

**Kanabidiol má sebostatické a protizápalové účinky
na ľudské sebocyty?**

(Voľný preklad)

Autori:

Attila Oláh, Balázs I. Tóth, István Borbíró, Koji Sugawara, Attila G. Szöllösi, Gabriella Czifra, Balázs Pál, Lídia Ambrus, Jennifer E Ludovici, Mauro Picardo, Thomas Voets, Christos C. Zouboulis, Ralf Paus, Tamás Bíró

Publikované:

Online 25.7.2014

Originálny článok dostupný na:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4151231/>

Kanabidiol má sebostatické a protizápalové účinky na ľudské sebocyty?

Abstrakt

Endokanabinoidný systém (ECS) reguluje viaceré fyziologické procesy vrátane rastu a diferenciácie kožných buniek. Tu sme skúmali účinky hlavného nepsychotropného fyto-kanabinoidu *Cannabis sativa*(-)-kanabidiol (CBD), na funkciu ľudských mazových žliaz a zistil, že CBD sa správa ako vysoko účinné sebostatické činidlo. Podávanie CBD do kultivovaných ľudských sebocytov a kultúry ľudských kožných orgánov inhibovalo lipogénne účinky rôznych zlúčenín, vrátane kyseliny arachidónovej a kombinácie kyseliny linolovej a testosterónu, a potláčalo proliferáciu sebocytov prostredníctvom aktivácie vaniloidného-4 (TRPV4) iónu prechodného receptorového potenciálu. kanály. Aktivácia TRPV4 interferovala s prolipogénnou ERK1/2 MAPK dráhou a viedla k downregulácii proteínu-1 interagujúceho s jadrovým receptorom (NRIP1), ktorý ovplyvňuje metabolizmus glukózy a lipidov, čím inhibuje lipogénu sebocytov. CBD tiež vykazovalo komplexné protizápalové účinky, ktoré boli spojené so zvýšenou reguláciou tribble homológu 3 (TRIB3) závislou od A2a adenosínového receptora a inhibíciou signalizácie NF-KB. Naše zistenia spoločne naznačujú, že vďaka kombinovaným lipostatickým, antiproliferatívnym a protizápalovým účinkom má CBD potenciál ako sľubné terapeutické činidlo na liečbu acne vulgaris.

Úvod

Acne vulgaris je najčastejším ľudským kožným ochorením, ktoré ovplyvňuje kvalitu života miliónov ľudí na celom svete. Napriek hrdinskému úsiliu základného a aplikovaného výskumu nám stále chýbajú nepopierateľne liečivé prostriedky proti akné, ktoré sú zamerané na viaceré patogenetické kroky akné (nadprodukcia kožného mazu, nežiaduca proliferácia sebocytov, zápal) a navyše majú priaznivé profily vedľajších účinkov (1 , 2). Výskumy za posledné dve desaťročia jednoznačne potvrdili, že ľudské telo exprimuje také receptory, ktoré sú schopné špecificky viazať a rozpoznať charakteristické terpén-fenolové zlúčeniny neslávne známej rastliny *Cannabis sativa* ., súhrnne označované ako fyto-kanabinoidy. Tieto receptory, ich endogénne ligandy (endokanabinoidy [eCB]) a enzýmy zapojené do syntézy a degradácie eCB spoločne tvoria eCB systém (ECS), komplexnú medzibunkovú signálnu sieť, ktorá sa výrazne podieľa na regulácii rôznych fyziologických procesov (3 – 6).

Vyšetrovanie kožného kanabinoidného systému sa zdá byť sľubnou voľbou pri hľadaní nových terapeutických možností (7 , 8). V skutočnosti sme už predtým ukázali, že ECS kože reguluje rast a diferenciáciu kožných buniek (9 , 10) a údajne má protizápalové účinky (11). Okrem toho sme preukázali, že ECS hrá kľúčovú úlohu pri regulácii tvorby kožného mazu (12). Podľa našich nedávnych zistení sú prototypové eCB, ako je N-arachidonoyletanolamid (anandamid [AEA]) a 2-arachidonoylglycerol, konštitutívne produkované v ľudských mazových žľazách. Okrem toho sme pomocou ľudských immortalizovaných sebocytov SZ95 tiež preukázali, že tieto lokálne produkované eCB (pôsobiacie prostredníctvom kanabinoidného receptora CB2→ERK1/2 MAPK→PPAR) indukujú terminálnu diferenciáciu týchto buniek, ktorá je charakterizovaná zvýšeným množstvom neutrálnych lipidov (kožného mazu) produkciu sebocytov (12). Tieto zistenia jednoznačne potvrdili, že ľudské

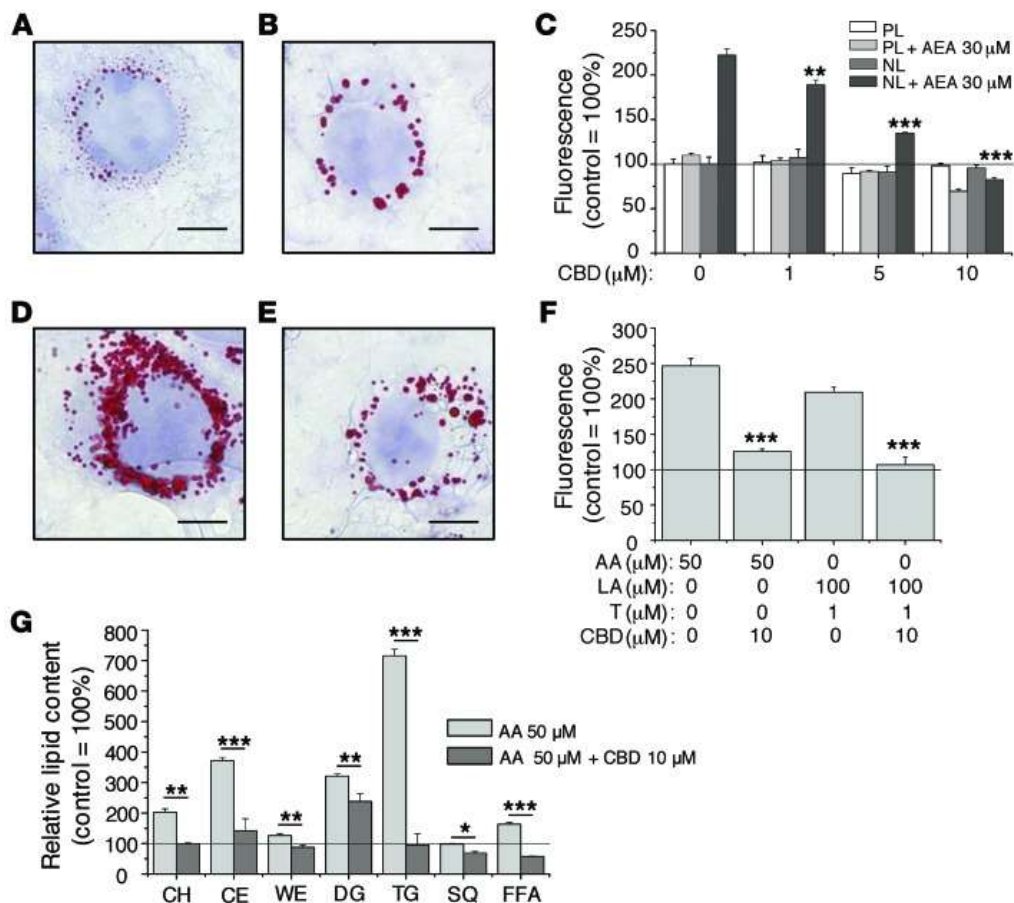
sebocyty majú funkčne aktívny ECS; napriek tomu sme nemali údaje o potenciálnom účinku (účinkoch) kanabinooidov rastlinného pôvodu.

(-)-Kanabidiol (CBD) je najviac študovaný nepsychotropný fytkanabinoid (13 – 15). V klinickej praxi sa už aplikoval bez akýchkoľvek významných vedľajších účinkov (Sativex) (16) a početné prebiehajúce štúdie fázy II a III majú v úmysle preskúmať jeho ďalší terapeutický potenciál (17). Preto sme v rámci súčasnej štúdie zamýšľali odhaliť biologické účinky CBD na ľudskú mazovú žľazu. Keďže nám chýbajú adekvátne zvieracie modely (18), použili sme ľudské imortalizované sebocyty SZ95, najlepší dostupný bunkový systém (19) a techniku kultivácie orgánov ľudskej kože (hSOC) v plnej hrúbke (20).

Výsledky

CBD normalizuje nadmernú syntézu lipidov v ľudských sebocytoch vyvolanú „látkou proti akné“.

Najprv sme hodnotili biologické účinky CBD (1–10 μM) na lipogézu sebocytov SZ95. Aj keď je známe, že eCB vykazujú intenzívne lipogénne účinky prostredníctvom metabotropných receptorov CB2 (12), ani semikvantitatívne farbenie Oil Red O, ani kvantitatívne farbenie nílskou červenou neukázali zmeny v syntéze bazálnych neutrálnych (mazových) lipidov sebocytov SZ95 po 24-hodinovej liečbe CBD (obrázok(Postava 1,1, A–C) (alebo 48-hodinové ošetrenie CBD; údaje nie sú uvedené). Je však zaujímavé, že CBD výrazne inhibovalo lipogénne pôsobenie prototypu eCB, AEA, spôsobom závislým od dávky (1–10 μM ; obrázokPostava 1,1, C – E).



Tiež sme testovali jeho účinok na účinky iných lipogénnych látok, o ktorých sa predtým ukázalo, že pôsobia prostredníctvom rôznych mechanizmov prenosu signálu nezávislých od ECS. CBD skutočne účinne inhibovalo syntézu lipidov indukovanú buď kyselinou arachidónovou (AA) (21) alebo kombináciou kyseliny linolovej a testosterónu (LA-T) (odkaz 22 a obr .Obrázok 1F),1F), čo naznačuje, že účinok CBD nie je „špecifický pre ECS“, ale „univerzálny“ lipostatický účinok.

Keďže sa veľmi často ukázalo, že kanabinoidy majú „dvojfázové“ účinky (tj protichodné fyziologické účinky pri koncentráciách nM vs. μ M) (23), testovali sme aj účinky nižších (1–100 nM) koncentrácií CBD; najmä neovplyvnili ani bazálnu, ani AA-indukovanú syntézu lipidov sebocytov (doplnkový obrázok 1; doplnkový materiál dostupný online s týmto článkom; doi: 10.1172/JCI64628DS1).

Skúmali sme aj účinky CBD na lipidóm sebocytov SZ95 v podmienkach in vitro, ktoré napodobňovali okolnosti „podobné akné“ (posledné bolo dosiahnuté použitím kľúčového zápalového mediátora „pro-akné“, AA) (1 , 2 , 21 , 24 – 26). Dôležité je, že CBD takmer úplne normalizovalo „patologickú“ lipogézu sebocytov SZ95 zosilnenú AA (obrázok(Obrázok 1G).1G). To naznačuje, že CBD môže primárne normalizovať kvantitatívne aj kvalitatívne nadmernú a abnormálnu produkciu lipidov vyvolanú stimulmi podporujúcimi akné.

CBD znižuje proliferáciu, ale nie životaschopnosť ľudských sebocytov in vitro aj ex vivo.

Okrem vyššie uvedeného lipostatického pôsobenia by ďalším požadovaným účinkom vhodného činidla proti akné bolo inhibovať nežiaduci rast sebocytov (2 , 27 , 28). Veľmi dôležité je, že proliferácia sebocytov SZ95 bola významne znížená v prítomnosti CBD (1–10 μ M) (obrázok(Obrázok 2A).2A). Treba však poznamenať, že CBD nepotlačilo počet buniek pod „počiatočné“ číslo (merané v deň 1), čo argumentuje „čistým“ antiproliferatívnym účinkom. Skutočne, nedostatok jeho účinkov na počet životaschopných buniek sa ďalej overil preukázaním, že tieto koncentrácie CBD neznižili životaschopnosť buniek ani nevyvolali apoptózu ani nekrózu sebocytov SZ95 (obrázok(Obrázok 2,2, B a C). Najmä podávanie 50 μ M CBD vyvolalo cytotoxicitu riadenú apoptózou, a teda viedlo k zníženej lipogéze (doplnkový obrázok 2, A–C). Podobne predĺžená aplikácia 10 μ M CBD (6-dňové ošetrovanie) tiež znížila počet buniek a lipogézu (doplnkový obrázok 2, D a E).

Klinicky je kľúčovou otázkou, či by sa vyššie uvedené pozorovania in vitro mohli premietnuť do významných sebostatických (tj lipostatických a antiproliferatívnych) účinkov CBD na ľudské mazové žľazy in situ. Aby sme to preskúmali na predklinickej úrovni, použila sa technika hSOC v plnej hrúbke (20). Tieto testy hSOC, ktoré napodobňujú funkciu ľudskej mazovej žľazy in vivo tak blízko, ako je to v súčasnosti možné na úrovni ex vivo, jasne preukázali, že aplikácia CBD úplne zabránila lipogénnemu pôsobeniu AEA in situ a v súlade s našimi dlhodobými pozorovaniami in vitro (doplnkový obrázok 2E), znížená aj bazálna lipogéza (obrázok(Obrázok 2,2, D – H). Podobne CBD výrazne potlačil expresiu proliferatívneho markera MKI67 (obrázok(Obrázok 2I).2ja). To naznačuje, že CBD môže pôsobiť aj ako silné sebostatické činidlo in vivo, keď sa testuje v príslušných klinických štúdiách.

CBD má univerzálne protizápalové účinky.

Okrem toho sme zistili, že CBD tiež zabránila kombinácii „pro-akné“ LA-T vo zvýšení expresie TNFA (obrázok(Obrázok 3A),3A), kľúčový cytokín v patogeneze acne vulgaris (2 , 24 – 30). Tieto údaje

naznačujú, že CBD môže pôsobiť protizápalovo na ľudské sebocyty (ako už bolo preukázané pre CBD v niekoľkých iných experimentálnych modeloch, ako je diabetes, reumatoidná artritída atď.) (31). Preto, aby sme potvrdili domnelý univerzálny protizápalový účinok CBD na ľudské sebocyty, ďalej sme hodnotili jeho účinky modelovaním gramnegatívnych infekcií (aplikáciou aktivátora TLR4 LPS) a grampozitívnych infekcií (pomocou aktivátora TLR2 kyseliny lipoteichoovej [LTA]). Zistili sme, že CBD úplne zabránila vyššie uvedeným ošetreniam zvýšiť expresiu TNFA (obrázok(Obrázok 3).3). Okrem toho CBD tiež normalizovala expresiu IL1B a IL6 indukovanú LPS (obrázok(Obrázok 3B)3B) (zistilo sa, že expresia týchto 2 cytokínov nie je modulovaná 24-hodinovou liečbou LA-T alebo LTA; údaje nie sú uvedené). Celkovo tieto výsledky silne naznačujú, že univerzálny sebostatický účinok CBD je sprevádzaný výraznými protizápalovými účinkami, ktoré by boli veľmi žiaduce pri klinickej liečbe acne vulgaris (1 , 2 , 24 – 30).

Sebostatické (tj lipostatické a antiproliferatívne), ale nie protizápalové, účinky CBD sú sprostredkované aktiváciou prechodných receptorových potenciálnych vaniloidných-4 iónových kanálov.

Ďalej sme rozobrali molekulárny mechanizmus (mechanizmy), ktorý je základom pozoruhodných lipostatických účinkov CBD. Ako sa očakávalo, ani CB1- ani CB2-špecifické antagonisty (AM251 a AM630) neboli schopné antagonizovať účinok CBD na inhibíciu syntézy lipidov (doplnkový obrázok 3); preto bolo potrebné zvážiť alternatívne možnosti.

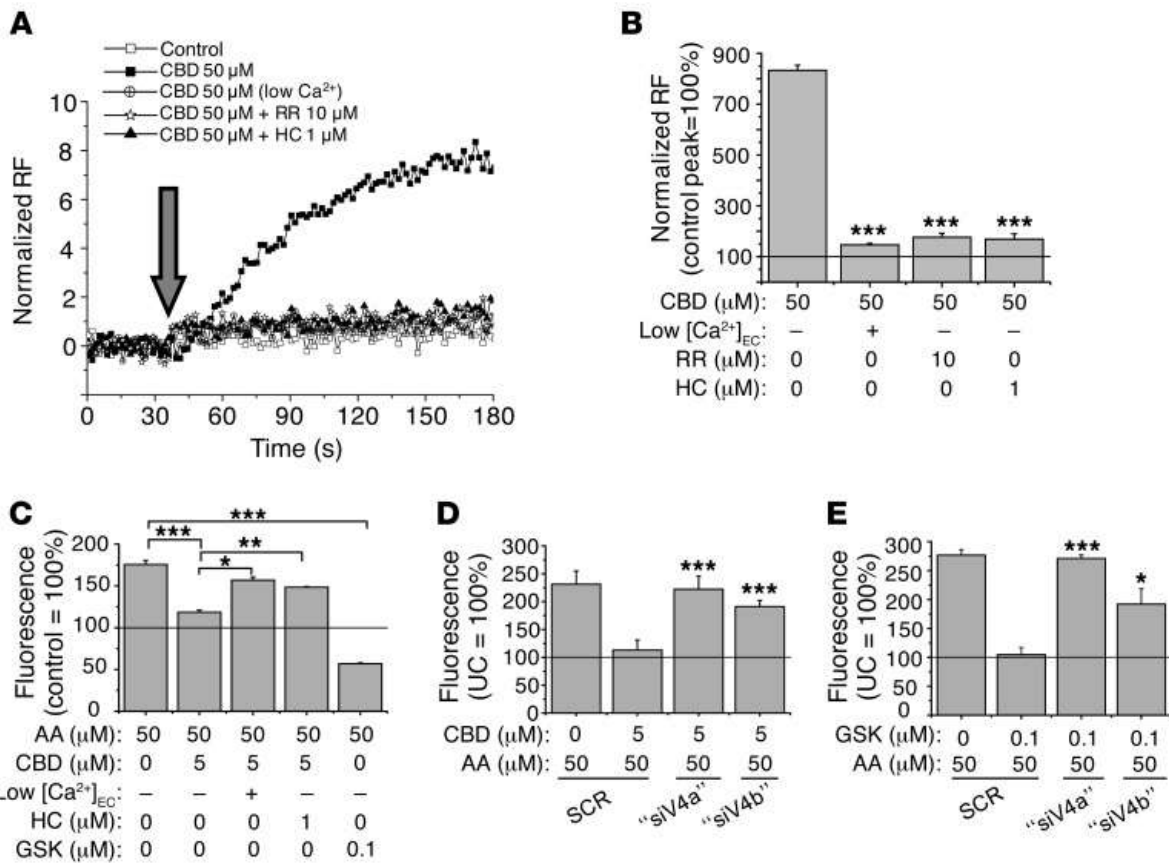
Najprv sme študovali účinky CBD na iónové prúdy sebocytov SZ95. Použitím konfigurácií náplast-svoriek s celými bunkami boli membránové prúdy vyvolané protokolmi napäťovej rampy (obrázok (Obrázok 4,4, A a B) a potom normalizované na kapacitu bunkovej membrány pri dvoch rôznych potenciáloch, tj pri -90 a $+90$ mV (obrázok (Obrázok 4C).4C). CBD ($10 \mu\text{M}$) indukoval väčšinou smerom von usmerňujúci prúd a pozitívny posun v reverznom potenciáli, argumentujúc pre aktiváciu určitých kationových kanálov pri aplikácii CBD.

Je dobre známe, že rôzne kanabinoidy môžu modulovať aktivitu určitých kanálov prechodného receptorového potenciálu (TRP), ktoré sú spoločne označované ako „ionotropné kanabinoide receptory“ (32 – 37). Okrem toho sme nedávno ukázali, že aktivácia TRP vaniloidu-1 (TRPV1) na sebocytoch SZ95 kapsaicínom tiež vykazuje silné lipostatické účinky (38). Preto sme najprv systematicky skúmali tieto kandidátske „ciele CBD“.

Zistili sme, že sebocyty SZ95 exprimujú TRPV1, TRPV2 a TRPV4 na úrovni mRNA aj proteínu (doplnkový obrázok 4, A – C). Spomedzi týchto kanálov TRP vykazoval TRPV4 zďaleka najvyššie hladiny mRNA (expresia TRPA1 a TRPM8 bola pod detekčným limitom; údaje nie sú uvedené).

Keďže 3 identifikované TRP sú neselektívne kationové kanály, ktoré sú najviac priepustné pre Ca^{2+} (39), študovali sme účinky CBD na homeostázu vápnika v sebocytoch. Použitím fluorescenčnej Ca^{2+} zobrazovacej techniky sme zistili, že CBD významne zvýšilo intracelulárnu koncentráciu vápnika ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$) sebocytov SZ95 (obrázok(Obrázok 5,5, A a B). Tento účinok bol rovnako antagonizovaný (a) poklesom extracelulárnej koncentrácie Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$); b) nešpecifický blokátor kanálov TRP ruténiová červeň; a, čo je veľmi dôležité, (c) TRPV4-špecifický antagonista HC067047 (HC) (obr. (Obrázok 5,5, A a B). Ukázali sme tiež, že supresia $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ alebo spoločná aplikácia HC tiež

zabránili lipostatickému pôsobeniu CBD (obr.(obrázok 5C);5C); pozoruhodne, samotný antagonist TRPV4 neovplyvnil syntézu bazálnych lipidov (doplnkový obrázok 5).



Lipostatická aktivita CBD je sprostredkovaná TRPV4.

(A) Fluorescenčné zobrazovanie Ca^{2+} . Zlúčeniny sa aplikovali tak, ako je naznačené šípkou. Fluorescencia (meraná v relatívnych fluorescenčných jednotkách [RF]) bola normalizovaná na základnú líniu. „Nízka [Ca^{2+}] EC “ označuje použitie Hankovho roztoku nominálne bez Ca^{2+} . Dva ďalšie experimenty priniesli podobné výsledky. (B) Štatistická analýza fluorescenčných Ca^{2+} - zobrazovacích údajov. Fluorescencia (vyjadrená v RF) bola normalizovaná na základnú líniu. Namerané vrcholové hodnoty boli vyjadrené ako percento základnej línie (priemer \pm SEM z 3 nezávislých stanovení). Plná čiara označuje 100%. Dva ďalšie experimenty priniesli podobné výsledky. *** $P < 0,001$ v porovnaní so skupinou liečenou CBD. (C) Neutrálna syntéza lipidov (farbenie nílskou červenou). Údaje sú vyjadrené ako percento kontroly vehikula (priemer \pm SEM zo 4 nezávislých stanovení). Plná čiara označuje 100%. Dva ďalšie experimenty priniesli podobné výsledky. „Nízka [Ca^{2+}] EC “ označuje použitie média Seibomed s nízkym obsahom Ca^{2+} . * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. (D a E) Syntéza neutrálnych lipidov (farbenie nílskou červenou) po selektívnom umlčaní génu TRPV4 kanála (24-hodinové ošetrenie, začaté v deň 3 po transfekcii). Údaje sú vyjadrené ako percento netransfekovanej kontroly vehikula (priemer \pm SEM zo 4 nezávislých stanovení). Plná čiara označuje 100%. Dva ďalšie experimenty priniesli podobné výsledky. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ v porovnaní s bunkami SCR. „siV4a“ a „siV4b“ označujú 2 rôzne konštrukty siRNA proti TRPV4. SCR, kódované ovládanie; UC, kontrola netransfekovaného vehikula.

Na ďalšie potvrdenie funkčnej expresie TRPV4 na ľudských sebocytoch sa použil ultrapotentný agonista GSK1016790A (GSK) špecifický pre TRPV4. Agonista vyvolal membránové prúdy, ktorým zabránil špecifický antagonist TRPV4 HC (doplnkový obrázok 6, A a B), čo naznačuje, že kanály TRPV4

sú skutočne funkčne exprimované v ľudských sebocytoch. Okrem toho GSK napodobňoval ako CBD-indukované $[Ca^{2+}]_i$ zvýšenia (doplnkový obrázok 6, C a D), ako aj lipostatické účinky CBD (obrázok (Obrázok 5C).5C). Pretože lipostatické účinky vyvolané CBD a indukované signály Ca^{2+} neboli ovplyvnené antagonistami špecifickými pre TRPV1, kapsazepínom (doplnkový obrázok 7, A–C) alebo AMG 9810 (údaje nie sú uvedené), tieto elektrofyziologické, Ca^{2+} - zobrazovacie údaje a údaje o bunkovej fyziológii spoločne argumentovali pre selektívne zapojenie TRPV4 (ale nie TRPV1) do sprostredkovania účinkov CBD.

Na ďalšie overenie tohto konceptu sa použil knockdown TRPV1, TRPV2 a TRPV4 interferenciou RNA (RNAi) (kvantitatívna PCR v reálnom čase [Q-PCR] a analýzy Western blot overili úspešné umlčanie cieľových TRPV; Doplnkové Obrázok 8, A–F). Ukázali sme, že ani umlčanie TRPV1 ani TRPV2 významne neovplyvnilo lipostatický účinok CBD (doplnkový obrázok 9, A a B). Na rozdiel od toho „knockdown“ špecifický pre TRPV4 dokázal zabrániť tomuto účinku CBD (obrázok(Obrázok 5D)5D), ako aj zvýšenie $[Ca^{2+}]_i$ (doplnkový obrázok 10) a účinok TRPV4-špecifického aktivátora GSK na zníženie lipidov (obrázok(Obrázok 5E).5E). Súhrnne tieto údaje jednoznačne potvrdzujú, že CBD aktivuje TRPV4 a že tento iónový kanál selektívne sprostredkúva jeho lipostatický účinok.

Je zaujímavé, že sme tiež ukázali, že podobne ako lipostatické pôsobenie, antagonizmus TRPV4 bol schopný významne zabrániť antiproliferatívnemu účinku CBD (obr.(Obrázok 6A).6A). Celkom prekvapivo však protizápalové účinky CBD neboli ovplyvnené antagonistom (obrázok(obrázok 6B);6B); tieto posledné zistenia naznačujú, že tieto protizápalové účinky môžu byť procesom nezávislým od TRPV4.

Účinky CBD proti akné sú sprostredkované paralelnými, čiastočne nezávislými signálnymi mechanizmami.

(A) Test proliferácie CyQUANT po 72-hodinovom ošetrovaní. * $P < 0,05$ v porovnaní s kontrolou s vehikulom. # $P < 0,05$. Plná čiara označuje úroveň 24-hodinovej kontroly vozidla. Prerušovaná čiara označuje úroveň 72-hodinovej kontroly vozidla. Výsledky sú vyjadrené ako percento 24-hodinovej kontroly vehikula (priemer \pm SEM zo 4 nezávislých stanovení). (B) Expresia TNFA mRNA po 24-hodinovom ošetrovaní LPS s alebo bez CBD a HC. * $P < 0,05$ v porovnaní s kontrolou s vehikulom; # $P < 0,05$ v porovnaní so skupinou liečenou LPS bez CBD. Údaje sú prezentované pomocou metódy Δ ACT; peptidyl-prolyl izomeráza A – normalizovaná (PPIA -normalizované) Expresia TNFA mRNA kontroly vehikula bola nastavená ako 1. Údaje sú vyjadrené ako priemer \pm SD z 3 nezávislých stanovení. Dva ďalšie experimenty priniesli podobné výsledky. (C) Validácia kľúčových výsledkov microarray. Expresia mRNA rôznych cieľových génov po 24-hodinovom ošetrovaní CBD s HC alebo bez neho. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ v porovnaní s kontrolou s vehikulom. ### $P < 0,001$. Údaje sú prezentované pomocou metódy Δ ACT; PPIA- normalizovaná mRNA expresia kontroly vehikula bola nastavená ako 1 (plná čiara). Údaje sú vyjadrené ako priemer \pm SD z 3 až 6 nezávislých stanovení. Dva ďalšie experimenty priniesli podobné výsledky.

Sebostatický účinok CBD je sprostredkovaný interferenciou závislou od TRPV4 s dráhou ERK1/2 MAPK a downreguláciou proteínu-1 interagujúceho s jadrovým receptorom.

Aby sme rozobrali vnútrobunkové signálne dráhy, ktoré sú základom vyššie uvedených účinkov, najprv sme skúmali predpokladanú účasť niekoľkých kináz (tj izoforiem PKC, PI3K, PKA), ako aj

kalcineurínu pri sprostredkovaní lipostatických účinkov CBD. Je pozoruhodné, že inhibícia aktivít týchto molekúl nemala žiadny vplyv na lipostatickú aktivitu CBD (doplnkový obrázok 11, A a B).

Potom, aby sa identifikovali cieľové gény a dráhy regulované (priamo alebo nepriamo) CBD, sa vykonali analýzy mikročipov v celom genóme na 3 nezávislých súboroch kontrolných a CBD ošetrovaných sebocytov SZ95 (10 μ M CBD počas 24 hodín). Analýza obohatenia génovej sady (GSEA) (40 – 42) výsledkov microarray odhalila, že početné mitózy a bunkový cyklus (napr. „mitóza“, „G 2/M prechod“, „bunkový cyklus“ atď.), zápal (napr. „produkcia cytokínov“, „proces biosyntézy cytokínov“, „dráha TLR9“, „pozitívna regulácia kaskády I κ B kinázy NF- κ B“ atď.), a génové sady súvisiace so syntézou lipidov („aktivita acyltransferázy“, „proces biosyntézy lipidov“, „pozitívna regulácia aktivity MAPK“ atď.) boli identifikované medzi downregulovanými, čo potvrdzuje naše predchádzajúce zistenia o komplexných účinkoch CBD proti akné. Navyše, downregulácia niektorých génových súborov „súvisiacich s akné“ (napr. „dráha IGF-1“ a „dráha mTOR“) (2 , 43) tiež argumentovali za predpokladanú in vivo účinnosť CBD proti akné. Ďalej, upregulácia génového súboru „vápnikovej signálnej dráhy“ potvrdila zapojenie vápnikovej signalizácie (závislej od TRPV4) (podrobné výsledky GSEA sú dostupné v doplnkových súboroch Excel 1 a 2).

Počas ďalšieho spracovania údajov sa vykonala aj analýza génovej ontológie biologických sietí (BiNGO) (44 , 45) (pozri doplnkové súbory Excel 3 a 4; hierarchia rôznych termínov génovej ontológie obohatená o downregulované a upregulované gény je zhrnutá v doplnkových obrázkoch 12 a 13). V súlade s našimi predchádzajúcimi výsledkami táto metóda tiež zdôraznila, že CBD má „antidiferenciačné“ účinky na sebocyty (zistilo sa, že výrazy ako „negatívna regulácia diferenciácie tukových buniek“ a „negatívna regulácia procesu biosyntézy mastných kyselín“ sú obohatené medzi upregulované gény).

Hoci tieto analýzy ďalej potvrdili naše predchádzajúce zistenia o komplexných účinkoch CBD proti akné, stále sme sa zamerali na rozpoznanie cieľových génov, ktoré by sa mohli podieľať na sprostredkovaní rôznych modalít proti akné a/alebo by mohli ďalej posilniť predpokladanú in vivo účinnosť CBD. Preto sme pomocou rigidných vylučovacích kritérií (najmenej 2-násobné zmeny v zodpovedajúcich hladinách expresie, rovnosmerné zmeny vo všetkých prípadoch a globálne, korigované $P < 0,05$) zistili, že 80 génov bolo výrazne znížených, zatiaľ čo 72 génov bolo výrazne upregulovaných CBD. ošetrovanie (výsledky mikročipov sú dostupné prostredníctvom prístupového čísla série GEO GSE57571; downregulované a upregulované gény spolu s ich priemernými násobnými zmenami sú zhrnuté v doplnkových tabuľkách 1 a 2). Použitím Q-PCR sme potvrdili, že po liečbe CBD bola expresia Rho GTPázu aktivujúceho proteínu 9 (ARHGAP9, endogénny inhibítor prolifogénnej ERK signalizácie) (46) regulovaná smerom nahor, zatiaľ čo proliferačný marker MKI67 bol regulovaný smerom nadol (obr.(Obrázok 6C).6C). (Tento posledný výsledok dokonale potvrdil naše zistenia získané v experimentoch hSOC [obrázok[Obrázok 2I].2I].) Navyše, tiež v súlade s našimi predchádzajúcimi zisteniami, sme zistili, že antagonizmus TRPV4 by mohol úspešne zabrániť obom zmenám (obr. (Obrázok 66C).

Je dobre známe, že aktivácia ERK1/2 MAPK dráhy hrá kľúčovú úlohu v regulácii bunkovej proliferácie (47). Okrem toho sme nedávno preukázali, že táto dráha sa podieľa na sprostredkovaní

„proliferatívneho“ pôsobenia AEA na ľudské sebocyty (12). Vzhľadom na to, že podávanie CBD viedlo k opačným bunkovým účinkom (tj zníženej lipogenéze a proliferácii) a zvýšenej regulácii inhibítora ERK ARHGAP9 , predpokladali sme, že CBD môže inhibovať aktiváciu MAPK. Liečba AEA skutočne dokázala aktivovať kaskádu ERK1/2 MAPK (ako sa monitorovalo hodnotením hladiny fosforylovaného ERK1/2 [P-ERK1/2]), čo je účinok, ktorý bol úplne zrušený spoločným podávaním CBD (obrázok (Obrázok 7A).7A). V dokonalej zhode s našimi predchádzajúcimi údajmi (obr(Obrázok 5,5, C – E a obrázok Obrázok 6,6, A a C), zistilo sa, že táto interferencia je závislá od TRPV4, pretože špecifický antagonist HC bol schopný úplne zabrániť účinku CBD (obrázok (Obrázok 7A).7A). To opäť potvrdilo kľúčovú úlohu aktivácie TRPV4 pri spustení lipostatickej a antiproliferatívnej signálnej kaskády (kaskád) CBD.

Preukázali sme tiež, že expresia proteínu-1 interagujúceho s jadrovým receptorom (NRIP1 , tiež známy ako RIP140 ; korepresor nevyhnutný pre ukládanie triglyceridov v tukovom tkanive) (48) bola downregulovaná spôsobom závislým od TRPV4 (obr.(Obrázok 6C).6C). Ukázali sme, že umlčanie NRIP1 (overené pomocou Q-PCR a Western blotting; doplnkový obrázok 14, A a B) napodobňovalo lipostatický účinok CBD (obrázok(Obrázok 7B),7B), čo naznačuje, že downregulácia NRIP1 je skutočne dôležitým konečným efektorom inhibičnej aktivity CBD na syntézu lipidov.

Protizápalový účinok CBD je sprostredkovaný upreguláciou tribble homológu 3 a inhibíciou dráhy NF-KB.

Naše údaje z mikročipov tiež zdôraznili predpokladané zapojenie niekoľkých génov súvisiacich s vrodenu imunitou/zápalom pri sprostredkovaní protizápalového účinku CBD (doplnkové tabuľky 1 a 2). Použitím Q-PCR sme potvrdili, že expresia LL-37 katelicidínu (kľúčový antimikrobiálny peptid exprimovaný ľudskými sebocytmi a ukázalo sa, že je aktívny v ľudských sebocytoch) (49) a tribbles homológu 3 (TRIB3 , tiež známy ako SINK ; negatívny regulátor prozápalová signalizácia NF-κB) (50) bola upregulovaná CBD. Dôležité (opäť v súlade s našimi predchádzajúcimi výsledkami [obrázok [Obrázok 6B]],6B)), týmto zmenám génovej expresie vyvolaným CBD nezabránilo spoločné podávanie antagonistu TRPV4 HC (obrázok(Obrázok 6C).6C). Pri hodnotení funkčnej úlohy TRIB3 sme zistili, že po jeho selektívnom umlčaní (doplnkový obrázok 15, A a B) CBD nedokázalo uplatniť svoj protizápalový účinok, aby zabránil LPS-indukovanej upregulácii IL1B a IL6 (obrázok(obrázok 8A);8A); na rozdiel od toho sa jeho lipostatická aktivita nezmenila (doplnkový obrázok 15C).

Je známe, že TRIB3 inhibuje dráhu NF-KB (50) a okrem toho už bolo hlásené, že CBD uplatňuje svoje protizápalové účinky prostredníctvom inhibície signalizácie NF-KB (51). Dôležité je, že sme zistili, že spoločná liečba CBD skutočne zabránila LPS-indukovanej fosforylácii (teda inaktivácii) inhibičnej IκBα a fosforylácii (teda aktivácii) izoformy p65 (RelA) NF-κB (obrázok(Obrázok 8B).8B). Tieto údaje naznačujú, že bez ohľadu na skúmaný typ buniek by interferencia s dráhou NF-KB mohla byť dôležitým mechanizmom vo vývoji protizápalových účinkov CBD. Treba tiež poznamenať, že antagonizmus TRPV4 mal len zanedbateľné účinky na pôsobenie CBD (obr.(Obrázok 8B),8B), čo opäť potvrdzuje, že protizápalová aktivita CBD je proces nezávislý od TRPV4.

CBD indukuje novú (A2a adenosínový receptor→cAMP→TRIB3–NF-κB) protizápalovú dráhu.

Nakoniec sme sa zamerali na identifikáciu cieľovej molekuly CBD, ktorá prostredníctvom upregulácie TRIB3 sprostredkúva protizápalový účinok fytokanabinoidu. Keďže predchádzajúce údaje naznačujú, že zvýšenie intracelulárnej hladiny cAMP je jedným z možných induktorov aktivácie/upregulácie

TRIB3 (52), skúmali sme účinky CBD na hladinu cAMP. Liečba CBD skutočne zvýšila intracelulárnu koncentráciu cAMP v sebocytoch (obrázok(Obrázok 8C),8C), tvrdiac, že receptor spojený s G s proteínom môže byť primárnym cieľom CBD. Predchádzajúce zistenie, že na myšom modeli akútneho poškodenia pľúc sa zistilo, že adenzínový receptor A2a spojený s G s proteínom sprostredkúva protizápalové účinky CBD (53), urobilo z tohto receptora veľmi pravdepodobný cieľ aj v našom systéme. Zistili sme, že receptor A2a bol exprimovaný ľudskými sebocytmi na úrovni mRNA aj proteínu (doplňkový obrázok 16, A – C). Okrem toho sme tiež ukázali, že aplikácia špecifického antagonistu receptora A2a, ZM241385 (ZM), dokázala významne zabrániť upregulácii TRIB3 prostredníctvom CBD (obrázok(Obrázok 8D).8D). Okrem toho ZM tiež potlačil protizápalový účinok fytokanabinoidu, ako aj inhibíciu aktivácie NF-KB vyvolanú CBD vyvolanú LPS (obrázok(Obrázok 8,8, E a F). Tieto zaujímavé zistenia spoločne tvrdili, že aktivácia osi „A2a receptor→cAMP→TRIB3→NF-κB“ skutočne hrá kľúčovú úlohu pri sprostredkovaní protizápalových účinkov CBD.

Diskusia

V tejto štúdii poskytujeme prvý dôkaz, že nepsychotropný fytokanabinoid CBD, ktorý sa už používa v klinickej praxi (16), má jedinečnú „trojicu bunkových účinkov proti akné“. Konkrétne CBD, bez ohrozenia životaschopnosti (obrázok(Obrázok 2,2, B a C), (a) normalizovali patologicky zvýšenú lipogézu vyvolanú „pro-akné“ činidlami, a to kvantitatívnym aj kvalitatívnym spôsobom (univerzálny lipostatický účinok; obrázok Postava 1);1); (b) potlačená proliferácia buniek (antiproliferatívny účinok; obrObrázok 2A);2A); a (c) zabránili účinkom aktivácie TLR alebo „proakné“ látok na zvýšenie hladín prozápalových cytokínov (univerzálny protizápalový účinok; obrázokObrázok 3).3). Ďalej sme ukázali, že sebostatické účinky CBD sa vyvinuli aj v podmienkach „podobných in vivo“ (hSOC; obrázokObrázok 2,2, D–I).

Okrem diskutovaných „sebocytovo špecifických“ krokov patogenézy akné, na ktoré sa sľubne zameriava „bunková anti-akné trojica“ CBD, treba mať na pamäti aj to, že existujú ďalšie faktory, ktoré prispievajú k progresii ochorenia: infundibulárna hyperproliferácia/hyperkeratinizácia, čo vedie ku komedogenéze a následnému premnoženiu „aknégenných“ kmeňov *Propionibacterium acnes* (2). Je veľmi dôležité poznamenať, že na základe literatúry má podávanie CBD prísľub zamerať sa aj na tieto faktory. Ukázalo sa, že CBD inhibuje proliferáciu hyperproliferatívnych keratinocytov (54) a preukázalo sa, že má pozoruhodnú antibakteriálnu aktivitu (55).). Hoci jeho účinnosť proti „aknégenným“ kmeňom *Propionibacterium acnes* ešte nie je preskúmaná, možno špekulovať, že jeho domnelá nepriama antibakteriálna aktivita (sprostredkovaná zvýšenou reguláciou expresie antimikrobiálneho peptidu LL-37 katelicidínu [doplňková tabuľka 2 a obrázokObrázok 6C])6C]) by mohol byť ďalej podporený priamymi baktericídnymi účinkami, pričom sa tvrdí, že CBD sa môže veľmi pravdepodobne správať ako silný prostriedok proti akné in vivo.

Vzhľadom na to, že produkcia mazu je výsledkom holokrinnej sekrécie, množstvo produkovaného mazu je minimálne tak závislé od proliferačnej aktivity sebocytov bazálnej vrstvy v mazovej žľaze ako od množstva lipogézy, do ktorej sa jednotlivé sebocyty zapájajú (27 , 28). Preto je tu zdokumentovaná nová a významná antiproliferatívna aktivita CBD na ľudské sebocyty in vitro a ex vivo (obrázok(Obrázok 2,2Očakáva sa, že A a I) výrazne zníži produkciu kožného mazu in vivo. Okrem toho je tiež dôležité zdôrazniť, že klinicky je veľmi žiaduce, aby bazálna sebogéza a životaschopnosť sebocytov neboli ovplyvnené (obr.(Postava 1,1, A–C a obrázokObrázok 2,2, A–C) pomocou CBD (aspoň v necytotoxických koncentráciách a po krátkodobých ošetrovaniach; doplňkový obrázok 2, A–E),

keďže dostatočná úroveň produkcie mazu je kritickým faktorom pre udržanie správnej funkcie epidermálnej bariéry, jedna z centrálnych zložiek homeostázy kože (56).

CBD už bolo preukázané, že aktivuje (napr. určité TRP kanály, $\alpha 1$ a 5-HT_{1a} receptor atď.), antagonizuje (napr. TRPM8 a 5-HT₃ receptor, ako aj „klasické“ [CB1 a CB2] a „nové“ [GPR55] kanabinoidné receptory atď.), alebo alostericky modulovať (napr. μ - a δ -opioidné receptory atď.) aktivitu veľkého množstva rôznych receptorov a okrem toho ovplyvňovať rôzne iné bunkové ciele (napr. cyklooxygenázu a lipoxigenázové enzýmy, amidhydroláza mastných kyselín, eCB membránový transportér, fosfolipáza A2, napätovo závislý aniónový kanál 1 atď.) (15 , 32 – 37 , 57 – 60). Preto sa skúmanie jeho presného mechanizmu účinku javilo ako veľká výzva. Skutočnosť, že sme už predtým ukázali, že aktivácia TRPV1 môže vyvolať podobné lipostatické účinky (38) ako tie, ktoré sa našli pre CBD (obr.(Postava 11 a Obrázok Obrázok 2,2, D–H), spolu s našimi súčasnými zisteniami, že CBD indukovalo membránové prúdy na sebocytoch (obrázok (obrázok 4),4), nás podnietilo najprv preskúmať úlohu kanálov TRP pri sprostredkovaní vyššie uvedených modalít proti akné. Zistili sme, že lipostatické a antiproliferatívne účinky CBD boli sprostredkované aktiváciou iónových kanálov TRPV4 (a nie TRPV1 alebo TRPV2) (obrázky(obrázky 5,5, C – E a obrázok Obrázok 6A)6A) a súčasné zvýšenie [Ca²⁺ +] IC . V skutočnosti „negatívna regulácia“ lipogenézy zvýšením IC [Ca²⁺ +] nie je bezprecedentná, pretože už bola opísaná v sebocytoch (38), ako aj v adipocytoch (61 , 62). Je tiež dôležité poznamenať, že v rámci inej štúdie sme ukázali, že extracelulárny Ca²⁺ hrá dôležitú negatívnu regulačnú úlohu v mazovej lipogenéze (CC Zouboulis et al., nepublikované pozorovania). Ďalej je dôležité, že sme tiež ukázali, že protizápalová aktivita CBD je proces nezávislý od TRPV4 (obr. (Obrázok 66B).

Dôležité je, že naše údaje sú v dokonalom súlade s nedávnymi zisteniami De Petrocellisa et al. (37). Pomocou heterológnych expresných systémov preukázali, že CBD je silný, ale menej účinný aktivátor potkanieho TRPV4 (v porovnaní s „klasickými“ agonistami alebo niektorými inými fyto-kanabinoidmi, ako je kanabichromen [CBC] alebo kanabidivarín [CBDV]). Hoci by sa mala vziať do úvahy aj možnosť, že CBD môže byť účinnejším aktivátorom ľudského TRPV4 ako potkanieho TRPV4; predbežné údaje z nášho nedávno začatého hodnotenia predpokladaných účinkov iných fyto-kanabinoidov proti akné tiež naznačujú, že CBC a CBDV majú ešte výraznejšiu lipostatickú účinnosť ako CBD, čo ďalej argumentuje ústrednou úlohou TRPV4 (A. Oláh et al., nepublikované pozorovania).

Aby sa identifikovali ďalšie následné ciele, uskutočnili sa mikročipové experimenty v celom genóme na 3 nezávislých súboroch kontrolných a CBD ošetrovaných (10 μ M počas 24 hodín) sebocytov. GSEA (40 – 42) a BiNGO analýza (44 , 45) výsledkov microarray jednotne potvrdili naše výsledky, argumentujúc komplexnými účinkami proti akné po podaní CBD, čo naznačuje zníženie zápalu (napr. „produkcia cytokínov“), lipidov syntéza (napr. „proces biosyntézy lipidov“ a „pozitívna regulácia aktivity MAPK“), súvisiaca s proliferáciou (napr. „mitóza“ a „prechod G2 / M“) a „všeobecné pro-akné“ (napr. „mTOR dráha“ a „dráha IGF-1“) (2 , 43) génové sady a termíny BiNGO (doplnkové súbory Excel 1–4 a doplnkové obrázky 12 a 13).

Okrem vyššie uvedených výsledkov mikročipové analýzy tiež odhalili, že hladiny 80 génov boli znížené po liečbe CBD, zatiaľ čo expresia 72 génov bola po liečbe CBD zvýšená, medzi ktorými boli

identifikované viaceré potenciálne efekty „proti akné“ (doplnkové tabuľky 1 a 2). Validácia najslubnejších cieľových génov Q-PCR odhalila, že (v súlade s našimi údajmi o bunkovej fyziológii) expresia génov súvisiacich so syntézou lipidov (NRIP1 a ARHGAP9) a génov súvisiacich s proliferáciou (MKI67) bola zmenená v závislosti od TRPV4, zatiaľ čo zistilo sa, že zmeny v expresii „zápalových“ génov sú nezávislé od TRPV4 (obr.(Obrázok 6C).6C). Okrem toho zmeny expresie ARHGAP9 (známy endogénny inhibítor signalizácie ERK) (46) naznačujú, že inhibícia prolipogénnej dráhy MAPK (12) môže hrať úlohu pri sprostredkovaní lipostatických účinkov CBD. Zistili sme, že CBD inhibuje AEA-indukovanú (prolipogénnu) (12) fosforyláciu ERK1/2 v závislosti od TRPV4 (obrázok(Obrázok 7A),7A), čo opäť potvrdzuje kľúčovú úlohu TRPV4 pri sprostredkovaní účinku CBD.

Tiež sme umlčali ďalší „gén regulujúci lipidy“ (tj NRIP1) (doplnkový obrázok 14, A a B). Ako sa očakávalo (48), knockdown NRIP1 dokázal napodobniť lipostatický účinok CBD (obr.(Obrázok 77B).

Ďalej sme sa zamerali na odhalenie signálnej dráhy protizápalových účinkov. Dôkladné vyhodnotenie údajov z microarray zdôraznilo predpokladanú úlohu TRIB3, známeho inhibítora prozápalovej NF- κ B signalizácie (50). Okrem toho, inhibícia signalizácie NF- κ B hrá kľúčovú úlohu vo vývoji protizápalových účinkov sprostredkovaných CBD v iných systémoch (51). Selektívne génové umlčanie TRIB3 v ľudských sebocytoch sprostredkované RNA i (doplnkový obrázok 15, A a B) úplne zrušilo schopnosť CBD inhibovať prozápalové reakcie indukované LPS (obrázok(Obrázok 8A).8A). Aj keď by to naznačovala predchádzajúca štúdia (63), zaujímavé je, že sa zistilo, že TRIB3 sa nezúčastňuje na sprostredkovaní lipostatických účinkov CBD v sebocytoch (doplnkový obrázok 15C).

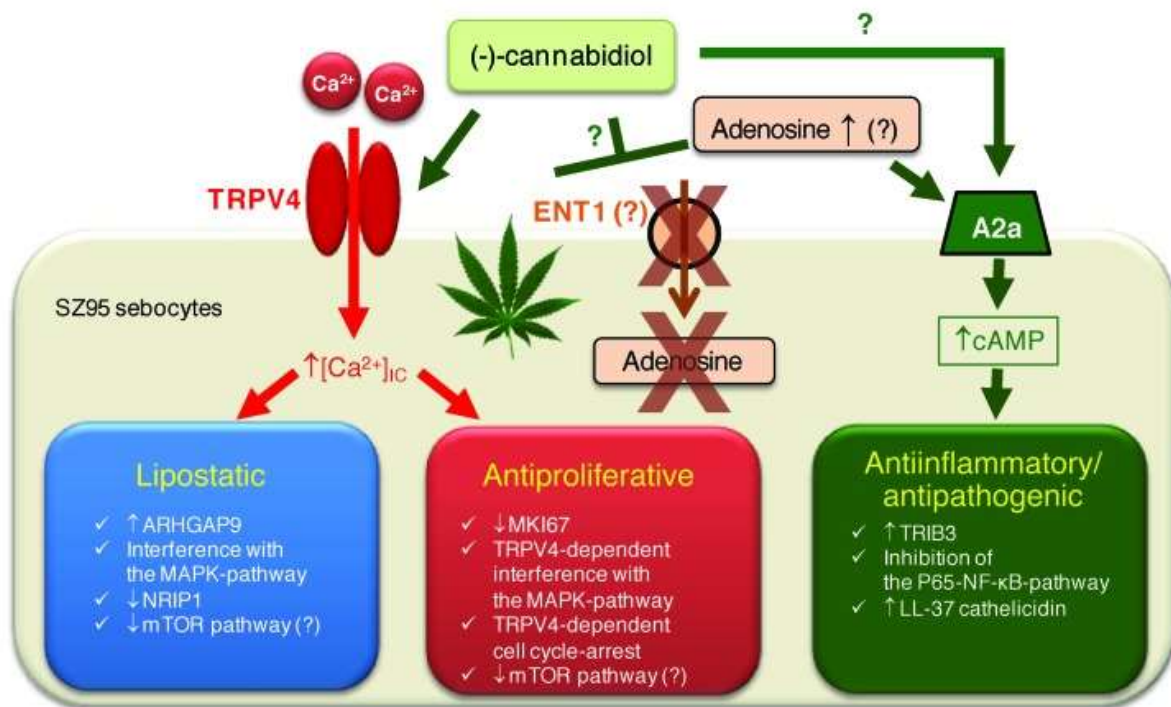
Je tiež pozoruhodné, že TRIB3 bol nedávno identifikovaný ako silný cieľový gén fytoKANABINOIDOV (64 – 66). Tieto výsledky spolu s našimi údajmi, ktoré sú tu uvedené, silne argumentujú pre kľúčovú účasť TRIB3 pri sprostredkovaní bunkových účinkov kanabinoidov.

Hoci CBD-dependentná upregulácia jeho niekoľkých známych cieľových génov, ako je aktivácia transkripčného faktora 4, asparagínsyntetázy, regulátora transportu kationu 1 a transkriptu 3 indukovaného poškodením DNA (odkazy 66 , 67 a doplnkové tabuľky 1 a 2), tiež argumentovali za aktiváciu signálnej dráhy závislej od TRIB3, aby sme ešte viac posilnili „TRIB3-hypotézu“, skúmali sme aj účinky CBD na jeden z hlavných bunkových cieľov TRIB3, tj NF- κ B. Ako sa očakávalo (51), CBD dokázalo inhibovať aktiváciu NF- κ B indukovanú LPS (opäť spôsobom nezávislým od TRPV4; obrázok Obrázok 8B),8B), čo môže plne vysvetliť jeho predtým preukázané protizápalové účinky.

Nakoniec sme sa zamerali na identifikáciu upstream signalizácie aktivácie/upregulácie TRIB3 pomocou CBD. Zistili sme, že CBD zvýšilo hladinu cAMP (známy upstream regulátor TRIB3) (ref. 52 a obr. Obrázok 8C),8C), zdôrazňujúc predpokladanú úlohu receptora spojeného s Gs pri iniciovaní jeho protizápalových účinkov. Tiež sme demonštrovali, že sebocyty exprimujú Gs - spojené A2a receptory (u ktorých sa už ukázalo, že sprostredkovávajú protizápalové účinky CBD) (odkaz 53 a doplnkový obrázok 16, A–C). Ďalej, špecifický antagonist A2a (ZM) bol schopný zabrániť upregulácii TRIB3 po liečbe CBD (obrázok(Obrázok 8D).8D). Potom sme sa pokúsili potvrdiť funkčnú prítomnosť osi predpokladaného protizápalového receptora A2a \rightarrow cAMP \rightarrow TRIB3/ Δ TNF- κ B. Zistili sme, že spoločné

podávanie ZM zrušilo protizápalové pôsobenie CBD (obrázok(Obrázok 8E).8E). Okrem toho sme tiež dokázali, že zrušilo NF-κB-inhibičný účinok CBD (obrázok(Obrázok 8F).8F). Celkovo tieto údaje silne tvrdia, že receptor A2a môže byť primárnym organizátorom protizápalových účinkov CBD. Treba tiež poznamenať, že podľa údajov publikovaných Carrier et al. (68), CBD-sprostredkovaná aktivácia A2a receptora je veľmi pravdepodobne nepriama akcia realizovaná primárnou inhibíciou ekvilibračného nukleozidového transportéra (napr. ENT1, ktorý sprostredkováva vychytávanie adenosínu bunkami) a následne zvýšeným "adenozínový tón."

Súhrnne naše údaje predstavujú fytokanabinoid CBD ako silné „univerzálne“ činidlo proti akné, ktoré má jedinečný „trojitý profil proti akné“ (obrázok(Obrázok 9).9). Viaceré štúdie na ľuďoch už skúmali bezpečnosť CBD (13 , 14). Okrem toho sa už v mnohých krajinách používa v klinickej praxi bez výraznejších vedľajších účinkov (Sativex) (16). To je obzvlášť sľubné, pretože je známe, že v súčasnosti dostupný, najúčinnjší prostriedok proti akné, izotretinoín, spôsobuje vážne vedľajšie účinky (2 , 69 , 70). Tieto údaje spolu s našimi súčasnými zisteniami poukazujú na sľubnú, nákladovo efektívnu a pravdepodobne aj dobre tolerovanú novú stratégiu liečby acne vulgaris, najbežnejšej ľudskej kožnej choroby.



Podľa našich najlepších vedomostí je presná farmakokinetika CBD v ľudskom tele neznáma a v literatúre nie sú žiadne údaje o (očakávanej) intrakutánnej akumulácii systémovo aplikovaného CBD odvodeného od Sativexu. Avšak vzhľadom na rozsiahlo zdokumentovanú akumuláciu fytokanabinoidov z údenej marihuany v pilosebaceóznej jednotke (kde sa začlenia do vlasového kmeňa) (71 , 72), je veľmi pravdepodobné, že CBD sa môže dostať aj do mazových žliaz, môže sa hromadiť a tam môžu dosiahnuť „terapeuticky dostatočné“ koncentrácie.

Okrem toho je veľmi dôležité poznamenať, že okrem systémovej aplikácie je potrebné pamätať na možnosť lokálnej aplikácie. Hoci hladiny CBD pozorované v plazme pacientov užívajúcich Sativex sú

nižšie (73) ako dávky CBD (= nižší mikromolárny rozsah), ktoré mali najsilnejšie účinky v našich štúdiách, takéto dávky by sa dali ľahko dosiahnuť po lokálnej aplikácii CBD použitím vhodných vozidlá, ktoré sa už používajú v súčasnej štandardnej liečbe akné. Očakáva sa, že vďaka svojej vysokej lipofilite sa CBD prednostne dostane do kože transfolikulárnou cestou a bude sa hromadiť v mazových žľazách (74 , 75). Veľmi dôležité je, že takáto akumulácia už bola zdokumentovaná pre viaceré lokálne aplikované lipofilné zlúčeniny, napr. pre steroidné hormóny (76) alebo fotosenzibilizátory (77) atď., pričom sa tvrdí, že tu testované dávky CBD sú translačne absolútne relevantné.

Celkovo vzaté, naše nové údaje spolu so zaujímavými literárnymi zisteniami silne podporujú budúcu štúdiu v klinických štúdiách, či už systémová alebo lokálna aplikácia CBD a/alebo vhodná modulácia súvisiacich signálnych dráh (obrázok(Obrázok 9)9) si zaslúži úplný klinický prieskum ako silná nová trieda činidiel proti akné.

Metódy

Kultivácia buniek, stanovenie intracelulárnych lipidov, vyšetrenie lipidómu.

Ľudské immortalizované sebocyty SZ95 (19) sa kultivovali, ako už bolo opísané (12 , 38). Na semikvantitatívnu detekciu mazových lipidov sa použilo farbenie olejovou červeňou O, zatiaľ čo na kvantitatívne merania sa použilo fluorescenčné farbenie nílskou červeňou, ako je podrobne uvedené v našej predchádzajúcej práci (12 , 38). Mazový lipidóm sa analyzoval metódou HPLC-ToF/MS, ako bolo opísané vyššie (78).

Stanovenie životaschopnosti, apoptózy, nekrózy a bunkovej proliferácie.

Životaschopnosť bola hodnotená testom MTT (Sigma-Aldrich), ako už bolo opísané (10 , 12). Apoptotické a nekrotické procesy boli skúmané kombinovaným farbením DiIC 1 (5) a SYTOX Green (Life Technologies), pričom sa merali zmeny v mitochondriálnom membránovom potenciáli a v permeabilite plazmatickej membrány, ako už bolo opísané (10 , 12). Stupeň bunkového rastu bol stanovený vo formáte 96-jamkovej platne meraním obsahu DNA v jamkách pomocou CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Life Technologies), podľa protokolu výrobcu.

Q-PCR.

Q-PCR bola vykonaná tak, ako je podrobne uvedené v našich predchádzajúcich správach (12 , 38). PCR amplifikácie bola vykonaná za použitia TaqMan primerov a sond (test ID-y: Hs00174128_m1 pre TNFa , Hs00218912_m1 pre TRPV1 , Hs00275032_m1 pre TRPV2 , Hs00222101_m1 pre TRPV4 , Hs00175798_m1 pre TRPA1 , Hs00375481_m1 pre TRPM8 , Hs00189038_m1 pre cathelicidin, Hs00174097_m1 pre IL1B , Hs00985639_m1 pre IL6 , Hs01032443_m1 pre Ki67 (MKI67), Hs00942766_s1 pre NRIP1 , Hs01082394_m1 pre TRIB3 , Hs00261256_m1 pre ARHGAP9a Hs00169123_m1 pre A2a receptor [ADORA2A]) a univerzálny protokol PCR master mix TaqMan (Applied Biosystems). Ako interné kontroly boli určené transkripty glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH), peptidyl-prolyl izomerázy A (cyklofilín A; PPIA) a 18S ribozomálnej RNA (18S) (ID testu: Hs99999905_m1, Hs91, 99m_9_9,99s99, v tomto poradí) .

Imunocytochémia.

Expresia TRP kanálov a adenosínového A2a receptora bola skúmaná s použitím TRPV1-špecifického (Sigma-Aldrich); TRPV2-, TRPA1-, TRPM8-, A2a-špecifické (všetky od AbCam); a TRPV4-špecifické (Alomone Labs) primárne protilátky (všetky produkované v králikoch) a Alexa Fluor 488-konjugované králičie IgG Fc segment-špecifické sekundárne protilátky (vyvinuté u kôz; Life Technologies). Jadrá boli vizualizované pomocou DAPI (Vector Laboratories). Ako negatívne kontroly boli z postupu vynechané príslušné primárne protilátky.

Western blotting.

Western blotting sa uskutočnil tak, ako je opísané vyššie (12 , 38) s použitím králičej anti-humánnej P-P65, NRIP1 a TRIB3 (všetky od Novus Biologicals); králičie anti-ľudskej ERK1/2 a myšie anti-ľudskej ERK1/2 (obe od Santa Cruz); myšia anti-ľudská P-IkBa (bunková signalizácia); alebo vyššie uvedené primárne protilátky.

Ako sekundárne protilátky boli použité králičie alebo myšie protilátky špecifické pre Fc segment IgG konjugované s chrenovou peroxidázou (vyvinuté u kôz a oviec, v uvedenom poradí; Bio-Rad). Denzitometrická analýza signálov sa uskutočnila pomocou softvéru ImageJ (NIH). Na posúdenie rovnakého zaťaženia, keď je to indikované, boli membrány znovu testované protilátkami proti β -aktínu a vizualizované, ako je opísané vyššie.

HSOC v plnej hrúbke a príprava vzoriek.

Od 4 žien boli získané biopsie neporušenej ľudskej pokožky hlavy a kože na paži (20). Produkcia lipidov a bunková proliferácia sa stanovili pomocou farbenia Oil Red O a značenia MKI67. Obrázky boli analyzované softvérom ImageJ image analysis software (NIH).

RNAi .

RNAi bola vykonaná podľa našich optimalizovaných protokolov (12 , 38). Sebocyty SZ95 boli transfekované špecifickými oligonukleotidmi Stealth RNAi (40 nM) proti NRIP1 (IDs: HSS112045 [“siNRIP1a”] a HSS112046 [“siNRIP1b”]), TRIB3 (ID: HSS184051 [“siTRIB2B3a”]“TRI0siTRIB2B3a”]“ a 40siTRIB2B3a”), TRPV1 (ID: HSS111306 [“siV1a”] a HSS111304 [“siV1b”]), TRPV2 (ID: HSS122144 [“siV2a”] a HSS122145 [“siV2b”]) a TRPV4 (ID:97 HSSa [“126”] a HSS126974 [“siV4b”]) s použitím Lipofectamine 2000 (všetky od Life Technologies). Pre kontroly sa použili duplexy negatívnej kontroly RNAi ("médiu" miešanej RNAi).

Microarray analýza.

Analýza génovej expresie 3 nezávislých sád kontrolných a CBD ošetrovaných sebocytov SZ95 (10 μ M CBD počas 24 hodín) sa uskutočnila pomocou Human Whole Genome Oligo Microarray (44K) (Agilent Technologies). Zmeny v génovej expresii sa považovali za významné, ak (a) existovali aspoň 2-násobné zmeny v zodpovedajúcich hladinách; b) zmeny boli vo všetkých prípadoch rovnaké; a (c) celkové korigované hodnoty P boli menšie ako 0,05. Vyhodnotenie, GSEA a analýza génovej ontológie

(BiNGO) výsledkov boli vykonané spoločnosťou Abiomics Ltd. (<http://www.abiomics.eu>). Údaje boli uložené v NCBI Gene Expression Omnibus (79) a sú prístupné prostredníctvom prístupového čísla série GEO GSE57571([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc= GSE57571](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE57571)).

Stanovenie intracelulárnej koncentrácie cAMP (ELISA).

Sebocyty SZ95 boli ošetrené 1 hodinu vehikulom alebo CBD (10 uM). Bunky sa potom lýzovali (hustota buniek: 107 buniek na ml) a lyzáty sa okamžite testovali podľa protokolu výrobcu s použitím testu Parameter Cyclic AMP Assay (R&D Systems). Vyhodnotenie údajov sa uskutočnilo pomocou online nástroja na analýzu údajov Four Parameter Logistic Curve od MyAssays Ltd. (<http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay>).

Patch-clamp analýza a fluorescenčné zobrazovanie Ca²⁺ + .

Záznamy celých buniek patch-clamp v konfigurácii napäťovej svorky sa uskutočnili pomocou zosilňovača Axopatch 200A (Molecular Devices) alebo pomocou zosilňovača EPC-10. Zmeny v [Ca²⁺ +] IC sa určili po nanosení 1 μM Fluo-4 AM pomocou čítačky fluorescenčných obrazoviek, ako je opísané v našej predchádzajúcej správe (80).

Štatistiky.

Dáta boli analyzované softvérom IBM SPSS Statistics 19 (SPSS Inc.) s použitím Studentovho 2-stranného 2-vzorkového t testu alebo 1-cestnej ANOVA s Bonferroniho a Dunnettovými post-hoc sondami. Hodnoty P menšie ako 0,05 sa považovali za významné. Homogenita rozptylov sa analyzovala Leveneovým testom. Ak Leveneov test ukázal nehomogenitu rozptylov, namiesto Bonferroniho sa použil Games-Howelov test.

Schválenie štúdie.

Táto štúdia bola schválená Etickým výborom pre inštitucionálny výskum Univerzity v Lübecku a dodržiavala zásady Helsinskej deklarácie. Účastníci štúdie poskytli informovaný súhlas pred svojou účasťou.

PodĎakovanie

Tento výskum podporili Maďarsko ("Lendület" LP2011-003/2013, OTKA 101761, OTKA 105369, TpMOP-4.2.2./A-11/1/KONV-2012-0025) a Európska únia (FP7-REGPOT-200 -1/229920) výskumné granty, ako aj granty od belgickej federálnej vlády (IUAP P7/13), Research Foundation-Flanders (G.0825.11), Výskumnej rady KU Leuven (PF-TRPLe) a talianskej Ministerstvo zdravotníctva (RF-2010-2316435). A. Oláh bol príjemcom štipendia Richter „Talentum“ podporovaného Európskou úniou a Maďarským štátom, spolufinancovaného Európskym sociálnym fondom v rámci TpMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 „Národný program excelentnosti“. BI Tóth bol podporený z programu Ľudia (Akcie Marie Curie) siedmeho rámcového programu Európskej únie (FP7/2007-2013) na základe grantovej dohody REA č. 330489.

Referencie

1. Zouboulis CC, et al. What is the pathogenesis of acne? *Exp Dermatol.* 2005;14(2):143–152. [PubMed] [Google Scholar]
2. Kurokawa I, et al. New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. *Exp Dermatol.* 2009;18(10):821–832. [PubMed] [Google Scholar]
3. Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signaling. *Life Sci.* 2006;78(6):549–563. doi: 10.1016/j.lfs.2005.05.055. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
4. Abood ME, Sorensen RG, Stella N, eds. *endoCANNABINOIDS*. New York, New York, USA: Springer Science+Business Media New York; 2013. [Google Scholar]
5. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(5):438–455. doi: 10.1038/nrd2553. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
6. Russo EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol.* 2011;163(7):1344–1364. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
7. Bíró T, et al. The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(8):411–420. doi: 10.1016/j.tips.2009.05.004. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
8. Kupczyk P, Reich A, Szepietowski JC. Cannabinoid system in the skin - a possible target for future therapies in dermatology. *Exp Dermatol.* 2009;18(8):669–679. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00923.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
9. Telek A, et al. Inhibition of human hair follicle growth by endo- and exocannabinoids. *FASEB J.* 2007;21(13):3534–3541. doi: 10.1096/fj.06-7689com. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
10. Tóth BI, et al. Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1. *J Invest Dermatol.* 2011;131(5):1095–1104. doi: 10.1038/jid.2010.421. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
11. Karsak M, et al. Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science.* 2007;316(5830):1494–1497. doi: 10.1126/science.1142265. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
12. Dobrosi N, et al. Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J.* 2008;22(10):3685–3695. doi: 10.1096/fj.07-104877. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
13. Zuardi AW, et al. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(4):421–429. doi: 10.1590/S0100-879X2006000400001. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
14. Zuardi AW, et al. Cannabidiol monotherapy for treatment-resistant schizophrenia. *J Psychopharmacol.* 2006;20(5):683–686. doi: 10.1177/0269881106060967. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

15. Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol.* 2008;153(2):199–215. doi: 10.1038/sj.bjp.0707442. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
16. Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol.* 2006;147(suppl 1):S163–S171. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
17. NIH. ClinicalTrials.gov. NIH Web site. <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=cannabidiol>. Accessed July 8, 2013.
18. Mirshahpanah P, Maibach HI. Models in acneogenesis. *Cutan Ocul Toxicol.* 2007;26(3):195–202. doi: 10.1080/15569520701502815. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
19. Zouboulis CC, Seltmann H, Neitzel H, Orfanos CE. Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol.* 1999;113(6):1011–1020. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00771.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
20. Lu Z, Hasse S, Bodó E, Rose C, Funk W, Paus R. Towards the development of a simplified long-term organ culture method for human scalp skin and its appendages under serum-free conditions. *Exp Dermatol.* 2007;16(1):37–44. doi: 10.1111/j.1600-0625.2006.00510.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
21. Wróbel A, et al. Differentiation and apoptosis in human immortalized sebocytes. *J Invest Dermatol.* 2003;120(2):175–181. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12029.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
22. Makrantonaki E, Zouboulis CC. Testosterone metabolism to 5 α -dihydrotestosterone and synthesis of sebaceous lipids is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor ligand linoleic acid in human sebocytes. *Br J Dermatol.* 2007;156(3):428–432. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07671.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
23. Rey AA, Purrio M, Viveros M-P, Lutz B. Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Neuropsychopharmacology.* 2012;37(12):2624–2634. doi: 10.1038/npp.2012.123. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
24. Melnik BC, Schmitz G. Role of insulin, insulin-like growth factor-1, hyperglycaemic food and milk consumption in the pathogenesis of acne vulgaris. *Exp Dermatol.* 2009;18(10):833–841. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00924.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
25. Zouboulis CC, Jourdan E, Picardo M. Acne is an inflammatory disease and alterations of sebum composition initiate acne lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014;28(5):527–532. doi: 10.1111/jdv.12298. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
26. Zouboulis CC, et al. A new concept for acne therapy: a pilot study with zileuton, an oral 5-lipoxygenase inhibitor. *Arch Dermatol.* 2003;139(5):668–670. [PubMed] [Google Scholar]
27. Schneider MR, Paus R. Sebocytes, multifaceted epithelial cells: lipid production and holocrine secretion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(2):181–185. doi: 10.1016/j.biocel.2009.11.017. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
28. Layton AM. Disorders of the sebaceous glands. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, eds. *Rook's Textbook of Dermatology.* 8th ed. Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2010:42.1–42.89. [Google Scholar]

29. Shirakawa M, Uramoto K, Harada FA. Treatment of acne conglobata with infliximab. *J Am Acad Dermatol.* 2006;55(2):344–346. doi: 10.1016/j.jaad.2005.06.008. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
30. Szabó K, Kemény L. Studying the genetic predisposing factors in the pathogenesis of acne vulgaris. *Hum Immunol.* 2011;72(9):766–773. doi: 10.1016/j.humimm.2011.05.012. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
31. Booz GW. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(5):1054–1061. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.007. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
32. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Patwardhan A, Hargreaves KM. Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;30(2):79–84. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
33. De Petrocellis L, et al. Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;325(3):1007–1015. doi: 10.1124/jpet.107.134809. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
34. De Petrocellis L, et al. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol.* 2011;163(7):1479–1494. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01166.x. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
35. Bisogno T, et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol.* 2001;134(4):845–852. doi: 10.1038/sj.bjp.0704327. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
36. Qin N, Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* 2008;28(24):6231–6238. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0504-08.2008. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
37. De Petrocellis L, et al. Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiol (Oxf).* 2012;204(2):255–266. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02338.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
38. Tóth BI, et al. Transient receptor potential vanilloid-1 signaling as a regulator of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol.* 2009;129(2):329–339. doi: 10.1038/jid.2008.258. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
39. Clapham DE. Transient Receptor Potential (TRP) channels. In: Squire LR, ed. *Encyclopedia Of Neuroscience.* Vol. 9. Oxford, United Kingdom: Oxford Academic Press; 2009:1109–1133. [Google Scholar]
40. Subramanian A, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(43):15545–15550. doi: 10.1073/pnas.0506580102. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
41. Mootha VK, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet.* 2003;34(3):267–273. doi: 10.1038/ng1180. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

42. Broad Institute. Gene Set Enrichment Analysis. <http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>. Broad Institute Web site. Updated January 23, 2014. Accessed June 16, 2014.
43. Melnik BC, Schmitz G. Are therapeutic effects of antiacne agents mediated by activation of FoxO1 and inhibition of mTORC1? *Exp Dermatol*. 2013;22(7):502–504. doi: 10.1111/exd.12172. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
44. The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Database. The Gene Ontology Web site. homepage. <http://www.geneontology.org/>. Accessed June 16, 2014.
45. Gene Ontology Consortium. The Sequence Ontology Project homepage. The Sequence Ontology Web site. <http://www.sequenceontology.org/>. Accessed June 16, 2014.
46. Ang BK, et al. ArhGAP9, a novel MAP kinase docking protein, inhibits Erk and p38 activation through WW domain binding. *J Mol Signal*. 2007;2:1. doi: 10.1186/1750-2187-2-1. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
47. Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*. 2012;66(2):105–143. doi: 10.1016/j.phrs.2012.04.005. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
48. Leonardsson G, et al. Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(22):8437–8442. doi: 10.1073/pnas.0401013101. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
49. Lee D-Y, et al. Sebocytes express functional cathelicidin antimicrobial peptides and can act to kill *Propionibacterium acnes*. *J Invest Dermatol*. 2008;128(7):1863–1866. doi: 10.1038/sj.jid.5701235. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
50. Wu M, Xu LG, Zhai Z, Shu HB. SINK is a p65-interacting negative regulator of NF- κ B-dependent transcription. *J Biol Chem*. 2003;278(29):27072–27079. doi: 10.1074/jbc.M209814200. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
51. Kozela E, et al. Cannabinoids Δ 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF- κ B and interferon- β /STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. *J Biol Chem*. 2010;285(3):1616–1626. doi: 10.1074/jbc.M109.069294. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
52. Zou T, et al. TRB3 mediates homocysteine-induced inhibition of endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol*. 2011;226(11):2782–2789. doi: 10.1002/jcp.22554. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
53. Ribeiro A, et al. Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. *Eur J Pharmacol*. 2012;678(1–3):78–85. [PubMed] [Google Scholar]
54. Wilkinson JD, Williamson EM. 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*. 2007;45(2):87–92. doi: 10.1016/j.jdermsci.2006.10.009. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
55. Appendino G, et al. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *J Nat Prod*. 2008;71(8):1427–1430. doi: 10.1021/np8002673. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

56. Ananthapadmanabhan KP, Mukherjee S, Chandar P. Stratum corneum fatty acids: their critical role in preserving barrier integrity during cleansing. *Int J Cosmet Sci.* 2013;35(4):337–345. doi: 10.1111/ics.12042. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
57. Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem Res.* 2005;30(8):1037–1043. doi: 10.1007/s11064-005-6978-1. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
58. Kathmann M, Flau K, Redmer A, Tränkle C, Schlicker E. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006;372(5):354–361. doi: 10.1007/s00210-006-0033-x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
59. Rimmerman N, et al. Direct modulation of the outer mitochondrial membrane channel, voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) by cannabidiol: a novel mechanism for cannabinoid-induced cell death. *Cell Death Dis.* 2013;4:e949. doi: 10.1038/cddis.2013.471. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
60. Ross RA. The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(3):156–163. doi: 10.1016/j.tips.2008.12.004. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
61. Shi H, Halvorsen YD, Ellis PN, Wilkison WO, Zemel MB. Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiol Genomics.* 2000;3(2):75–82. [PubMed] [Google Scholar]
62. Zhang LL, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ Res.* 2007;100(7):1063–1070. doi: 10.1161/01.RES.0000262653.84850.8b. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
63. Takahashi Y, et al. TRB3 suppresses adipocytes differentiation by negatively regulating PPAR γ transcriptional activity. *J Lipid Res.* 2008;49(4):880–892. doi: 10.1194/jlr.M700545-JLR200. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
64. Salazar M, et al. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest.* 2009;119(5):1359–1372. doi: 10.1172/JCI37948. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
65. Salazar M, et al. The pseudokinase tribbles homologue-3 plays a crucial role in cannabinoid anticancer action. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831(10):1573–1578. [PubMed] [Google Scholar]
66. Juknat A, et al. Microarray and pathway analysis reveal distinct mechanisms underlying cannabinoid-mediated modulation of LPS-induced activation of BV-2 microglial cells. *PLoS One.* 2013;8(4):e61462. doi: 10.1371/journal.pone.0061462. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
67. Mungrue IN, et al. CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. *J Immunol.* 2009;182(1):466–476. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.466. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
68. Carrier EJ, Auchampach JA, Hillard CJ. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(20):7895–7900. doi: 10.1073/pnas.0511232103. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
69. Ellis CN, Krach KJ. Uses and complications of isotretinoin therapy. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45(5):S150–S157. doi: 10.1067/mjd.2001.113717. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

70. Rigopoulos D, Larios G, Katsambas AD. The role of isotretinoin in acne therapy: why not as first-line therapy? facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2010;28(1):24–30. doi: 10.1016/j.clindermatol.2009.03.005. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
71. Kintz P, Cirimele V, Mangin P. Testing human hair for cannabis. II. Identification of THC-COOH by GC-MS-NCI as a unique proof. *J Forensic Sci*. 1995;40(4):619–622. [PubMed] [Google Scholar]
72. Skopp G, Strohbeck-Kuehner P, Mann K, Hermann D. Deposition of cannabinoids in hair after long-term use of cannabis. *Forensic Sci Int*. 2007;170(1):46–50. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.09.003. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
73. Karschner EL, Darwin WD, Goodwin RS, Wright S, Huestis MA. Plasma cannabinoid pharmacokinetics following controlled oral delta9-tetrahydrocannabinol and oromucosal cannabis extract administration. *Clin Chem*. 2011;57(1):66–75. doi: 10.1373/clinchem.2010.152439. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
74. Lodzki M, et al. Cannabidiol-transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *J Control Release*. 2003;93(3):377–387. doi: 10.1016/j.jconrel.2003.09.001. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
75. Tubaro A, et al. Comparative topical anti-inflammatory activity of cannabinoids and cannabivarinins. *Fitoterapia*. 2010;81(7):816–819. doi: 10.1016/j.fitote.2010.04.009. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
76. Hueber F, Wepierre J, Schaefer H. Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of hydrocortisone and testosterone: in vivo study in the hairless rat. *Skin Pharmacol*. 1992;5(2):99–107. doi: 10.1159/000211026. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
77. Togsverd-Bo K, et al. Porphyrin biodistribution in UV-exposed murine skin after methyl- and hexyl-aminolevulinic acid incubation. *Exp Dermatol*. 2012;21(4):260–264. doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01442.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
78. Camera E, et al. Comprehensive analysis of the major lipid classes in sebum by rapid resolution high-performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *J Lipid Res*. 2010;51(11):3377–3388. doi: 10.1194/jlr.D008391. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
79. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(1):207–210. doi: 10.1093/nar/30.1.207. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
80. Borbíró I, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth. *J Invest Dermatol*. 2011;131(8):1605–1614. doi: 10.1038/jid.2011.122. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]