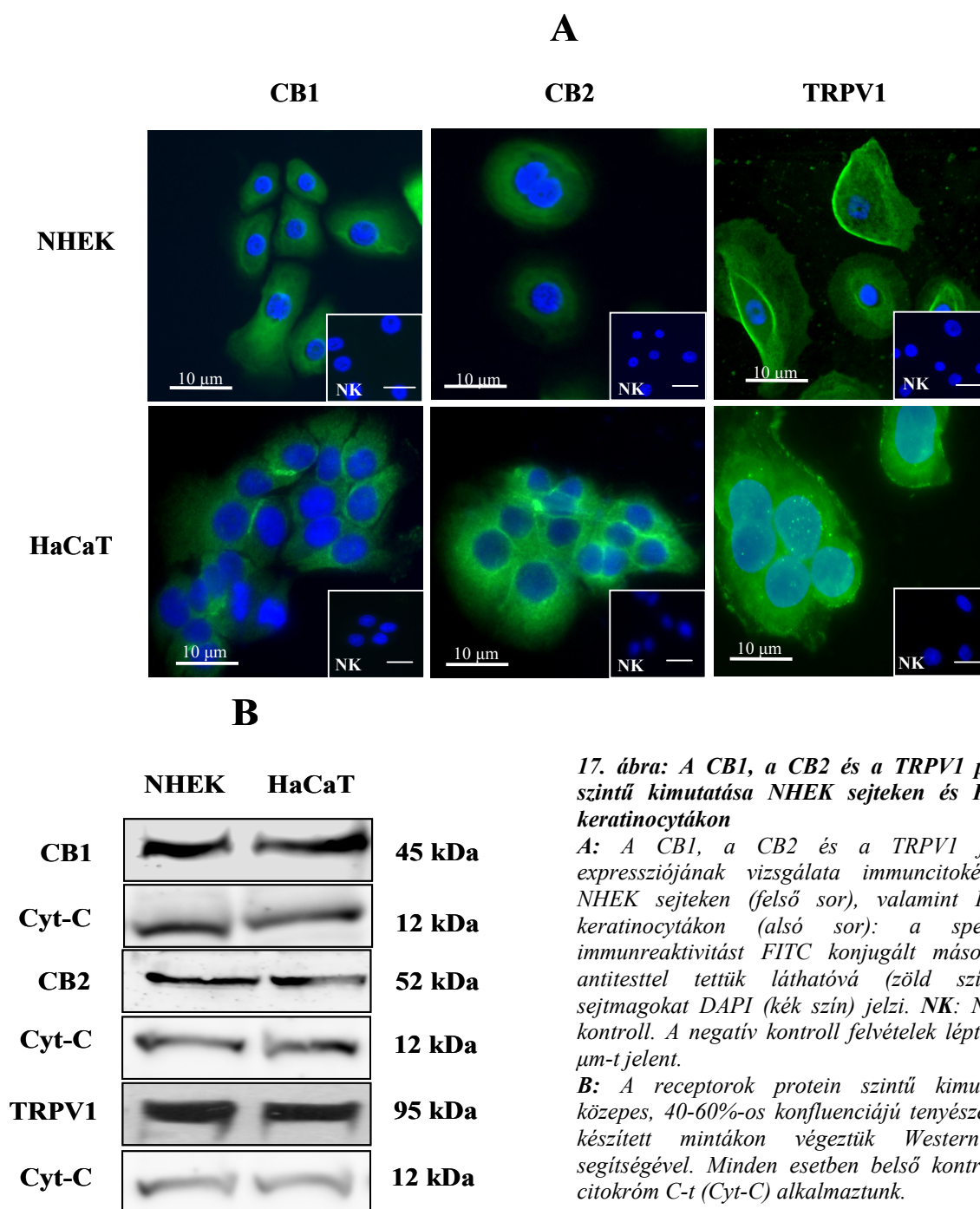
1. táblázat: Az AEA és a 2-AG fokozza a lipidszintézis szabályozásában szerepet játszó gének xpresszióját SZ95 sebocytákon

Az SZ95 sebocytákat 12 illetve 24 órán át kezeltük 30 μ M AEA-dal és 30 μ M 2-AG-lal. A kezelést követően kvantitatív valós idejű PCR segítségével meghatároztuk a táblázatban feltüntetett gének expresszióját a humán cyclophilin-A expressziójára normalizálva. A táblázatban a kezeletlen kontrollhoz (ahol kontroll=1) viszonyított értékeket tüntettük fel. N=3 *p<0,05 az oldószerrel kezelt kontrollhoz viszonyítva.

2. Kísérletek humán epidermális keratinocytákon

A humán keratinocyták egyaránt expresszálják a CB1-et, a CB2-t és a TRPV1-t

A korábbi irodalmi adatokkal (Denda és mtsai, 2001, Maccarrone és mtsai, 2003) megegyezően, valamint laboratóriumunk eredményeit (Bodó és mtsai, 2005) megerősítve először immuncitokémiával és Western blot technikával azonosítottuk a CB receptorok (CB1 és CB2) és az „ionotróp AEA receptor” TRPV1 (Di Marzo és mtsai, 1998 és 2001; Zygmunt és mtsai, 1999) jelenlétét NHEK és HaCaT keratinocytákon (17. A és B ábra).

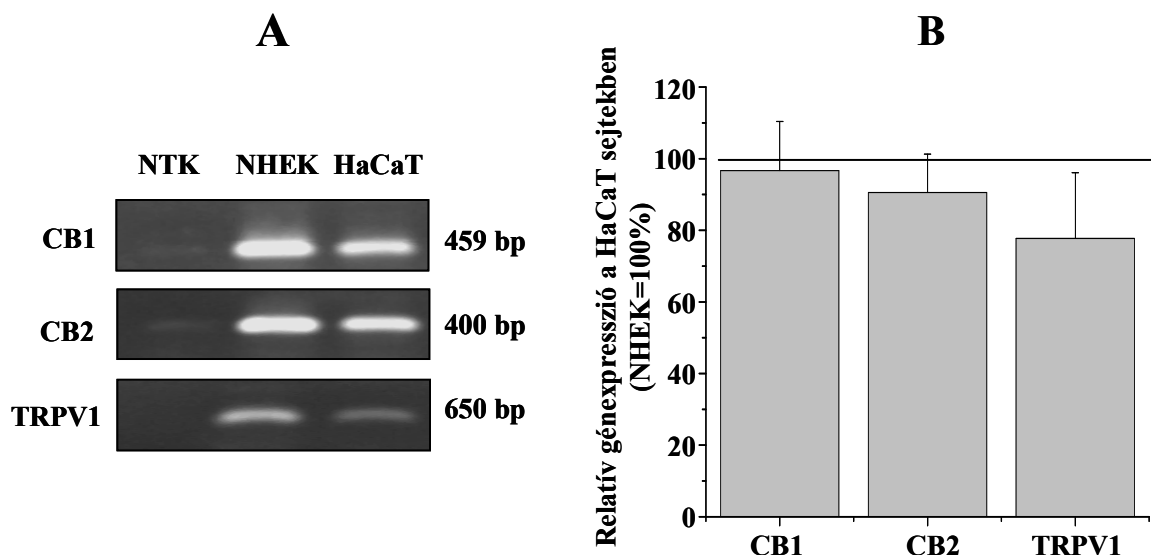


17. ábra: A CB1, a CB2 és a TRPV1 protein szintű kimutatása NHEK sejteken és HaCaT keratinocytákon

A: A CB1, a CB2 és a TRPV1 fehérje expressziójának vizsgálata immuncitokémiával NHEK sejteken (felső sor), valamint HaCaT keratinocytákon (alsó sor): a specifikus immunreaktivitást FITC konjugált másodlagos antitesttel tettük láthatóvá (zöld szín), a sejtmagokat DAPI (kék szín) jelzi. NK: Negatív kontroll. A negatív kontroll felvételek léptéke 10 μm-t jelent.

B: A receptorok protein szintű kimutatását közepes, 40-60%-os konfluenciájú tenyészetekből készített mintákon végeztük Western blot segítségével. Minden esetben belső kontrollként citokróm C-t (Cyt-C) alkalmaztunk.

Ezt követően a receptorok génexpressziójának mRNS-szintű vizsgálatát végeztük el. RT-PCR és kvantitatív valós idejű PCR segítségével is igazoltuk a receptorok jelenlétét mind NHEK sejteken, mind pedig HaCaT keratinocytákon (18. A és B ábra).



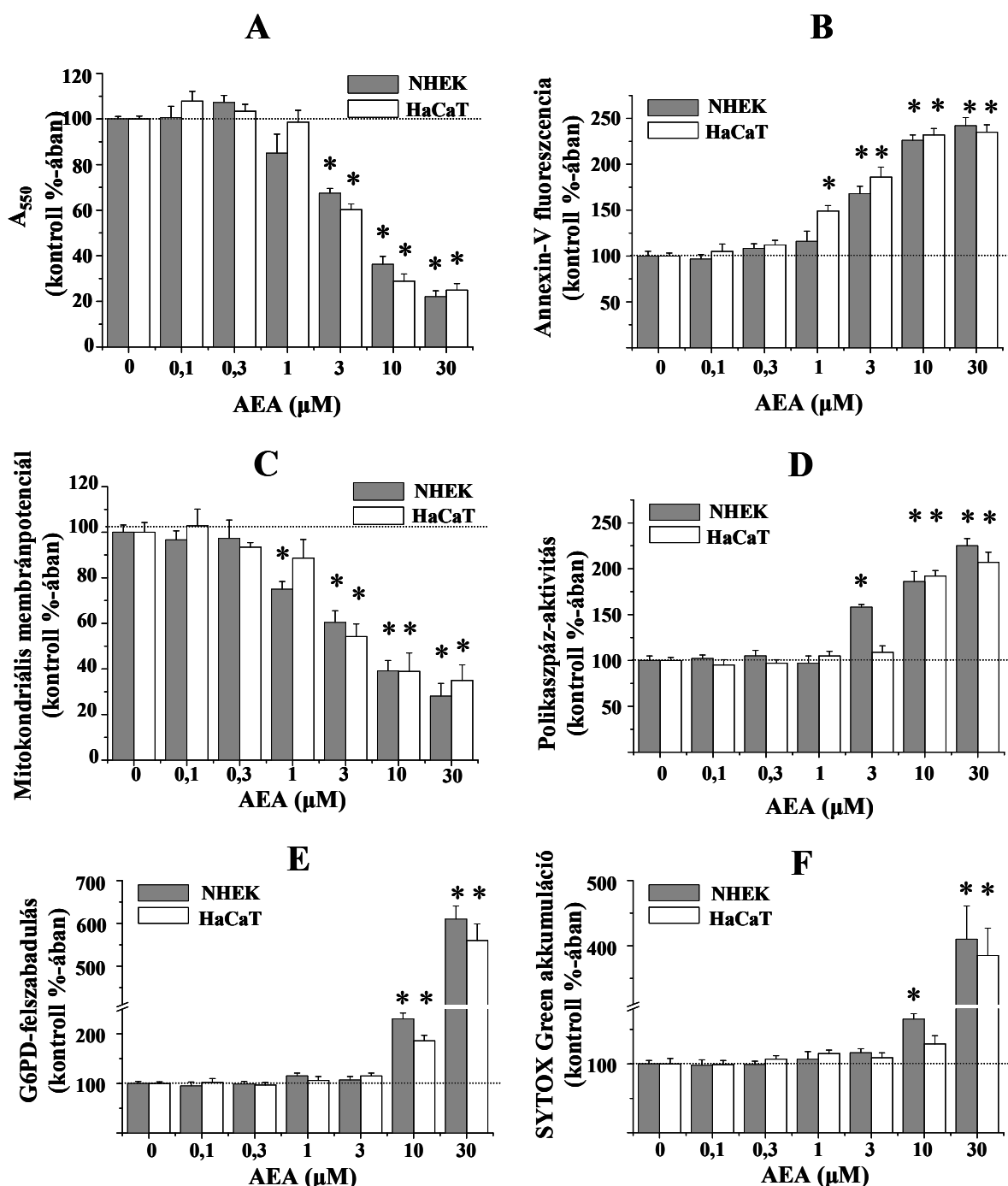
18. ábra: A CB1, a CB2 és a TRPV1 génexpressziójának vizsgálata NHEK és HaCaT sejteken

A két sejtípusból izolált teljes RNS-ből a receptorok mRNS szintű vizsgálatát először RT-PCR technikával (A), majd Q-PCR segítségével (B) is elvégeztük. B: A receptorok expressziójának mértékét százalékos értékben adtuk meg az NHEK sejtekben expresszálandó receptorok mennyiségéhez viszonyítva (vízszintes vonal). NTK= templát nélküli kontroll. N=4, átlag±SEM.

Az AEA csökkenti a sejtek életképességét és apoptózist indukál in vitro

További kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az endocannabinoid AEA hogyan befolyásolja a sejtek növekedését és túlélését. Az élő sejtek számának meghatározására MTT alapú kolorimetriás assayt végeztünk; ennek során azt tapasztaltuk, hogy az AEA dóziszfüggő módon csökkentette az NHEK és a HaCaT keratinocyták életképességét és egyben proliferációját (19. A ábra). Ezt követően az élő sejtek számának csökkenése háttérében álló folyamatokat kvantitatív fluorimetriás mérésekkel vizsgáltuk. A sejteket 24 órán át kezeltük az AEA különböző koncentrációival, és megállapítottuk, hogy az jelentősen és dóziszfüggő módon lecsökkentette a mitokondriális membránpotenciált, fokozta az annexin-V pozitív sejtek számát, valamint aktiválta a proapoptotikus kaspázokat (19. B, C és D ábra); azaz AEA apoptotikus folyamatokat indított be. A sejtfelszíni és magmembrán integritásának sérülése ugyanakkor nekrotikus folyamatokra utal, mely jól vizsgálható a halott sejtekből felszabaduló G6PD mennyiségének fluorimetriás elemzésével, valamint az integritásukat veszített sejtek nukleáris DNS-ét festő fluoreszcens SYTOX Green festék akkumulációjával

(19. E és F ábra). Ezen eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az AEA sejtszámcsökkentő hatásának hátterében főként apoptotikus folyamatok állnak, bár az AEA legnagyobb alkalmazott koncentrációja már nekrotizist vált ki mindkét sejttípus esetében.



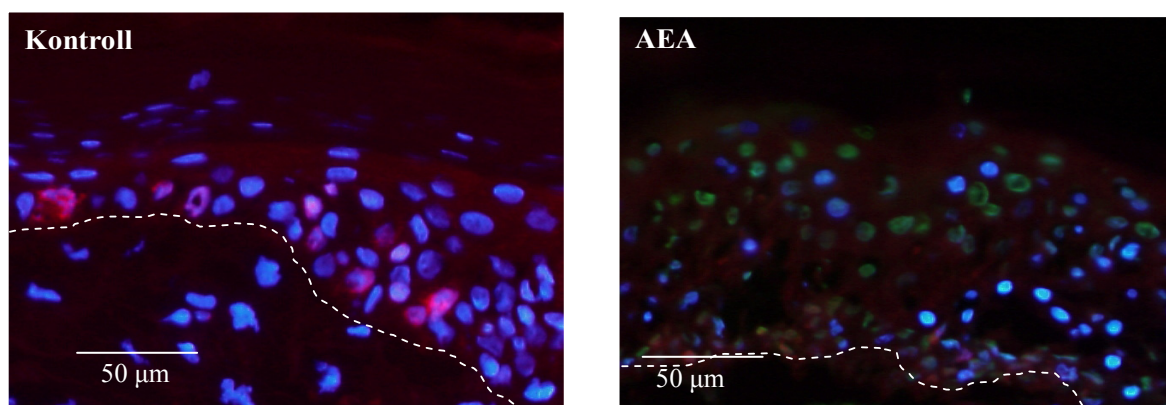
19. ábra: Az AEA csökkenti a sejtek életképességét és sejthalált indukál NHEK sejteken és HaCaT keratinocytákon

A keratinocytákat 96 lyukű tenyésztőedényben tenyésztettük 20000 sejt/lyuk denzitás mellett, majd 24 órán keresztül kezeltük AEA-dal az ábrákon látható koncentráció tartományban (0,1-30 μM). **A**: Az életképességet MTT alapú kolorimetriás assay segítségével határoztuk meg 550 nm-en. **B**, **C**, **D**: Fluorimetriás úton vizsgáltuk az Annexin-V pozitív sejtek arányát, a mitokondriális membránpotenciál csökkenését és a proapoptotikus kaszpázok aktivitását az apoptotizáló sejtekben. **E**, **F**: A nekrotikus folyamatokat G6PD-felszabadulást illetve SYTOX Green jelölést követően fluorimetriás méréssel vizsgáltuk. N=3. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg, a kezeletlen kontroll százalékában (vékony vízszintes vonal); *p<0,05, a kezeletlen kontrollhoz képest.

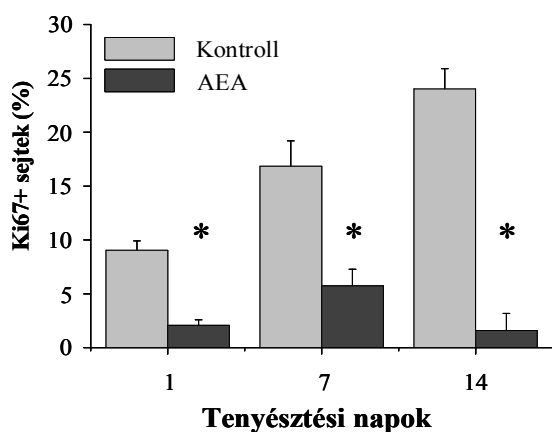
A humán bőrben az AEA in situ is kifejti antiproliferatív és proapoptotikus hatásait („skin organ culture” technika)

Eredményeink megerősítésére kollaborációs partnereinkkel humán fejbőrből készített, szérummentes közegben tartott „skin organ culture” tenyészeteken (Lu és mtsai, 2007, Tiede és mtsai, 2009) is vizsgáltuk a proliferáló, illetve apoptotikus sejtek arányát AEA jelenlétében. Ehhez Ki67-TUNEL festést végeztünk, amely képes mind a proliferáló sejtek (Texas Red-del jelölt Ki67 pozitív sejtek), mind az apoptotikus sejtek (FITC-el jelölt TUNEL-pozitív sejtek) kimutatására. Ezzel sikerült alátámasztanunk eddigi eredményeinket: azaz 30 μ M AEA alkalmazásakor a proliferáló, Ki67+ sejtek száma lecsökkent, míg az apoptotikus, TUNEL+ sejtek száma jelentősen megnőtt a 14 napos vizsgálat során (**20. A, B és C ábra**).

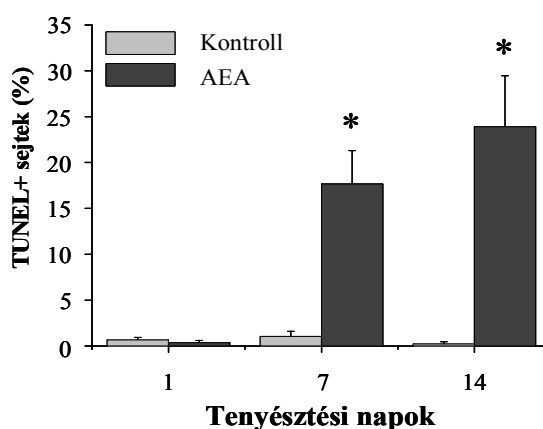
A



B



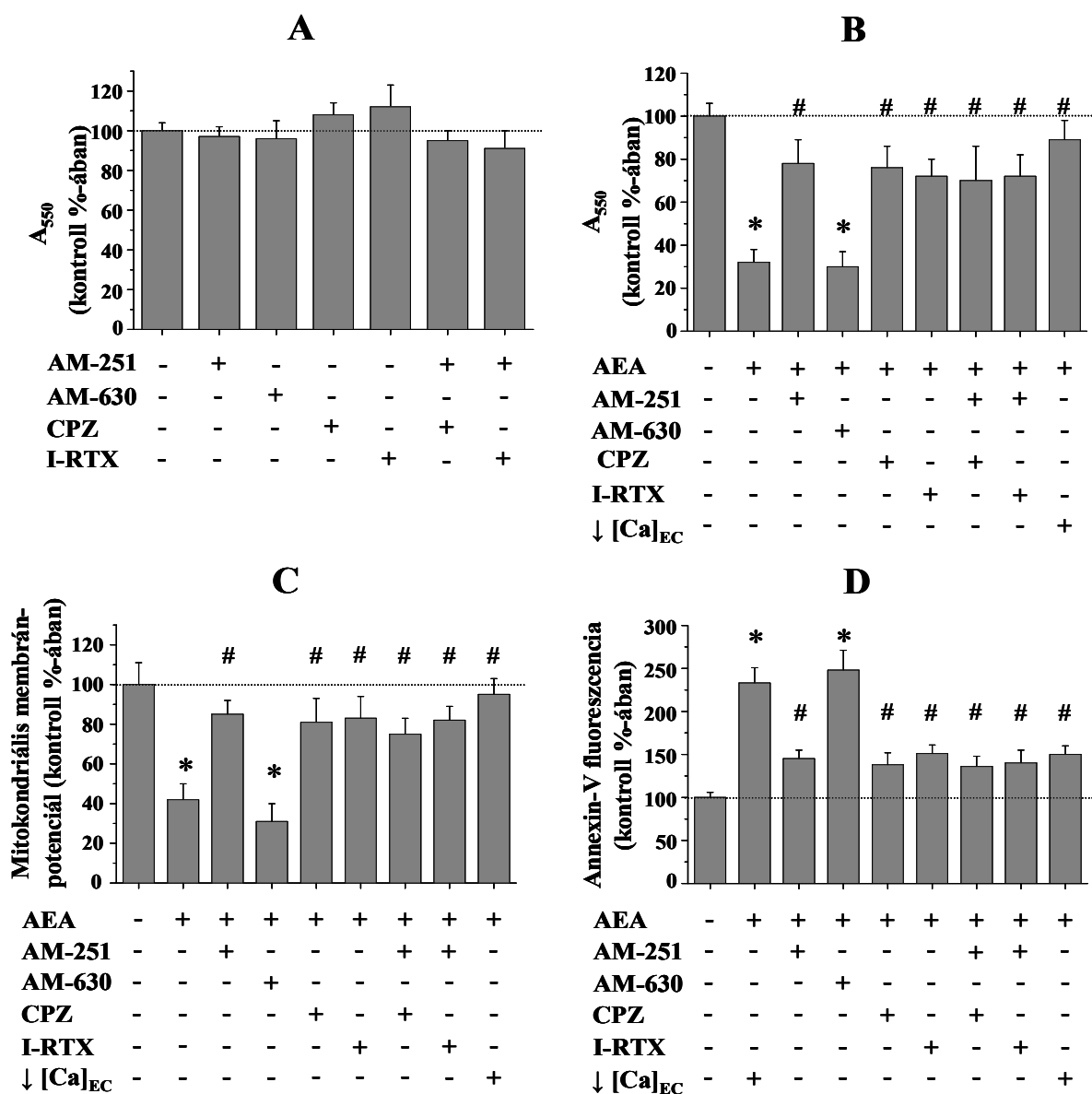
C



20. ábra: Az AEA hatására csökken a sejtek proliferációs képessége, míg az apoptotikus sejtek aránya megnő. A sejteket kollaborációs partnereink naponta 30 μ M AEA-dal kezelték, majd méréseket végeztek az 1., 7. és 14. napon. **A:** a proliferáció (Ki67, piros) és az apoptózis (TUNEL, zöld) egy idejű jelölése kontroll és 30 μ M AEA-kezelt keratinocytákon. A sejtmagokat a DAPI magfestő jelzi (kék). A szaggatott vonal az epidermis és a dermis határát jelöli. **B, C:** A Ki-67- (**B**) és TUNEL-pozitív (**C**) sejtek százalékos aránya a teljes sejtszáma (DAPI-pozitív sejtek) vonatkoztatva. Az ábrán átlag $\pm$ SEM értékeket tüntettünk fel, N=5, * p <0,05, a kezeletlen kontrollhoz képest.

Az AEA celluláris hatásait a CB1 és a TRPV1 közvetíti

Miután *in situ* körülmények között is sikerült igazolnunk, hogy az AEA proapoptotikus hatással bír humán keratinocytaon, a háttérben lezajló jelátviteli mechanizmusok vizsgálatával folytattuk kísérleteinket.

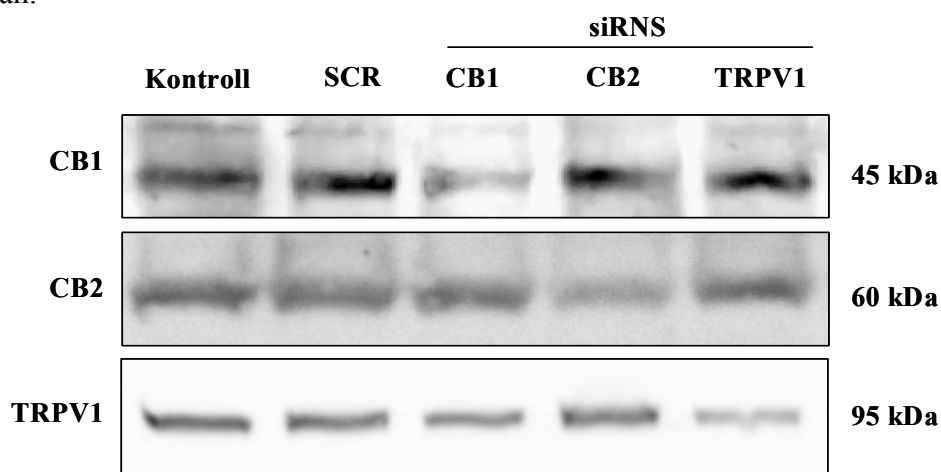


21. ábra: Az AEA CB1 és TRPV1 receptoron keresztül fejti ki hatásait

A HaCaT keratinocytaokat 96 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük 20000 sejt/lyuk denzitás mellett, majd 24 órán keresztül kezeltük 10 μ M anandamid, valamint a specifikus antagonisták megfelelő kombinációival (CB1: 1 μ M AM-251; CB2: 1 μ M AM-630; TRPV1: 5 μ M CPZ és 50 nM I-RTX). Emellett vizsgáltuk az extracelluláris tér Ca^{2+} -koncentrációjának csökkentésével (2 mM-0,02 mM) járó hatásokat is. **A, B:** MTT alapú kolorimetriás assay-vel vizsgáltuk a sejtek életképességét. **(A).** Az anandamid sejt számcsökkentő hatását az AM-251, a CPZ és a I-RTX, valamint az alacsony $[Ca^{2+}]_{EC}$ volt képes kivédeni. A CB1 és a TRPV1 antagonisták együttes alkalmazása nem volt additív hatású **(B).** **C és D:** Az apoptózis vizsgálatára fluoreszcens DilC₁(5) és Annexin-V jelölést végeztünk. Az AEA proapoptotikus hatásának bizonyult. Az anandamid apoptózist indukáló hatását a CB1 antagonista AM-251, a TRPV1 antagonista CPZ és I-RTX, valamint az alacsony $[Ca^{2+}]_{EC}$ volt képes csökkenteni. $N=3$. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg, a kezeletlen kontroll százalékában (vékony vízszintes vonal); * $p<0,05$, a kezeletlen kontrollhoz képest; # $p<0,05$, anandamid kezelt sejtekhez képest.

Mint azt már a sebocyták kapcsán is említettük, az AEA nemcsak a cannabinoid receptorok, hanem a TRPV1 receptor agonistája is (ezért is szokták ezeket összefoglalóan „anandamid receptornak” nevezni; Pertwee, 2005; Hiley és Hoi, 2007). Ezért a CB1 specifikus antagonistá AM-251, a CB2 specifikus antagonistá AM-630 mellett a TRPV1 specifikus antagonistá CPZ és I-RTX jelenlétében is elvégeztük vizsgálatainkat. A **21. A ábra** azt mutatja, hogy az antagonisták önmagukban nem befolyásolták a sejtek életképességét. Ezzel szemben, ha azokat AEA-os kezelés mellett alkalmazzuk, a CB1 antagonista AM-251 és TRPV1 antagonistá CPZ és I-RTX képes volt kivédeni az AEA életképességet csökkentő (**21. B ábra**) és sejthalált indukáló hatását (**21. C és D ábra**), míg a CB2 receptort gátló AM-630 hatástalannak bizonyult. A CB1 és a TRPV1 antagonistá együttes alkalmazása nem volt additív az AEA hatásának kivédeése szempontjából (**21. A, B és C ábra**).

Mivel a TRPV1 funkcionális Ca^{2+} -csatornaként működik (Bevan és mtsai, 1993; Caterina és mtsai, 1997; Bíró és mtsai, 1998; Birder és mtsai, 2001; Inoue és mtsai, 2002; Bodó és mtsai, 2005), megvizsgáltuk a Ca^{2+} szerepét az AEA hatásának kifejlődésében is. Eredményeink szerint a csökkentett Ca^{2+} -koncentrációjú közegben az AEA (normál Ca^{2+} -szint mellett tapasztalt) gátló hatása elmaradt (**21. B ábra**), mely jelenség felveti a TRPV1, mint funkcionális Ca^{2+} -csatorna szerepét az AEA hatásának kifejlődésében (a csökkentett Ca^{2+} -szint önmagában nem befolyásolta a sejtek életképességét). Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a CB1 mellett a TRPV1 is szerepet játszhat az AEA által kifejtett, fent említett hatásokban.



22. ábra: A CB1, CB2 és TRPV1 siRNS transzfekció hatékonyan működik HaCaT sejteken

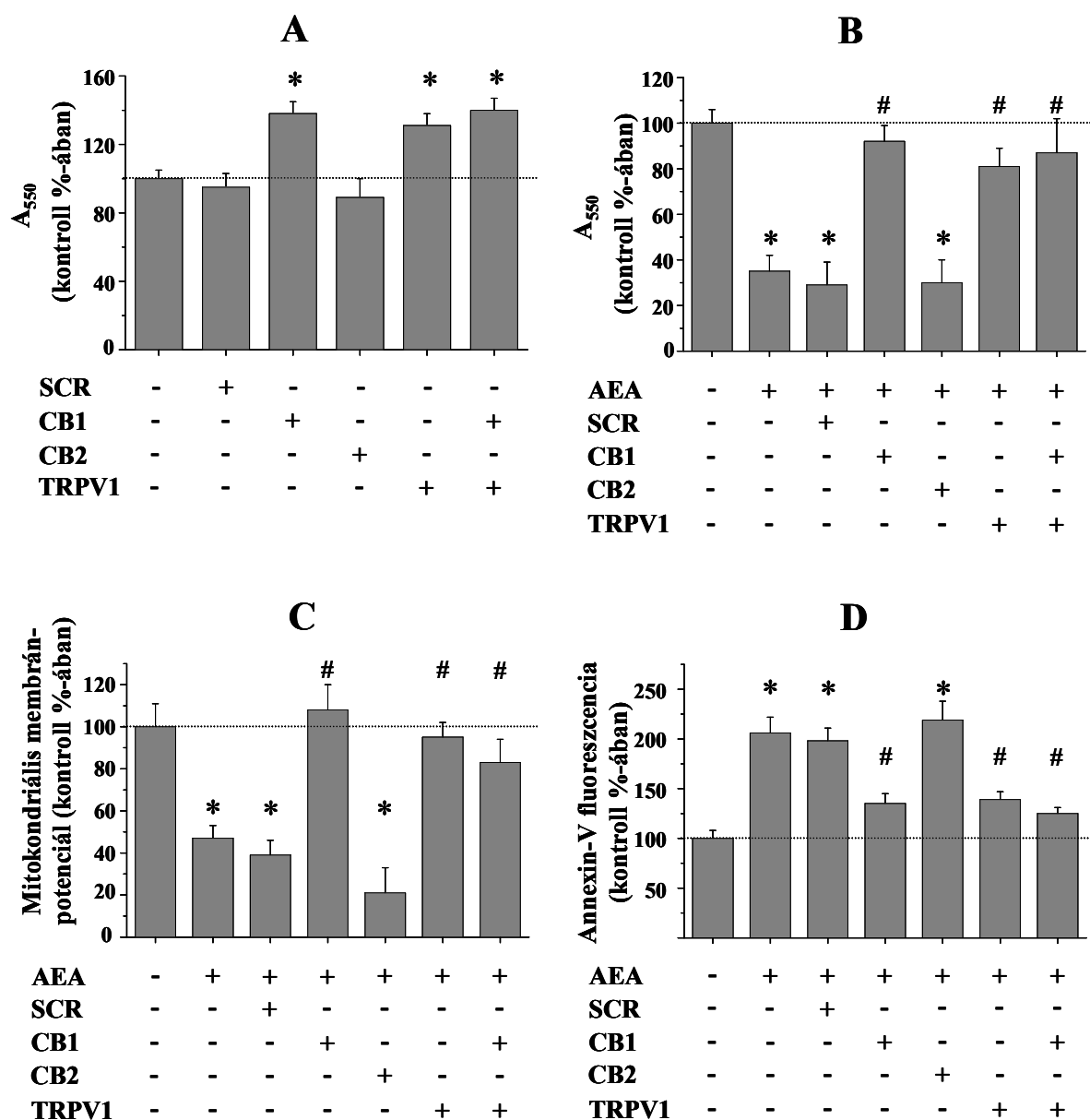
A sejteket az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint transzfektáltuk a CB1-re, a CB2-re és a TRPV1-re specifikus siRNS próbákkal, valamint „scrambled” siRNS-sel (SCR). A transzfekció hatékonyságát 4 napon keresztül vizsgáltuk. Leghatékonyabbnak mindhárom oligonukleotid primer esetében a 2. nap bizonyult. A reprezentatív ábrán a transzfekciót követő második napon készült Westen blot képe látható.

Vizsgálataink során siRNS technikát is alkalmaztunk, így egy újabb „nézőpontból” tisztázhattuk a receptorok szerepét az AEA celluláris hatásaiban. A sejteket a CB1, a CB2 és a TRPV1 mRNS-ére specifikus siRNS-sel transzfektáltuk az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint. A **22. ábrán** Western blot-tal kapott eredményeink láthatók a HaCaT sejteken végzett, 2 napos siRNS transzfekció után. A felvételen jól látható, hogy a CB1, a CB2 és a TRPV1 specifikus siRNS próba jelentősen lecsendesítette a vizsgált receptor expresszióját a kontrollhoz, valamint a negatív kontrollként alkalmazott „scrambled” siRNS-hez képest (**22. ábra**).

Az AEA vizsgálatát a transzfekciót követő második napon végeztük, amikor a géncsökkentés a leghatékonyabbnak mutatkozott. Sem a transzfekciós kontrollként használt „scrambled” siRNS, sem pedig az adott receptorokkal szemben specifikus siRNS próbák nem csökkentették a élő keratinocyták számát, sőt azt tapasztaltuk, hogy a CB1 és TRPV1 géncsökkentése szignifikánsan fokozta a sejtek életképességét (**23. A ábra**), az anandamid nem tudta kifejteni fentebb tapasztalt celluláris hatásait sem a CB1, sem a TRPV1 transzfekcióját követően. A farmakológiai vizsgálatok eredményeihez hasonlóan a CB1 és a TRPV1 együttes géncsökkentése sem bizonyult additívnek (**23. B, C és D ábra**). Ezen eredményeink tovább erősítették azt a felvetést, miszerintszerint tehát a receptorok konstitutív aktivitása gátolja az epidermális keratinocyták növekedését és proliferációját.

Az AEA celluláris hatásait feltehetően egy szekvenciálisan aktiválódó jelátviteli mechanizmus (CB1 → TRPV1 → Ca²⁺-beáramlás) mediálja humán keratinocytákban

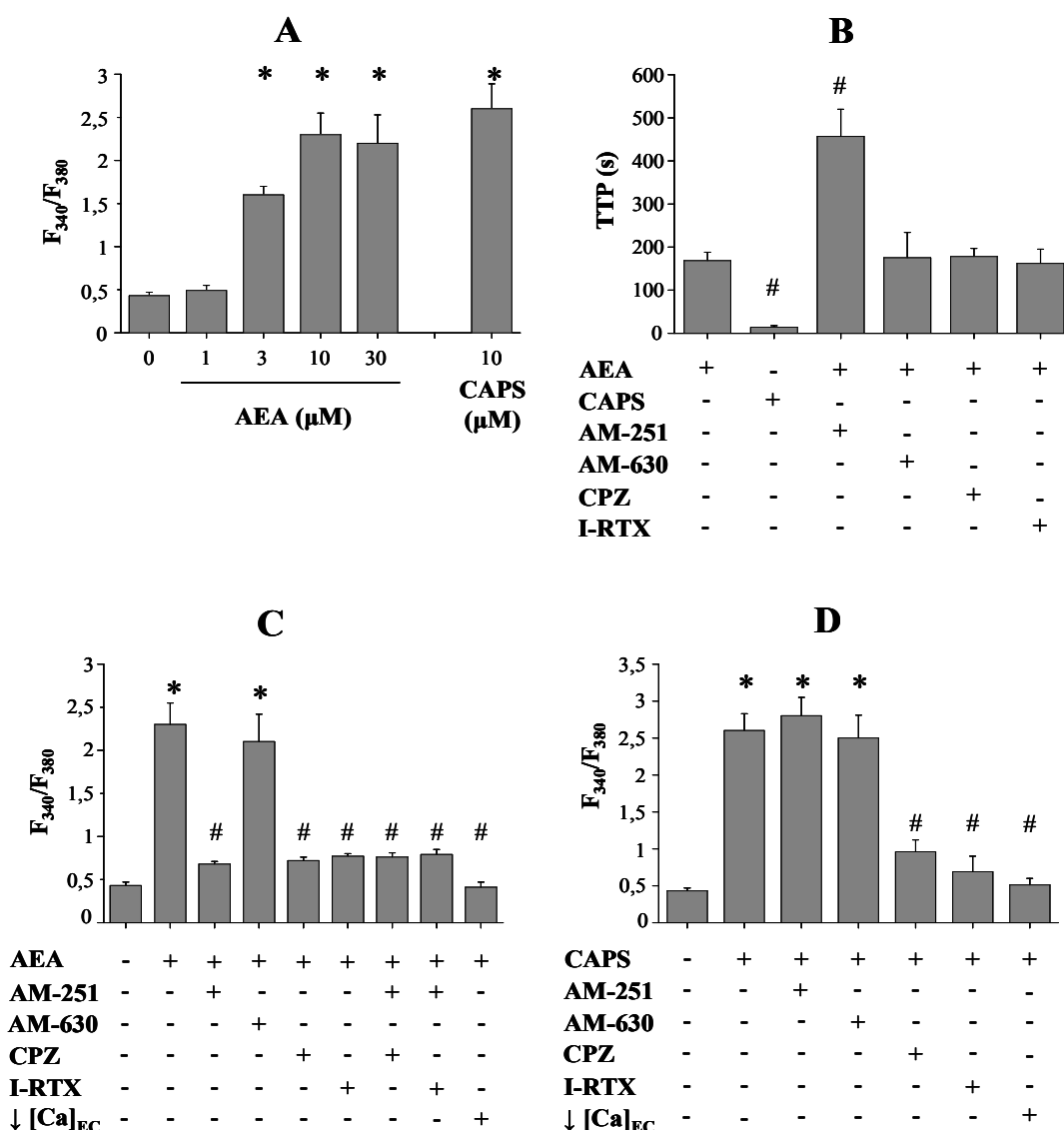
Mivel a farmakológiai és siRNS kísérletek során sem láttuk jelét a CB1 és a TRPV1 gátlás additivitásának, ezért felmerült, hogy az AEA nem egyszerre, hanem időben egymás után aktiválja a receptorokat. Ennek tisztázása érdekében további kísérleteket végeztünk. Mivel a TRPV1 funkcionális Ca²⁺ csatornaként működik a HaCaT keratinocytákon (Southall és mtsai, 2003; Bodó és mtsai, 2005), fura 2-AM Ca²⁺-érzékeny festék segítségével optikai úton mértük az anandamid hatására a sejteken az [Ca²⁺]_{IC}-ban bekövetkező változásokat. Pozitív kontrollként a TRPV1 specifikus agonista CAPS-t használtuk, ami bizonyítottan fokozza a humán epidermális keratinocyták [Ca²⁺]_{IC}-ját (Southall és mtsai, 2003; Bodó és mtsai, 2005).



23. ábra: Az AEA nem tudja kifejteni celluláris hatásait a CB1 és a TRPV1 géncsendesített HaCaT sejteken
 Specifikus CB1, CB2 és TRPV1 ellenes siRNS próbákkal tranziens transzfekciót végeztünk, majd 48 órás inkubáció után 10 μ M anandamiddal kezeltük újabb 24 órán keresztül a sejteket. **A, B:** Az élő sejtek számának meghatározását MTT-assay segítségével végeztük. **A:** Az siRNS próbák nem csökkentik az életképességet, ugyanakkor a CB1 és a TRPV1 próbák külön-külön és additívan alkalmazva is fokozták a viabilitást. **B:** A CB1 és a TRPV1 próbák (és azok együttes alkalmazása) mellett az AEA nem tudta kifejteni sejtcsökkentő hatását. **C, D:** Az apoptózis vizsgálatára kvantitatív fluoreszcencia méréseket végeztünk DilC₁(5) (**C**), valamint Annexin-V festést (**D**) követően. Az AEA a CB1 és/vagy a TRPV1 siRNS próbák mellett nem tudta kifejteni hatását. $N=2$. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg, a kontroll százalékában (vékony vízszintes vonal); * $p<0,05$, a SCR siRNS kontrollhoz képest; # $p<0,05$, AEA kezelt SCR siRNS-sel transzfektált sejtekhez képest.

Az „akutan” alkalmazott AEA dóziszfüggően megnövelte a sejtek $[Ca^{2+}]_{IC}$ -ját; ez az amplitúdó-emelkedés a kontrollként alkalmazott TRPV1 specifikus 10 μ M CAPS amplitúdójával közel azonos nagyságú volt (**24. A ábra**). Ez a hasonlóság nem mondható el ugyanakkor a két anyag hatásának kinetikájáról: míg a CAPS gyorsan, rövid idő alatt okozott tranziens Ca^{2+} -koncentráció emelkedést (time-to-peak, TTP: $13,8\pm 4$ s, mean $\pm$ SEM, $n=11$),

addig az AEA jóval hosszabb idő alatt tudta csak kifejteni hatását (TTP: 168,2±20 s, mean±SEM, n=16 sejt) (24. B ábra).



24. ábra: Az AEA feltehetően a CB1 receptoron keresztül aktiválja a TRPV1-et

A keratinocyták aktiválását követően fluoreszcens fura 2-AM festék jelenlétében mértük az intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_{IC}$) változását a sejtekben. A $[Ca^{2+}]_{IC}$ -t a 340 (F_{340}) és 380 nm-en (F_{380}) történő gerjesztés hatására emittált fluoreszcenciaintenzitás-hányadossal (F_{340}/F_{380}) jellemeztük. **A:** Az AEA növekvő koncentrációival perfundáltuk a sejteket, 10 μM AEA alkalmazásával értük el a maximális jelet; ez 10 μM CAPS hatásának felel meg. **B, C:** Specifikus antagonisták (CB₁: 1 μM AM-251; CB₂: 1 μM AM-630; TRPV1: 5 μM CPZ és 50 nM I-RTX) jelenlétében, valamint csökkentett $[Ca^{2+}]_{EC}$ mellett vizsgáltuk a 10 μM AEA által létrehozott csúcs eléréséhez szükséges időt (TTP) (**B**) és a kialakított tranzienst amplitúdóját (**C**). **D:** 10 μM CAPS hatása elmaradt a specifikus antagonisták és az alacsony $[Ca^{2+}]_{EC}$ mellett. $N > 10$. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg; * $p < 0,05$, kontroll (nem perfundált) sejtekhez képest; # $p < 0,05$, AEA kezelt (**B, C**), illetve CAPS kezelt (**D**) sejtekhez képest.

Ezt követően kíváncsiak voltunk arra, hogy az AEA „akut” alkalmazásakor kiváltott tranzienst kialakulása kivédhető-e az eddig alkalmazott antagonistákkal. Megállapítottuk, hogy az AEA által indukált Ca^{2+} -tranziensek egyaránt gátolhatók voltak a CB1 antagonista AM-

251, valamint a TRPV1 antagonistá I-RTX és CPZ alkalmazásával, továbbá az $[Ca^{2+}]_{EC}$ csökkentésével (**24. C ábra**) (a CB2 antagonistá hatástalannak bizonyult). Kimutattuk azt is, hogy a CB1 and TRPV1 inhibitorok együttes alkalmazása ismételt nem váltott ki additív hatást. Ezen eredményeink arra utaltak, hogy a CB1 mellett a TRPV1, mint funkcionális Ca^{2+} -csatorna, is szerepet játszik az AEA hatásának kialakításában.

Habár mindkét receptor antagonistája kivédte az AEA által létrehozott Ca^{2+} -tranziens kialakulását, a CB1 és a TRPV1 gátlás kinetikája jelentősen különbözött egymástól. Azaz, míg a TRPV1 antagonisták adagolásakor nem változott a hatás kialakulásához szükséges idő (TTP), addig a CB1 gátlás hatására az amplitúdó csökkenése mellett a tranziens kialakulásához szükséges idő is jelentősen (mintegy 200%-kal) megemelkedett (**24. B ábra**) (a CB2 antagonistá ismét hatástalannak bizonyult). Végezetül (várakozásainknak megfelelően) bebizonyosodott, hogy a CAPS hatását jelentős mértékben meggátolta a TRPV1 antagonistá CPZ és I-RTX, valamint az $[Ca^{2+}]_{EC}$ csökkentése, ugyanakkor nem befolyásolta a CB1 antagonistá AM-251 alkalmazása (**24. D ábra**).

Mindezen eredményeinket összefoglalva megállapítható, hogy az AEA keratinocytá proliferációt gátló és sejthalált indukáló hatását feltehetően egy szekvenciálisan aktiválódó és egymással szoros kapcsolatban álló jelátviteli láncolat ($CB1 \rightarrow TRPV1 \rightarrow Ca^{2+}$ -beáramlás) beindításán keresztül fejti ki.

MEGBESZÉLÉS

A humán SZ95 sebocyták funkcionális, konstitutív aktivitással bíró endocannabinoid rendszerrel rendelkeznek

Az endocannabinoid rendszer olyan sokoldalú szabályozó szerepet tölt be a szervezetben, amelynek még messze nem ismerjük minden vonatkozását. Ennek megismerése az 1990-es évek elején kezdődött a marihuana pszichoaktív komponensét, a THC-t felismerő membránreceptor felfedezésével. Az ezredforduló felé közeledve egyre több endocannabinoid vegyületet azonosítottak, így először az anandamidot és a 2-AG-t, majd később a noladin-étért, a N-arachidonoil-dopamint és a virodhamint. A figyelem az utóbbi évek során egyre inkább a bioszintézisükre és molekuláris mechanizmusaikra, sőt, az utóbbi években klinikai hatásaikra terelődött. Az 1-es típusú cannabinoid receptort (CB1) először a központi idegrendszerben, míg a 2-es típusút (CB2) az immunrendszerben írták le. Idővel azonban kiderült, hogy a receptorok lokalizációja közel sem ilyen egyértelmű; mindkét receptor típus megtalálható ugyanis a szervezet számos sejt- és szövetféleségében. Mindezen adatok arra utaltak, hogy az endocannabinoid rendszer sokkal komplexebb, mint eleinte gondoltuk.

A bőr és függelékeinek biológiáját elemző kísérleteinkben kutatócsoportunk sikerrel mutatta ki a funkcionális endocannabinoid rendszer kifejeződését a humán szőrtüszőben (Telek és mtsai, 2007). Az azzal funkcionális egységet képező faggyúmirigyek esetén ugyanakkor keveset tudtunk a cannabinoid rendszer jelenlétéről, illetve annak funkciójáról. Elsősorban ezért választottuk kísérleteink első felének alanyául a faggyúmirigyet, illetve az abból származtatott SZ95 sebocyta sejtvonalat.

Először a humán faggyúmirigy CB1 és CB2 expressziós mintázatát vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel (**8. ábra**). Ständer és munkatársainak eredményeit laboratóriumunk is alátámasztotta, miszerint mindkét receptor megtalálható a humán faggyúmirigyekben *in situ*. Ugyanezt már nem mondhatjuk el a faggyúmirigyből származó immortalizált SZ95 sejtvonalról: immuncitokémiával, valamint Western blot technikával igazoltuk a CB2 receptor jelenlétét a sebocytákon, míg a CB1 expressziója nem volt megfigyelhető. RT-PCR-technikával végzett mRNS szintű vizsgálataink során szintén csak a CB2 receptort sikerült kimutatnunk (**9. ábra**).

Kollaborációs partnereink emellett kimutatták, hogy az SZ95 sebocyták képesek az AEA és a 2-AG termelésére (AEA esetében $66,7 \pm 10$ fmol/mg; 2-AG esetében $6,2 \pm 1$ pmol/mg). Ez a mennyiség összevethető volt a korábban leírt, különböző állati bőrterületeken

talált endocannabinoid koncentrációkkal (patkány talp- és egér fülmintákban; Calignano és mtsai, 1998; Karsak és mtsai, 2007), viszont mintegy 10-szeres mennyiségben meghaladják a laboratóriumunk által a humán follikulusokban leírt koncentrációkat (6,6-11,2 fmol/mg szövet anandamid; 0,3 fmol/mg szövet 2-AG, Telek és mtsai, 2007).

Miután sikeresen kimutattuk az endocannabinoid rendszer legfontosabb tagjainak (CB2, AEA, 2-AG) jelenlétét a faggyúmirigysejteken, a következőkben a rendszer lehetséges szabályozó szerepének felderítésére törekedtünk. Megvizsgáltuk, hogy a cannabinoidok befolyásolják-e a sebocyták differenciálódását jelző neutrális lipidek szintézisét. Mind szemikvantitatív (Oil Red O festés, **10. A ábra**), mind kvantitatív (fluoreszcens Nile Red jelölés, **10. B ábra**) módszerek alkalmazása mellett azt tapasztaltuk, hogy az AEA- és a 2-AG-kezelés hatására jelentősen fokozódott a sejtekben a lipidszintézis. A vegyületek emellett csökkentették a sebocyták életképességét is, melynek hátterében főként az apoptotikus folyamatok beindulása állt (G6PD-felszabadulás, Mitoprobe-assay, Annexin-V pozitivitás, **11., 12. ábra**).

Irodalmi adatok szerint az AEA celluláris hatásait a CB1, CB2 és/vagy TRPV1 mediálta útvonalon keresztül hozza létre (azaz mind endocannabinoid, mind endovanilloid funkciókkal rendelkezhet) (Di Marzo és mtsai, 2002 és 2004; Piomelli, 2005; Pacher és mtsai, 2006; Felder és mtsai, 2006). Ezen kívül laboratóriumunk munkáinak köszönhetően már azt is tudtuk, hogy a TRPV1 megtalálható az SZ95 sebocytákon (Tóth és mtsai, 2009); ezért munkánk fontos lépése volt meghatározni azt, hogy az endocannabinoidok mely receptor(ok)on fejtik ki hatásukat. Az AEA sejtszámcsökkentő és apoptózist indukáló hatását kivédte a CB2 specifikus antagonistá AM-630, ugyanakkor a CB1 antagonistá AM-251 és a TRPV1 antagonistá I-RTX hatástalannak bizonyult (**13. ábra**). Szintetikus agonistákkal végzett kísérleteink ugyancsak a CB2 receptor funkcionális jelenlétét támasztották alá: a CB2-receptor specifikus agonista JWH-015 az AEA-dal megegyező hatást produkált, míg a szintetikus, CB1-receptor specifikus agonista ACEA nem befolyásolta a lipidszintézist, sem pedig a sejtek életképességét (**14. ábra**). Feltételezhető tehát, hogy az AEA hatásait kizárólag a CB2 aktivációján keresztül fejtette ki. Ezt az elképzelést tovább erősítették a CB-géncsendesítés során kapott eredményeink is, miszerint az AEA a CB2-géncsendesített sejteken hatástalannak bizonyult. Megfigyeltük azt is, hogy a CB2 siRNS-sel kezelt sejtek alap faggyútermelése lényegesen alacsonyabb volt, mint a nem transzfektált kontroll sejteké (**15. ábra**). Ezen eredményünk arra utal, hogy az SZ95 sebocyták lipidszintézist szabályozó jelátviteli mechanizmusában az endocannabinoid rendszer (konkrétan a CB2) funkcionális szereppel bír.

Kísérleteink során megvizsgáltuk azokat az intracelluláris jelátviteli útvonalakat (PKC, MAPK, PI3K) is, melyekről korábban leírták, hogy résztvehetnek az endocannabinoid szignalizáció mechanizmusában (Melck és mtsai, 1999; Derkinderen és mtsai, 2003; Velez-Pardo és mtsai, 2006). Munkánk során bebizonyosodott, hogy a sebocyták CB2-mediált folyamataiban a MAPK útvonal aktiválódása is szerepet játszik (**16. ábra**). Az intracelluláris jelátviteli útvonal további potenciális tagjait kutatva a különböző PPAR-ok szerepét elemeztük. Korábbi kísérletes adatok arra utaltak, hogy az endocannabinoidok egyaránt lehetnek a PPAR-ok aktivátorai is (Devchand és mtsai, 1996; Desvergne és Wahli, 1999; Bouaboula és mtsai, 2005; Burstein, 2005; O’Sullivan, 2007). A PPAR-okról ismert, hogy a lipidmetabolizmus fontos regulátorai (Schoonjans és mtsai, 1996; Lee és mtsai, 2003), sőt irodalmi adatokból azt is tudjuk, hogy a receptorcsalád tagjai szerepet játszanak a sebocyták lipidtermelésének szabályozásában is (Rosenfield és mtsai, 1999; Chen és mtsai, 2003; Trivedi és mtsai, 2006). Kísérleteink során kapott eredményeink arra utalnak, hogy az endocannabinoidok lipidakkumulációt fokozó hatásában szerepet játszhat a lipidszintézist pozitívan reguláló gének expressziójának aktiválása (**1. táblázat**). Ezen eredményünket az is megerősíti, hogy az SZ95 sebocytákon a PPAR γ szelektív inhibitor, a GW9662 (Zhang és mtsai, 2006) az AEA lipidakkumulációt növelő hatását képes volt jelentősen csökkenteni (**16. ábra**).

A faggyúmirigy a bőr homeosztázisában talán a legfontosabb szerepet betöltő mirigyünk. A homeosztatis viszonyok felborulása számos kórállapot kialakulásához vezethet; ilyen például az egyik legnagyobb prevalenciájú bőrbetegség, az acne vulgaris. Az acne komplex etiológiájú gyulladásos kórkép, melynek patogenezisében egyaránt szerepet játszik a keratinocyták hiperproliferációja miatt létrejövő comedoképződés, a sebocyták fokozott és megváltozott összetételű lipidtermelése (seborrhoea), valamint patogén mikroorganizmusok (pl. *Propionibacterium acne*) elszaporodása. Mivel az acne kialakulásának egyik első lépése a fokozott faggyútermelődés, így feltételezhető, hogy a faggyúmirigyek endocannabinoid rendszerének kóros túlműködése szerepet játszhat a betegség patogenezisében. Így kísérleteink során szerzett adataink – reményeink szerint – kiterjedt klinikai kutatásokat indíthatnak el, melyek feltárhatják, hogy a vegyületek miként használhatók nemcsak az acne, hanem más, a faggyúmirigy zavarával (akár túlműködésről, akár alulműködésről legyen szó) társuló bőrbetegségek kezelésében is.

Az AEA humán keratinocytákon kifejtett hatását a CB1 és a TRPV1 egymást követő aktivációja közvetíti

Ismert, hogy a bőr és függelékei nem csupán fizikai-kémiai barrier szerepet töltenek be, hanem neuro-immuno-endokrin rendszerként is felfoghatók (Slominski és Wortsman, 2000). Laboratóriumunk eredményei szerint az endocannabinoid AEA (mely, korábbi adataink alapján, önmagában a hajfollikulusokban is termelődik) és a jól ismert exogén cannabinoid THC számos biológiai funkciót befolyásol a humán szőrtüszőben (Telek és mtsai, 2007). Kimutattuk, hogy mindkét molekula – valószínűsíthetően CB1-mediált útvonalon keresztül – csökkenti a hajszál elongációját és fokozott apoptózissal járó katagén transzformációt indukál.

A disszertáció második felében bemutatott munkánk során bebizonyítottuk, hogy a humán epidermális keratinocytákon – *in situ* és *in vitro* egyaránt – az AEA a fent említett irányban módosította a celluláris folyamatok egyensúlyát, azaz gátolta a humán keratinocyták proliferációját, miközben apoptózist indukált. Kísérleteink során – korábbi irodalmi adatokat alátámasztva (Denda és mtsai, 2001; Maccarone és mtsai, 2003; Bodó és mtsai, 2005) – laboratóriumunk is kimutatta NHEK és a HaCaT keratinocytákon a TRPV1 mellett a CB1 és a CB2 jelenlétét is (**17., 18. ábra**). Farmakológiai vizsgálataink során ezt követően azt tapasztaltuk, hogy az AEA mind az NHEK sejtek, mind a HaCaT keratinocyták életképességét csökkentette és sejthalált indukált (**19. ábra**), valamint, hogy ezen hatások nagymértékben függtek a sejtekbe beáramló Ca^{2+} mennyiségétől. Kollaborációs partnereink humán bőr túlélő szervkultúrában végzett kísérletei alátámasztották *in vitro* sejteken kapott kísérleti eredményeinket; kimutatták, hogy AEA hatására *in situ* is csökkent a keratinocyták proliferációja és nőtt az apoptotikus sejtek aránya (**20. ábra**).

Funkcionális vizsgálati eredményeink azt az hipotézist vetették fel, miszerint az AEA az epidermális keratinocytákon egy összehangolt, meghatározott sorrendű és szekvenciálisan aktiválódó $\text{CB1} \rightarrow \text{TRPV1} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$ -beáramlás jelátviteli útvonalat indít be. A modell valódiságát számos kísérletes eredményünk támasztotta alá:

- (i) Az AEA sejtszámot csökkentő, apoptózist indukáló, valamint $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -t növelő hatását a CB1 antagonistá AM-251, a TRPV1 antagonistá CPZ és I-RTX, az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ csökkentése, valamint a CB1 és TRPV1 receptorok siRNS-mediálta lecsendesítése egyaránt kivédte.
- (ii) Érdekes módon a CB1 és a TRPV1 specifikus siRNS próbák, illetve a CB1 és a TRPV1 antagonisták együttes alkalmazása nem váltott ki additív hatást, ami azt sugallja, hogy az AEA nem „ko-aktiválta” a CB1 és TRPV1 molekulákat.

(iii) A receptorok aktiválódásának időbeli sorrendjét vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az AEA – szemben az azonnali Ca^{2+} -beáramlást kiváltó „direkt” TRPV1 agonista CAPS hatásával – csak jóval hosszabb idő eltelte után emelte meg az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -t. Habár nem zárható ki, hogy az AEA lassabb hatása a molekula korábban leírt (Lazar és mtsai, 2006; Ursu és mtsai, 2010) nagyobb lipofilicitásának volt köszönhető, eredményeik arra utalnak, hogy az AEA nem közvetlenül aktiválta a TRPV1-et, hanem eddig fel nem tárt szignalizációs útvonal(ak) beindítása révén.

(iv) Ezt a feltételezést – miszerint a TRPV1 aktivációjához vezető, az AEA által beindított „upstream” mechanizmusok között első helyen szerepel a CB1 aktivációja – az is bizonyítja, hogy habár a CB1 és TRPV1 antagonisták egyaránt csökkentették az AEA által beindított Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját, csak a CB1 antagonistá AM-251 növelte meg Ca^{2+} -tranziensek TTP értékeit (míg a TRPV1 „csatorna-antagonistái”, melyek nem befolyásolják a CB1 aktivitását, nem váltottak ki hasonló hatásokat).

(v) Végezetül azon eredményünk, miszerint a TRPV1 agonista CAPS Ca^{2+} -beáramlást indukáló hatását kizárólag a TRPV1 antagonisták és a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ csökkentése védte csak ki, míg a CB1 gátlása nem befolyásolta azt arra utal, hogy az AEA nem egy „fordított sorrendű” $\text{AEA} \rightarrow \text{TRPV1} \rightarrow \text{CB1} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$ -beáramlás mechanizmust indít be humán keratinocytákon.

Korábbi irodalmi adatokkal (Maccarone és mtsai, 2003; Telek és mtsai, 2007; Wilkinson és Williamson, 2007) jó összhangban kísérleteink során mi is kimutattuk a CB2 receptor kifejeződését a humán epidermális keratinocytákon. Molekuláris biológiai kísérleteinkben (siRNS) ugyanakkor bebizonyosodott, hogy habár az AEA ennek a receptornak is jól ismert agonistája, a CB2 feltehetően nem játszik szerepet a sejtek AEA-indukált sejtválaszainak kialakításában (ellentétben a faggyúmirigy-eredetű sebocytákon fent bemutatott kísérletes eredményeinkkel). Feltételezhető tehát, hogy a CB2 funkcionális szerepét a keratinocyták „életében” más folyamatok területén töltheti be. Erre utalnak korábbi kísérletes adatok is; kimutatták például, hogy a CB2 aktiváció hatására az epidermális keratinocytákból endogén opioidok (pl. β -endorfin) szabadulnak fel, melyek ezt követően a primer afferens neuronok μ -opioid receptorain keresztül antinociceptív hatást váltanak ki (Ibrahim és mtsai, 2005). Bebizonyodott az is, hogy a CB2-mediált szignalizáció jelentős szereppel bír különböző állatmodellekben létrehozott bőrgyulladás (dermatitis) folyamatainak szabályozásában is (Oka és mtsai, 2006; Karsak és mtsai, 2007).

Az epidermális keratinocytákon végzett kísérleteink eredményei potenciális klinikai jelentőséggel is bírnak. Mivel a CB1 és a TRPV1 antagonisták, valamint a specifikus siRNS próbák kivédtek az AEA proliferációt gátló és sejthalált indukáló hatását, kísérletes

eredményeink szerint ezen újonnan felfedezett, feltehetően endogén módon aktív endocannabinoid-receptor-csatorna mechanizmus folyamatosan „kontroll alatt tartja” a sejtek növekedését, azaz véd a hiperproliferáció ellen. Ezen feltevésünket erősít(het)i Casanova és munkatársai (2003) korábbi eredményei, miszerint a cannabinoid receptorok stimulálása apoptózist indukált epidermális tumorsejtekben. Úgy tűnik tehát, hogy a bőr „finoman hangolt” endocannabinoid „tónusa” – melyet a folyamatosan vagy az igényeknek megfelelően „on-demand” termelődő endocannabinoidok állítanak be – nemcsak a bőrfüggelékek növekedésének, a faggyúmirigy zsírttermelésének, valamint a bőr immunfolyamatainak szabályozásában vesz részt, hanem mélyreható módon képes az epidermális folyamatok befolyásolására is (összefoglalva Bíró és mtsai, 2009).

Természetesen további kísérletek szükségeltetnek a fent bemutatott új mechanizmus *in vivo* relevanciájának megítéléséhez. Szisztematikus analízisre vár továbbá azon kérdés megválaszolása is, miszerint a bőr endocannabinoid rendszerének kóros működése szerepet játszik-e különféle dermatózisok – pl. krónikus hiperproliferatív bőrbetegségek, viszketéssel járó kórképek, a bőr gyulladásos megbetegedései – pathogenezisében. Végezetül, reményeink szerint, kísérleteink folytatásaként olyan vizsgálatok indulnak el, melyek feltárják a bőr endocannabinoid rendszerének célzott farmakológiai manipulálásában rejlő lehetőségeket olyan nagy prevalenciájú, gyakran igen súlyos kórképek kezelésében, mint pl. a pikkelysömör vagy a bőr eredetű rosszindulatú daganatok.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben az endocannabinoid rendszer szerepét vizsgáltuk a humán bőr epidermalis keratinocytái és a faggyúmirigy-eredetű sebocyták alapvető biológiai folyamatainak szabályozásában. Laboratóriumunk korábban igazolta az endocannabinoid rendszer jelenlétét a szőrtüsző különféle elemeiben. Kísérleteink első részében a pilosebaceous egység másik tagján, a faggyúmirigy sebocytáin vizsgáltuk a rendszer funkcionális jelenlétét. A faggyúmirigyhez hasonlóan az immortalizált SZ95 sebocytákon is igazoltuk a CB2 receptor jelenlétét, azonban a CB1 receptor expressziója a sejtvonalon nem volt megfigyelhető. Kollaborációs partnereink sikerrel igazolták, hogy az SZ95 sebocyták endocannabinoid AEA-ot és 2-AG-t termelnek. Kimutattuk továbbá, hogy az endocannabinoidok jelentős mértékben és dózis-függő módon fokozták a sejtek lipidtermelését, valamint főként apoptózis következtében létrejövő sejthalált indukáltak. Az endocannabinoidok emellett a lipid homeosztázisban kulcsfontosságú szerepet betöltő PPAR magreceptor családba tartozó PPAR δ és - γ expresszióját, illetve a PPAR γ célgénnek kifejeződését is jelentős mértékben fokozta. Bebizonyosodott továbbá, hogy a fenti CB2 receptor-mediált sejtfolyamatokban a MAPK útvonal aktiválódása is szerepet játszhat. Mivel a CB2 „géncsendesített” sebocyták bazális lipidtermelése alacsonyabb volt, mint a kezeletlen kontroll sejteké, kísérletes eredményeink egy új, CB2-kapcsolt, feltehetően konstitutíven aktív, endocannabinoid-szabályozott jelátviteli mechanizmus szerepére utalnak a humán sebocyták lipidszintézisének és túlélésének szabályozásában.

A CB1-et, a CB2-t és a TRPV1-et is expresszáló epidermális eredetű NHEK és HaCaT sejteken, valamint humán bőr túlélő szervkultúrán végzett kísérleteink során megállapítottuk, hogy az endocannabinoid AEA *in vitro* és *in situ* gátolta a sejtek proliferációját, miközben $[Ca^{2+}]_{IC}$ növekedéssel járó sejthalált indukált. Bemutattuk azt is, hogy ezen sejtfolyamatok egy új, feltehetően endogén módon aktív szignalizációs mechanizmus beindítása révén valósultak meg, mely magában foglalja a metabotróp CB1 és az ionotróp cannabinoid receptor TRPV1 szekvenciális aktiválódását. Reményeink szerint, kísérleteink folytatásaként olyan vizsgálatok indulnak el, melyek feltárják a bőr endocannabinoid rendszerének célzott farmakológiai manipulálásában rejlő lehetőségeket olyan nagy prevalenciájú, gyakran igen súlyos kórképek kezelésében, mint pl. a pikkelysömör vagy a bőr eredetű rosszindulatú daganatok.

SUMMARY

In our experiments, we have investigated the role of the endocannabinoid system in the regulation of key biological processes of human epidermal keratinocytes and sebaceous gland-derived sebocytes. We have previously identified the expression of the endocannabinoid system in various elements of the hair follicles. In the first phase of our study, we have analyzed the functional expression of the system on sebaceous gland-derived sebocytes. Similar to the sebaceous glands, we have identified the existence of CB2 receptor in immortalized SZ95 sebocytes whereas the expression of CB1 was not confirmed. Furthermore, our collaboration partners have shown that these cells produce endocannabinoids, i.e. AEA and 2-AG. We have also found that the endocannabinoids markedly and dose-dependently stimulated sebaceous lipid synthesis and induced a chiefly apoptosis-driven cell death. Besides, endocannabinoids significantly stimulated gene expression of various members of the PPAR nuclear receptor family (PPAR δ and - γ) and of PPAR γ target genes. It was also shown that these actions were selectively mediated by CB2-coupled signaling involving the MAPK pathway. Since cells with “silenced” CB2 exhibited significantly suppressed basal lipid production, our results collectively suggest that human sebocytes utilize a paracrine-autocrine, endogenously active, CB2-mediated endocannabinoid signaling system for positively regulating lipid production and cell survival.

Using human cultured keratinocytes (which express CB1, CB2, and TRPV1) and skin organ-culture models, we have provided the first evidence that AEA markedly suppresses keratinocyte proliferation and induces cell death, most probably due to a Ca²⁺-influx, both *in vitro* and *in situ*. Moreover, we also present that these cellular actions are mediated by a novel, most probably constitutively active signaling mechanism which involves the activation of the metabotropic cannabinoid receptor CB₁ and a sequential engagement of the “ionotropic cannabinoid receptor” transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1). Hence, the data reported here may encourage one to explore whether the targeted manipulation of the above signaling pathway of the cutaneous ECS could become a useful adjunct treatment strategy for hyperproliferative human dermatoses such as e.g. psoriasis or keratinocyte-derived skin tumors.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ahluwalia J, Yaqoob M, Urban L, Bevan S, Nagy I. (2003): Activation of capsaicin-sensitive primary sensory neurones induces anandamide production and release. *J Neurochem.* 84(3), 585-591.
- Aleestas T, Ganceviciene R, Fimmel S, Muller-Decker K, Zouboulis CC. (2006): Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B4 and prostaglandin E2 are active in sebaceous glands. *J Mol Med.* 84(1), 75-87.
- Barker JN, Jones ML, Mitra RS, Crockett-Torabe E, Fantone JC, Kunkel SL, Warren JS, Dixit VM, Nickoloff BJ. (1991): Modulation of keratinocyte-derived interleukin-8 which is chemotactic for neutrophils and T lymphocytes. *Am J Pathol.* 139(4), 869-876.
- Bátkai S, Járαι Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, Wang L, Mirshahi F, Khanolkar AD, Makriyannis A, Urbaschek R, Garcia N.Jr, Sanyal AJ, Kunos G. (2001): Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med.* 7, 827-832.
- Bátkai S, Mukhopadhyay P, Harvey-White J, Kechrid R, Pacher P, Kunos G. (2007): Endocannabinoids acting at CB1 receptors mediate the cardiac contractile dysfunction in vivo in cirrhotic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(3), 1689-1695.
- Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Barg J, Mechoulam R, Vogel Z. (1995): The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett.* 375, 143-147.
- Bevan SJ, Docherty RJ, Wood J. (1993): Cellular mechanisms of the action of capsaicin. In: Wood JN. (ed.): Capsaicin in the study of pain. *Academic Press*, 27-44.
- Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ. (2001): Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(23), 13396-13401.
- Bíró T, Maurer M, Modarres S, Lewin NE, Brodie C, Acs G, Acs P, Paus R, Blumberg PM. (1998): Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood.* 91(4), 1332-1340.
- Bíró T, Tóth IB, Haskó G, Paus R, Pacher P. (2009) The endocannabinoid system of the skin in health and disease: Novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends Pharmacol Sci.* 30, 411-420.
- Blazquez C, Carracedo A, Barrado L, Real PJ, Fernandez-Luna JL, Velasco G, Malumbres M, Guzman M. (2006): Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J.* 20, 2633-2635.

- Bodó E, Kovács I, Telek A, Varga A, Paus R, Kovács L, Bíró T. (2004): Vanilloid receptor-1 (VR1) is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin. *J Invest Dermatol.* 123(2), 410-413.
- Bodó E, Bíró T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Tóth IB, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Kovács L, Paus R. (2005): A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signalling in human hair growth control. *Am J Pathol.* 166, 985-998.
- Bonz A, Laser M, Kullmer S, Kniesch S, Babin-Ebell J, Popp V, Ertl G, Wagner JA. (2003): Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.* 41, 657-664.
- Bos JD, Kapsenberg ML. (1993): The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol Today.* 14(2), 75-78.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P. (1996): Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem.* 237, 704-711.
- Bouaboula M, Hilairat S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. (2005): Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol.* 517(3), 174-181.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. (1988): Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *The Journal of Cell Biology* 106, 761-771.
- Börner C, Höllt V, Kraus J. (2006): Cannabinoid receptor type 2 agonists induce transcription of the mu-opioid receptor gene in Jurkat T cells. *Mol Pharmacol.* 69(4), 1486-1491.
- Breitkreutz D, Boukamp P, Ryle CM, Stark HJ, Roop DR, Fusenig NE. (1991): Epidermal morphogenesis and keratin expression in c-Ha-ras-transfected tumorigenic clones of the human HaCaT cell line. *Cancer Res.* 51(16), 4402-4409.
- Brown AJ, Robin Hiley C. (2009): Is GPR55 an anandamide receptor? *Vitam Horm.* 81, 111-137.
- Burstein S. (2005): PPAR-gamma: a nuclear receptor with affinity for cannabinoids. *Life Sci.* 77(14), 1674-1684.
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. (1998): Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature.* 394, 277-281.
- Casanova ML, Blázquez C, Martínez-Palacio J, Villanueva C, Fernández-Aceñero MJ, Huffman JW, Jorcano JL, Guzmán M. (2003): Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest.* 111(1), 43-50.

- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. (1997): The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 389(6653), 816-824.
- Chen W, Yang CC, Sheu HM, Seltmann H, Zouboulis CC. (2003): Expression of peroxisome proliferator-activated receptor and CCAAT/enhancer binding protein transcription factors in cultured human sebocytes. *J Invest Dermatol*. 121(3), 441-447.
- Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. (2003): The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*. 112(3): 423-431.
- Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A, Matsunaga K. (2001): Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem Biophys Commun*. 285, 250-252.
- Derkinderen P, Ledent C, Parmentier M, Girault JA. (2001): Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus. *J Neurochem*. 77(3):957-960.
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA. (2003): Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci*. 23, 2371-2382.
- Desvergne B, Wahli W. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 20(5), 649-688.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. (1992): Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258, 1946-1949.
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. (1996): The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*. 384(6604), 39-43.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. (2004): The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*. 3, 7712-7784.
- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L. (2001): Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol Sci*. 22, 346-349.
- Di Marzo V, Blumberg PM, Szállási Á. (2002): Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol*. 12, 372-379.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. (1994): Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 372(6507), 686-691.

- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. (1998): Endocannabinoid: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* 21, 521-528.
- Dinh TP, Kathuria S, Piomelli D. (2004): RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol.* 66(5), 1260-1264.
- Dinis P, Charrua A, Avelino A, Yaqoob M, Bevan S, Nagy I, Cruz F. (2004): Anandamide-evoked activation of vanilloid receptor 1 contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. *J Neurosci.* 24(50), 11253-11263.
- Drew WG, Weet CR, De Rossett SE, Batt JR. (1980) Effects of hippocampal brain damage on auditory and visual recent memory: comparison with marijuana-intoxicated subjects. *Biol Psychiatry.* 15(6), 841-858.
- Dvorak M, Watkinson A, McGlone F, Rukwied R. (2003): Histamine induced responses are attenuated by a cannabinoid receptor agonist in human skin. *Inflamm Res.* 52, 238-245.
- Ekert PG, Silke J, Vaux DL. (1999): Caspase inhibitors. *Cell Death Differ.* 6(11), 1081-1086.
- El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Khalifa Y, Tsai NT, Caldwell RB, Liou GI. (2006): Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabinoids in experimental diabetes. *Am J Pathol.* 168, 235-244.
- Felder CC, Dickason-Chesterfield AK, Moore SA. (2006): Cannabinoids biology: the search for new therapeutic targets. *Mol Interv.* 6, 149-161.
- Fernandez-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolon RM, Ramos JA, Guzman M. (2007) Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci.* 28, 39-45.
- Foitzik K, Lindner G, Müller-Röver S, Maurer M, Botchkareva N, Botchkarev V, Handjiski B, Metz M, Hibino T, Soma T, Dotto GP, Paus R. (2000): Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 in vivo. *FASEB J.* 14, 752-760.
- Fride E. (2005): Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 4(6), 633-642.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* 83(3), 1017-1066.
- Fuchs J, Nitschmann WH, Packer L. (1990): The antipsoriatic compound anthralin influences bioenergetic parameters and redox properties of energy transducing membranes. *J Invest Dermatol.* 94(1), 71-76.
- Fujie T, Shikiji T, Uchida N, Urano Y, Nagae H, Arase S. (1996): Culture of cells derived

- from the human sebaceous gland under serum-free conditions without a biological feeder layer or specific matrices. *Arch Dermatol Res.* 288(11), 703-708.
- Fusenig NE, Boukamp P. (1998): Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog.* 23(3), 144-158.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. (2006): Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Research Report.* 1071, 10-23.
- Goodman LS, Gilman A. (1996): The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th Edition, McGraw Hill
- Green DR, Reed JC. (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281(5381), 1309-1312.
- Griger Z, Páyer E, Kovács I, Tóth BI, Kovács L, Sipka S, Bíró T. (2007): Protein kinase C- β and δ isoenzymes promote arachidonic acid production and proliferation of MonoMac-6 cells. *J Mol Med.* 85(9), 1031-1042.
- Grinspoon L, Bakalar JB. (1995): Marijuana as medicine. A plea for reconsideration. *J Am Med Soc.* 273(23), 1875-1876.
- Hall W, Degenhardt L. (2000): Cannabis use and psychosis: a review of clinical and epidemiological evidence. *Aust N Z J Psychiatry.* 34(1), 26-34.
- Hall W. and Solowij N. (1998): Adverse effects of cannabis. *Lancet.* 352, 1611-1616.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Lolic M, Wink D, Rosenthal R, Axelrod J. (2000): Neuroprotective antioxidants from marijuana. *Ann N Y Acad Sci.* 899, 274-282.
- Harding CR, Scott IR. (1983): Histidine-rich proteins (filaggrins): structural and functional heterogeneity during epidermal differentiation. *J Mol Biol.* 5;170(3), 651-673.
- Hiley CR, Hoi PM. (2007): Oleamide: a fatty acid amide signaling molecule in the cardiovascular system? *Cardiovasc Drug Rev.* 25(1), 46-60.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R and Pertwee RG. (2002): International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharm Reviews.* 54, 161-202.
- Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht P, Rice F, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah T, Mata H, Malan T. (2005): CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102, 3093-3098.
- Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Denda M. (2002): Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(1), 124-129.

- Járai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, Kunos G. (1999): Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 23;96(24), 14136-14141.
- Jarvinen T, Pate DW, Laine K. (2002): Cannabinoids in the treatment of glaucoma. *Pharmacol Ther*. 95(2), 203-220.
- Johanek LM, Simone DA. (2004): Activation of peripheral cannabinoid receptors attenuates cutaneous hyperalgesia produced by a heat injury. *Pain*. 109, 432-442.
- Johnson MR, Melvin LS, Althuis TH, Bindra JS, Harbert CA, Milne GM, Weissman A. (1981): Selective and potent analgetics derived from cannabinoids. *J Clin Pharmacol*. 21(8-9), 271-282.
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. (2004): Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*. 15;427(6971), 260-265.
- Karniol IG, Shirakawa I, Takahashi RN, Knobel E, Musty RE. (1975): Effects of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabinal in man. *Pharmacology*. 13(6), 502-512.
- Karsak M, Gaffal E, Date R, Wang-Eckhardt L, Rehnelt J, Petrosino S, Starowicz K, Steuder R, Schlicker E, Cravatt B, Mechoulam R, Buettner R, Werner S, Di Marzo V, Tüting T, Zimmer A. (2007): Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science*. 316(5830), 1494-1497.
- Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V. (2002): Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol*. 136(4), 550-557.
- Klein TW. (2005): Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 5, 400-411.
- Klein TW, Cabral GA. (2006): Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells. *J Neuroimmune Pharmacol*. 1, 150-164.
- Kunos G, Pacher P.(2004): Cannabinoids cool the intestine. *Nat Med*. 10, 678-679.
- Kuypers FA, Lewis RA, Hua M, Schott MA, Discher D, Ernst JD, Lubin BH. (1996): Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood*. 87(3):1179-1187.
- Laviolette SR, Grace AA. (2006): Cannabinoids Potentiate Emotional Learning Plasticity in Neurons of the Medial Prefrontal Cortex through Basolateral Amygdala Inputs. *J Neurosci*. 26(24), 6458-6468.

- Lázár J, Szabó T, Kovács L, Blumberg PM, Biró T (2003): Distinct features of recombinant rat vanilloid receptor-1 expressed in various expression systems. *Cell Mol Life Sci.* 60, 2228-2240.
- Lazar J, Braun DC, Toth A, Wang Y, Pearce LV, Pavlyukovets VA, Blumberg PM, Garfield SH, Wincovitch S, Choi HK, Lee J (2006): Kinetics of penetration influence the apparent potency of vanilloids on TRPV1. *Mol Pharmacol.* 69, 1166-1173.
- Lee CH, Olson P, Evans RM. (2003): Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology.* 144(6), 2201-2207.
- Leonard BE. (1992): Fundamentals of Psychopharmacology. *John Wiley & Sons, Baffins Lane.*
- Lindner G, Menrad A, Gharadi E, Merlino G, Welkes P, Handjinski B, Roloff B, Paus R. (2000): Involvement of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling. *FASEB J.* 14, 319-332.
- Liu J, Li H, Burstein SH, Zurier RB, Chen JD. (2003): Activation and binding of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by synthetic cannabinoid ajulemic acid. *Mol Pharmacol.* 63(5), 983-992.
- Lu Z, Hasse S, Bodo E, Rose C, Funk W, 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(1), 37-44.
- Maccarrone M, Di Rienzo M, Battista N, Gasperi V, Guerrieri P, Rossi A, 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.
- Mackie K, Stella N. (2006): Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J.* 8, 298-306.
- Mahadevan A, Siegel C, Martin BR, Abood ME, Beletskaya I, Razdan RK (2000.). Novel cannabinol probes for CB1 and CB2 cannabinoid receptors. *J Med Chem.* 43 (20), 3778-3785.
- Martini L, Waldhoer M, Pusch M, Kharazia V, Fong J, Lee JH, Freissmuth C, Whistler JL. (2007): Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1. *FASEB J.* 21, 802-811.
- Mathias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V. (2006): Regulation, function and dysregulation of endocannabinoids in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrin Metab.* 91(8), 3171-3180.

- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. (1990): Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564.
- Melck D, Rueda D, Galve-Roperh I, De Petrocellis L, Guzmán M, Di Marzo V. (1999): Involvement of the cAMP/protein kinase A pathway and of mitogen-activated protein kinase in the anti-proliferative effects of anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Letters* 463, 235-240.
- Merritt JC, Perry DD, Russell DN, Jones BF. (1981): Topical delta 9-tetrahydrocannabinol and aqueous dynamics in glaucoma. *J Clin Pharmacol.* 21, 467-471.
- Mitev V, Miteva L. (1999): Signal transduction in keratinocytes. *Exp Dermatol.* 8(2), 96-108.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. (1993): Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365, 61-65.
- Onaivi ES, Chaudhuri G, Abaci AS, Parker M, Manier DH, Martin PR, Hubbard JR. (1999): Expression of cannabinoid receptors and their gene transcripts in human blood cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 23(6), 1063-1077.
- Oka S, Wakui J, Ikeda S, Yanagimoto S, Kishimoto S, Gokoh M, Nasui M, Sugiura T (2006) Involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in oxazolone-induced contact dermatitis in mice. *J Immunol.* 177, 8796-8805.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasent L, Uhl GR. (2006): Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1074, 514-536.
- O'Sullivan SE. (2007): Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol.* 152(5), 576-582.
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G. (2005): Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest.* 115, 1298-1305.
- Pacher P, Batkai S, Kunos G. (2005): Cardiovascular pharmacology of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol.* 168, 599-625.
- Pacher P, Batkai S, Kunos G. (2006): The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 58, 389-462.
- Papp H, Czifra G, Lázár J, Gönczi M, Csernoch L, Kovács L, Biró T. (2003): Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol.* 12(6), 811-824.

- Pertwee RG. (2005): Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol.* (168), 1-51.
- Pickens JT. (1981.): Sedative activity of cannabis in relation to its delta'-trans-tetrahydrocannabinol and cannabidiol content. *Br J Pharmacol.* 72 (4), 649–656.
- Piomelli D. (2005): The endocannabinoid system: a drug discovery perspective. *Curr Opin Investig Drugs* 6, 672-679.
- Powles T, te Poele R, Shamash J, Chaplin T, Propper D, Joel S, Oliver T, Liu WM. (2005): Cannabis-induced cytotoxicity in leukemic cell lines: the role of the cannabinoid receptors and the MAPK pathway. *Blood.* 105(3), 1214-1221.
- Ramos JA, Gonzalez S, Sagredo O, Gomez-Ruiz M, Fernandez-Ruiz J. (2005): Therapeutic potential of the endocannabinoid system in the brain. *Mini Rev Med Chem.* 5, 609-617.
- Rosenfield RL. (1989): Relationship of sebaceous cell stage to growth in culture. *J Invest Dermatol.* 92(5), 751-754.
- Rosenfield RL, Deplewski D, Kentsis A, Ciletti N. (1998): Mechanisms of androgen induction of sebocyte differentiation. *Dermatology.* 196(1), 43-46.
- Rosenfield RL, Kentsis A, Deplewski D, Ciletti N. (1999): Rat preputial sebocyte differentiation involves peroxisome proliferator-activated receptors. *J Invest Dermatol.* 112(2), 226-232.
- Shappell SB, Gupta RA, Manning S, Whitehead R, Boeglin WE, Schneider C, Case T, Price J, Jack GS, Wheeler TM, Matusik RJ, Brash AR, Dubois RN. (2001): 15S-Hydroxyeicosatetraenoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* 61, 497-503.
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. (1996): The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1302(2), 93-109.
- Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. (1999): Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 112(3), 343-353.
- Slominski A, Wortsman J. (2000): Neuroendocrinology of the Skin. *Endocrine Reviews.* 21, 457-487.
- Smith KR, Thiboutot DM. (2008): Thematic review series: skin lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe? *J Lipid Res.* 49(2), 271-281.
- Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. (2003): Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 304(1), 217-222.

- Ständer S, Schmelz M, Metze D, Luger T, 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.
- Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Staub C, Karsak M, Zimmer A, Frossard JL, Mach F (2005): Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature (London)* 434, 782-786.
- Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. (1998): Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta.* 1366(1-2), 151-165.
- Telek A, Biró, T., Bodó, E., Tóth, B.I., Borbíró, I., Kunos, G., Paus, R. (2007): Inhibition of human hair follicle growth by endo- and exocannabinoids. *FASEB J.* 13, 3534-3544.
- Thacher SM, Rice RH. (1985): Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell.* 40(3), 685-695.
- Thiboutot D, Jabara S, McAllister JM, Sivarajah A, Gilliland K, Cong Z, Clawson G. (2003): Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1). *J Invest Dermatol.* 120(6), 905-914.
- Thody AJ, Shuster S. (1989): Control and function of sebaceous glands. *Physiol Rev.* 69(2), 383-416.
- Tiede S, Kloepper JE, Ernst N, Poeggeler B, Kruse C, Paus R. (2009): Nestin in human skin: exclusive expression in intramesenchymal skin compartments and regulation by leptin. *J Invest Dermatol.* 129(11), 2711-2720.
- Tóth BI, Géczy T, Griger Z, Dózsa A, Seltsmann H, Kovács L, Nagy L, Zouboulis CC, Paus R, Biró T. (2009): Transient receptor potential vanilloid-1 signaling as a regulator of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol.* 129(2), 329-339.
- Trivedi NR, Cong Z, Nelson AM, Albert AJ, Rosamilia LL, Sivarajah S, Gilliland KL, Liu W, Mauger DT, Gabbay RA, Thiboutot DM. (2006): Peroxisome proliferator-activated receptors increase human sebum production. *J Invest Dermatol.* 126(9), 2002-2009.
- Ungerleider JT, Andrysiak T, Fairbanks L, Goodnight J, Sarna G, Jamison K. (1982): Cannabis and cancer chemotherapy: a comparison of oral delta-9-THC and prochlorperazine. *Cancer.* 50(4), 636-645.
- Ursu D, Knopp K, Beattie RE, Liu B, Sher E (2010) Pungency of TRPV1 agonists is directly correlated with kinetics of receptor activation and lipophilicity. *Eur J Pharmacol.* 641, 114-122.
- Van Der Stelt M, Di Marzo V. (2004): Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem.* 271, 1827-1834.

- Van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. (1998): Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 31(1), 1-9.
- Velez-Pardo C, Del Rio MJ. (2006): Avoidance of Abeta[(25-35)] / (H₂O₂) -induced apoptosis in lymphocytes by the cannabinoid agonists CP55,940 and JWH-015 via receptor-independent and PI3K-dependent mechanisms: role of NF-kappaB and p53. *Med Chem*. 2, 471-479.
- Vosper H, Patel L, Graham TL, Khoudoli GA, Hill A, Macphee CH, Pinto I, Smith SA, Suckling KE, Wolf CR, Palmer CN. (2001): The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J Biol Chem*. 276
- Watt FM. (1983): Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol*. 81, 100-103.
- Wilkinson JD and Williamson EM (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 RI, Kunos G, Nicoll RA. (2001): Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron*. 31, 453-462.
- Wróbel A, Seltsmann H, Fimmel S, Müller-Decker K, Tsukada M, Bogdanoff B, Mandt N, Blume-Peytavi U, Orfanos CE, Zouboulis CC. (2003): Differentiation and apoptosis in human immortalized sebocytes. *J Invest Dermatol*. 120, 175-181.
- Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, Dussault B, Qin Y, Soukas A, Friedman JM, Holmes WE, Spiegelman BM. (2000): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Mol Cell Biol*. 20, 5343-5349.
- Zhang Q, Seltsmann H, Zouboulis CC, Konger RL. (2006): Involvement of PPARgamma in oxidative stress-mediated prostaglandin E(2) production in SZ95 human sebaceous gland cells. *J Invest Dermatol*. 126(1), 42-48.
- Zilahi M. (1953): A textilipar nyersanyagai. Tankönyvkiadó, Budapest
- Zouboulis CC, Bohm M. (2004): Neuroendocrine regulation of sebocytes -- a pathogenetic link between stress and acne. *Exp Dermatol*. 13(4), 31-35.
- Zouboulis CC, Baron JM, Bohm M, Kippenberger S, Kurzen H, Reichrath J, Thielitz A. (2008): Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Exp Dermatol*. 17(6), 542-551.
- Zouboulis CC, Seltsmann H, Neitzel H, Orfanos CE. (1999): Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol*. 113(6), 1011-1020.

- Zouboulis CC, Xia L, Akamatsu H, Seltmann H, Fritsch M, Hornemann S, Ruhl R, Chen W, Nau H, Orfanos CE. (1998): The human sebocyte culture model provides new insights into development and management of seborrhoea and acne. *Dermatology*. 196(1), 21-31.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. (1999): Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 400(6743), 452-457.

DOBROSI NÓRA *IN EXTENSO* KÖZLEMÉNYEINEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények:

Dobrosi N., Tóth BI, Nagy G, Dózsa A, Géczy T, Nagy L, Zouboulis CC, Paus R, Kovács L, Bíró T. (2008): Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J.* 22(10), 3685-3695. **IF:7,049**

Tóth BI, **Dobrosi N.**, Dajnoki A, Czifra G, Attila Oláh, Attila G. Szöllősi, István Juhász, Koji Sugawara, Paus R, Bíró T. (2010): Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential-1. *J Invest Dermatol.* (*Epub ahead of print*) doi: 10.1038/jid.2010.421. **IF:5,543**

További in extenso közlemények:

Bíró T, Tóth BI, Marincsák R, **Dobrosi N.**, Géczy T, Paus R. (2007): TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1772(8), 1004-1021. **IF:4,041**

Sárközi S, Almássy J, Lukács B, **Dobrosi N.**, Nagy G, Jóna I. (2007): Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor. *J Muscle Res Cell Motil.* 28(2-3), 167-174. **IF:1,731**

Galajda Z, Balla J, Szentmiklosi AJ, Bíró T, Czifra G, **Dobrosi N.**, Cseppento A, Patonay L, Roszer T, Balla G, Popescu LM, Lekli I, Tosaki A. (2010): Histamine and H₁-histamine receptors faster venous circulation. *J. Cell. Mol. Med.* (*Epub ahead of print*) doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01254.x. **IF: 5,228**

Kumulatív IF: 23,592

TÁRGYSZAVAK

Endocannabinoid

Cannabinoid receptor

Anandamid

Faggyúmirigy

Sebocyt

Bőr

Keratinocyt

Lipidszintézis

Apoptózis

Tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1)

$[Ca^{2+}]_{IC}$

Keywords:

Endocannabinoid

Cannabinoid receptor

Anandamide

Sebaceous gland

Sebocyte

Skin

Keratinocyte

Lipid synthesis

Apoptosis

Tranzient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1)

$[Ca^{2+}]_{IC}$

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AA – Arachidonsav
AC – Adenilát-cikláz
ACEA – Arachidonoyl-2-chloro-ethylamide
ADP – Adenozin-difoszfát
ADRP – adipose differentiation-related protein
AEA – N-arachidonylethanolamid=anandamid
2-AG – 2-arachidonoyl glycerol
AM – Acetoximetilészter
AMT – Anandamid membrán-transzporter
ANOVA – Varianciaanalízis
ATP – Adenozin-trifoszfát
BCA – Bicinchoninsav
BSA – Borjú szérum albumin
[Ca²⁺]_{EC} – Extracelluláris szabad Ca²⁺ koncentráció
[Ca²⁺]_{IC} – Intracelluláris szabad Ca²⁺ koncentráció
cAMP – Ciklikus adenozin-monofoszfát
CBD –Cannabidiol
CBN – Cannabinol
CB1 – Cannabinoid receptor-1
CB2 – Cannabinoid receptor-2
CMF-PBS – Kalcium- és magnéziummentes foszfát puffer
cDNS – Komplementer dezoxiribonukleinsav
COX-2 – Ciklooxygenáz-2
CAPS – Kapszaicin
CPZ – Kapszazepin
DAB – Diamino-benzidin
DAG – Diacil-glicerol
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol
DiIC₁(5) – 1,1',3,3',3'-hexametilindodicarbocianin-jodid
DMRM – Dulbecco's Modified Eagle's tenyésztőoldat
DNS – Dezoxiribonukleinsav
EGTA – Etilénglikol-tetraecetsav
Erk – Extracelluláris szignál regulált kináz
FAAH – Zsírsavamid-hidroláz
FAM – 6-karboxi-fluorescein
FBS – Embrionális borjú szérum
Fc receptor – Fc (fragment crystallizable) régiót kötő receptor
FcεRI –Nagy affinitású immunglobulin E Fc (fragment crystallizable) régiót kötő receptor
FITC – Fluorescein-izotiocianát
FLICA™ – Fluorescent-Labeled Inhibitor of Caspases
FLIPR – FLuorescence Image microPlate Reader
G6PD – Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GAPDH – Gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
GM-CSF – Granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor
GPR55 – G protein-kapcsolt receptor 55
HaCaT – Human Adult skin keratinocytes, low Ca²⁺, elevated Temperature

HEPES – 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetánszulfonsav
 HRP – Tormaperoxidáz
 IFN γ – Interferon- γ
 IgE – Immunglobulin E
 IGF-1 – Inzulinszerű növekedési faktor
 IgG – Immunglobulin G
 IL – interleukin
 I-RTX – Iodo-reziniferatoxin
 LTB₄ – Leukotrién B₄
 MAG-lipáz – Monoacilglicerol-lipáz
 MAPK – Mitogén-aktiválta protein kináz
 MHC – Fő hisztokompatibilitási komplex
 mRNS – Messenger ribonukleinsav
 MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium bromid
 NADA – N-arachidonoyl-dopamine
 NAPE – N-arachidonoil-foszfatidol-etanol-amid
 NHEK – Normál humán epidermális keratinocita
 NGF – Idei eredetű növekedési faktor
 Q-PCR – Kvantitatív valósidejű polimeráz láncreakció
 PAGE – Poliakrilamid gélelektroforézissel
 PBS – Foszfát puffer
 PBST – 1% Tween-20-at tartalmazó PBS
 PCR – Polimeráz láncreakció
 PDGF – Trombocita eredetű növekedési faktor
 pERK – Foszforilált ERK
 PGAR – PPAR γ -regulated angiopoietin-related protein
 PI3K – Foszfatidil-inozitol-3-kináz
 PKA – Protein kináz A
 PLC – Foszfolipáz-C
 PLD – Foszfolipáz-D
 PPAR – Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor
 RFU – Relatív fluoreszcencia egység
 RNS – Ribonukleinsav
 SCR-RNS – Scrambled siRNS
 SDS – Nátrium-dodecil-szulfát
 siRNS – Kis interferáló RNS
 TAMRA – 6-karboxi-tetrametil rodamin
 TdT – Terminális deoxinukleotidil transzferáz
 THC – (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
 TNF α – Tumor nekrosis faktor- α
 TRIS – Tris(hidroximetil)aminometán
 TRP – Tranziens receptor potenciál
 TRPV – Tranziens receptor potenciál vanilloid alicsalád
 TRPV1 – Tranziens receptor potenciál vanilloid-1 / vanilloid receptor-1 / kapszaicin receptor
 TTP – Maximum eléréséhez szükséges idő (time-to-peak)
 TUNEL – Terminális dezoxinukleotid- transzferáz-mediálta deoxiuridin-trifoszfát (dUTP)-
 jelölés
 UV – ultraviola
 VR1 = TRPV1

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

E sorokban szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak az egyetemi doktori értekezést megalapozó kísérletek elvégzésében, szakmai és baráti tanácsaikra mindig számíthattam.

Elsőként **Dr. Kovács László** és **Dr. Csernoch László** professzor uraknak, az Élettani Intézet egykori és jelenlegi vezetőjének, amiért lehetővé tették, hogy munkámat az Élettani Intézet Sejt- és Molekuláris Élettani Laboratóriumában folytathassam.

Szeretném megköszönni **Dr. Bíró Tamás** témavezetőmnek munkám során nyújtott hasznos ötleteit, segítségét és tanácsait.

Hálás vagyok a velem együtt dolgozó kollégáknak, **Telek Andreának, Tóth István Baláznak, Oláh Attilának, Borbíró Istvánnak, Szöllősi Attilának, Géczy Tamásnak**, akik hasznos tanácsokkal ellátva rengeteg segítséget nyújtottak a kísérletek elvégzésében.

Nagy Georginának, Csoma Eszternek és Juhász Tamásnak, hogy mind a munka, mind pedig az élet bármely területén önzetlen segítségükre bármikor számíthatok.

A remek TDK hallgatóknak, **Jenei Ágnesnek, Hollós Enikőnek, Szloboda Péternek, Ambrus Lídiának és Lisztes Erikának**, hogy szorgalmukkal, talpraesettségükkel bármikor rendelkezésre álltak.

A nélkülözhetetlen technikai segítségért és gyakorlati tanácsért hálával tartozom **Dr. Vargáné Kiss Ibolya** asszisztensnőnek.

Köszönöm az **Élettani Intézet valamennyi dolgozójának, PhD és TDK hallgatójának**, akik az évek során segítették munkámat.

És mindenekelőtt hálával tartozom **családomnak**, akik támogatására bármikor számíthatok, minden jó és rossz pillanatban mellettem állnak.

FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények