

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Új, komplex mechanizmusok felderítése a
hajnövekedés szabályozásában – fókuszban a külső
gyökérhüvely keratinociták**

Lisztés Erika

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

TARTALOM

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
BEVEZETÉS	7
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
A szőrtüsző.....	9
A szőrtüsző anatómiája és felépítése.....	9
A HF élettana: a hajciklus.....	13
Egy gyakori szőrnövekedési rendellenesség: az androgén alopecia	16
Miért releváns modell a HF szervkultúra?	18
Az adenozin, metabolizmusa és receptorai	19
Az adenozin hatása a szőrnövekedésre	22
A koffein és hatásmechanizmusa	23
A koffein, mint potenciális kozmetikum.....	25
A koffein hatása a hajnövekedésre.....	26
CÉLKITŰZÉS	29
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
Felhasznált anyagok.....	30
Humán szőrtüszők izolálása, tenyésztése, elongációjának nyomon követése.....	30
Humán szőrtüsző-eredetű külső gyökérhüvely keratinociták izolálása és tenyésztése	33
Sejtproliferáció vizsgálata ORS keratinocitákon	34
Apoptotikus folyamatok vizsgálata ORS keratinocitákon	35
Nekrotikus folyamatok nyomon követése ORS keratinocitákon	35

Génexpressziós változások vizsgálata.....	36
A citokinfelszabadulás vizsgálata (ELISA)	37
Immunfluoreszcens jelölések	37
➤ Az adenzin receptorok kimutatása.....	37
➤ Ki67 proliferációs marker kimutatása ORS keratinocitákon.....	38
Hisztológia	39
Proliferáló és apoptotizáló sejtek együttes jelölése HF-kön	39
TGF- β 2 és IGF-1 immunfluoreszcencia kimutatása HF-kön.....	40
„DP Stalk” vagy másnéven „DP szár” analízis	41
Hisztomorfometriai analízis	42
Hajciklus pontszám („hair cycle score”: HCP) analízis	42
Statisztikai analízis.....	43
EREDMÉNYEK	44
1. Az adenzin hajciklusra gyakorolt hatásainak áttekintése.....	44
Az adenzin fokozza a HF-k növekedését, a MK-ák proliferációját és anagén fázist hosszabító hatással bír.....	44
Az adenzin kivédi a TGF- β 2 katagén-indukáló hatását	46
A HF-k és az ORS keratinociták egyaránt kifejezik az adenzin receptor izoformákat	49
Az adenzin lehetséges hatásmechanizmusának vizsgálata.....	52
2. A koffein hajciklusra gyakorolt hatásainak vizsgálata.....	54
A humán női és férfi HF-k eltérően reagálnak a koffein stimulációra.....	54
A koffein fokozza a tenyésztett ORS keratinociták proliferációját.....	57
A koffein csökkenti a TGF- β 2 sejthalált okozó hatását ORS keratinocitákon.....	59

A koffein a TST katagént indukáló hatását képes volt férfiaknál teljes egészében, míg nőknél részlegesen felfüggeszteni.....	61
A koffein kezelés differenciáltan befolyásolja a hajciklus-modulátor TGF- β 2 és IGF-1 intrafollikuláris kifejeződését férfi és női donoroktól származó HF-k esetén.....	62
A koffein befolyásolja a TGF- β 2 és az IGF-1 kifejeződését és felszabadulását ORS keratinocitákon.....	66
MEGBESZÉLÉS	69
Az adenzin, mint potenciális hajciklus szabályozó molekula	70
A koffein, mint potenciális hajciklus szabályozó molekula.....	74
Feltételezett mechanizmus, avagy ahol a szálak összeérnek.....	79
ÖSSZEFOGLALÁS.....	81
SUMMARY	82
IRODALOMJEGYZÉK.....	83
TÁRGYSZAVAK.....	91
KEY WORDS	92
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	93
FÜGGELÉK.....	94

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

13cRA: isotretinoin	FGF: fibroblaszt növekedési faktor
5-AR: 5- α -reduktáz enzim	GAPDH: gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
A₁: adenozin 1-es típusú receptor	HE: hematoxin-eozin
A_{2A}: adenozin 2A típusú receptor	HF: szőrtüsző
A_{2B}: adenozin 2B típusú receptor	HGF: hepatocita növekedési faktor
A₃: adenozin 3-as típusú receptor	HIF-1: hypoxia indukálta faktor
AC: adenilát-cikláz	HRP: torma peroxidáz
ADOR: adenozin receptor	IF: infundibulum
AEA: anandamid	IGF: inzulin-szerű növekedési faktor
AGA: androgén alopecia	IGF1R: inzulin-szerű növekedési faktor-1 receptor
AMP: adenozin- monofoszfát	IRS: belső gyökérhüvely keratinociták rétege
ATP: adenozin-trifoszfát	IS: isthmus
BDNF: <i>brain-derived neurotrophic factor</i>	KGF: keratinocita növekedési faktor
BMP: <i>bone morphogenic protein</i> , HF morfogenezise során fontos faktor	Ki67: proliferációs marker
cAMP: ciklikus adenozin-monofoszfát	KIR: központi idegrendszer
CD: <i>cluster of differentiation</i>	MK: mátrix keratinocita
CK: keratin	NF-κB: nukleáris faktor- κ B
CREB: <i>cAMP response element-binding protein</i>	NK: negatív kontroll
CTGF: kötőszöveti növekedési faktor	ORS: külső gyökérhüvely keratinociták rétege
CTS: a HF-t borító legkülső kötőszövetes burok	PBS: foszfát puffer oldat
DAPI: 4',-6-diamidino-2-fenilindol	PDE: foszfodiészterázok
DCS: antitest hígítására szolgáló oldat	PKA: protein kináz-A
DHT: dihidrotesztoszteron	PKC: foszfolipáz-C
DMSO: dimetil-szulfoxid	PPIA: ciklofilin A
DP: dermális papilla	RT-qPCR: reverz transzkripciót követő kvantitatív „valós idejű” polimeráz láncreakció
EDTA: etilén-diamin-tetra-ecetsav	SCF: őssejt faktor
EGF: epidermális növekedési faktor	
FB: humán dermális fibroblaszt	
FBS: embrionális borjúsérum	

SEM: standard hiba átlaga

TGF- β : transzformáló növekedési faktor- β

TNT: Tris-HCl/NaCl/Tween[®] 20 tartalmú
mosó puffer

TSA: tiramid szubsztrát amplifikáció

TST: tesztoszteron

TUNEL: apoptotikus DNS fragmentáción
alapuló jelölés (Terminal

deoxynucleotidyl transferase dUTP

Nick End Labeling)

UV: ultraviola

VEGF: vaszkuláris endothelialis
növekedési faktor

Δ CT: küszöbciklusok különbségén alapuló
RT-qPCR értékelési módszer

$\Delta\Delta$ CT: a relatív expresszió belső
kontrollra történő normalizálása

BEVEZETÉS

Napjainkban egyre nagyobb hangsúly helyeződik az esztétikus megjelenésre; férfiak és nők milliói folytatnak küzdelmet a tökéletesnek vélt külső eléréséért, újabbnál újabb kihívások elé állítva ezzel az orvosokat és kutatókat. A haj- és szőrnövekedés rendellenességei emberek sokaságának okoznak életminőségbeli romlást világszerte. Nem meglepő tehát, hogy napjainkban a szőrnövekedési rendellenességek kezelése érdekében világszerte számos kutatócsoport tesz erőfeszítéseket a „szőrbiológia” alaposabb megismerésére. Ezen tudományterület mélyebb tanulmányozásában laboratóriumunk is szerepet vállalt, hiszen kutatásaink során – részben kozmetikai cégekkel együttműködve – sikerült kimutatnunk, hogy mind az adenzin, mind pedig a koffein fontos szerepet tölt be a hajciklus szabályozásában.

Az adenzin, egy lokálisan termelődő esszenciális mediátor, mely szerteágazó fiziológiai funkciói (angiogenezis, vazodilatáció) mellett speciális szerepet tölt be az energiatranszferben és neurotranszmisszióban is. A hajnövekedésre gyakorolt jótékony hatását, úgymint a hajszál átmérőjének vastagodását és hosszának növekedését, már korábban leírták. Mindemellett beszámoltak arról is, hogy az adenzin fokozza bizonyos hajciklus modulátorok (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor [VEGF], fibroblaszt növekedési faktor-7 [FGF-7]) termelődését tenyésztett HF eredetű dermális papilla (DP) sejteken, adenzin receptor (ADOR) mediálta jelátvitelen keresztül. Az adenzin hajciklusra gyakorolt moduláló hatása részben ismert, ennek ellenére azonban számos nyitott kérdés vár megválaszolásra a pontos hatást, illetve a szabályozást illetően. Kísérleteink során ezért azt vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a HF-k és a HF különböző kompartmentjeiben található sejtek biológiai folyamatait az adenzin.

A koffein napjaink egyik legismertebb alkaloid vegyülete, mely ismertségét elsősorban kulináris élvezeteket nyújtó természetes forrásának, a kávécsérjének (*Coffea arabica*, *Coffea*

canephora) köszönheti, és a legszélesebb körben felhasznált természetes, farmakológiailag aktív vegyületek közé tartozik a világon. Komplex biológiai aktivitásának köszönhetően manapság egyre népszerűbbé válik egyes kozmetikai termékekben való alkalmazása. Három hidofil centruma mellett metil csoportokat tartalmaz, melyek hidrofób tulajdonságokat kölcsönöznek és lehetővé teszik a bőr barrieren keresztüli penetrációját, melyben a szőracsatorna, illetve tágabb értelemben maguk a HF-k is potenciális penetrációs útvonalként szolgálhatnak (Poltev és mtsai. 2010). A koffein szőrnövekedésre kifejtett „pozitív” hatása abban rejlik, hogy a férfias típusú hajhullásban fokozott tesztoszteron (TST) szint által telogén fázisban „megragadt” HF-k újbóli anagén fázisba lépésének indukálásában játszik szerepet. Ezen nyomvonalon elindulva kísérleteink során szeretnénk volna mélyebb betekintést nyerni a koffein hajciklust reguláló hatásába humán HF-kön; vizsgálatainkat HF-eredetű ORS keratinociták bevonásával terjesztettük ki.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A szőrtüsző

A HF bonyolult felépítéssel rendelkező komplex szerv, melynek jelenléte kizárólag az emlősökre jellemző. Számos, különböző embrionális eredetű sejttípus alkotja, úgymint keratinociták, melanociták és specializált fibroblasztok (FB). Ezen sejttípusok magasan szerveződött összessége alkotja a több rétegből felépülő HF-t, mely a keratinizálódott hajsza termeléséért felelős. Funkcióját tekintve meg kell említenünk a mechanikai védelmet a külső behatásokkal szemben, emellett kiemelendő szenzoros funkciója; fokozza a bőrfelszínen a tapintási ingerek észlelését, valamint fontos szerepe van a szexuális és szociális kommunikáció közvetítésében. Habár a szőrzet fiziológiás jelentősége manapság csekélyebb, kozmetológiai és pszichés hatása testtájéktól függően kifejezett (Kárpáti 2019), (Schneider, Schmidt-Ullrich, és Paus 2009).

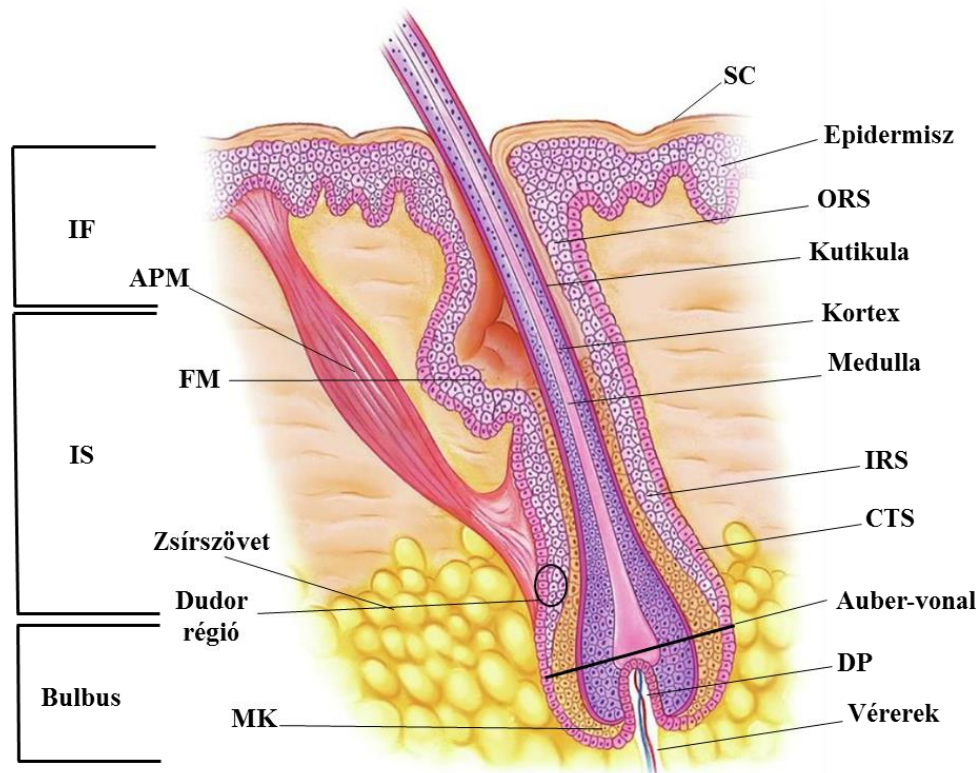
A szőrtüsző anatómiája és felépítése

A HF-t furcsa kettősége teszi egyedivé és egyben csodálatra méltóvá: kívülről a test felszínén látható vékony, flexibilis „cső” formájában jelenik meg az általa termelt hajsza, melyet elhajt, teljesen keratinizálódott epiteliális sejtek alkotnak, míg mélyebbre hatolva a bőrön belül egy önálló, élő follikulust találunk, mely a dermiszbe és a szubkután régióba betüremkedő epiteliális, hengeres képlet formájában jelenik meg, melynek bazális régióját a dermális papillát (DP) alkotó mesenchimális sejteket körülhatároló bulbus képezi (Buffoli és mtsai. 2014) (**1. ábra**).

Anatómiailag a HF különböző részekre tagolható: a permanens felső, disztális részre, mely nem mutat látható ciklikus változásokat, és a minden egyes hajciklus során megújuló alsóbb, proximális részre. A felső rész a testfelszíntől a faggyúmirigy kivezetőcsövének

beszájadásáig tartó infundibulumból, míg az alsóbb régió az infundibulumtól a szőrszálegyenesítő izom tapadásáig tartó isthmusból tevődik össze, mely és epiteliális és melanocita őssejteket tartalmaz (Randall és Botchkareva 2009).

Az alsóbb, ciklikusan megújuló rész testesíti meg a magát a „haj gyárat” vagyis az anagén bulbust (*bulbus pili*), melybe a *papilla pili* vagy másnéven DP mukopoliszacharid-gazdag sztrómát, idegszálakat, és kapilláris hurkot tartalmazó kötőszövetes, mezodermális eredetű állománya türemkedik be bazálisan, melyet specializált FB-ok alkotnak és ez a régió határozza meg a bulbus méretét, a hajszál átmérőjét, valamint az anagén fázis hosszát. A DP a legfontosabb vezérlője a HF növekedésének és pigmentációjának; esszenciális forrása számos növekedési faktornak (keratinocita növekedési faktor: [KGF]; bone morphogenetic protein: [BMP]; hepatocita növekedési faktor: [HGF], inzulin-szerű növekedési faktor: [IGF]; őssejt faktor: [SCF]), melyek a növekedés és melanogenezis szabályozásában játszanak kiemelt szerepet (Schneider, Schmidt-Ullrich, és Paus 2009), (Schmidt-Ullrich és Paus 2005a).



1. ábra: A HF anatómiájának sematikus rajza. APM: szőrszálegyenesítő izom, FM: Faggyúmirigy, MK: mátrix keratinociták, SC: stratum corneum, ORS: külsőgyökérhüvely keratinociták rétege, IRS: belsőgyökérhüvely keratinociták rétege, CTS: kötőszövetes burok, DP: dermális papilla, IF: infundibulum, IS: isthmus. Forrás: <https://fineartamerica.com>.

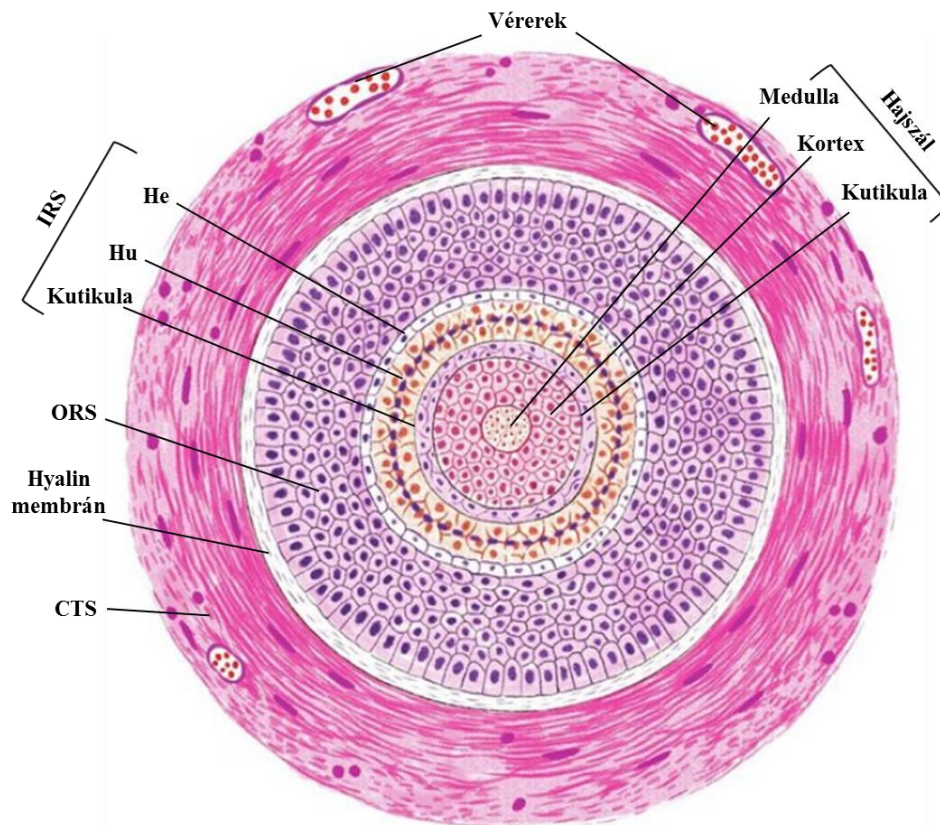
Magát a bulbust két részre oszthatjuk, egy proximális régióra, mely differenciálatlan sejteket tartalmaz és egy disztális részre, ahol a sejtek már differenciálódtak. A két részt elválasztó vonalat *Auber-vonalnak* nevezzük, mely a bulbus átmérőjének legszélesebb síkját jelöli. Az *Auber-vonal* alatt fekszik a follikulus germinatív mátrixa; a DP-át közvetlenül határoló sejtek alkotják a *stratum germinativumot*, mely magas proliferációs rátával jellemezhető mátrix keratinocitákat (MK) és elszórtan differenciálatlan melanocitákat is tartalmaz. A MK-k a bulbus felső rétege felé haladva fölfelé irányuló mozgást végeznek, térfogatuk növekszik és vertikálisan megnyúlnak, majd a hajszál és a belső gyökérhüvely (IRS) keratinociták keratin termelő sejtjeivé differenciálódnak.

A IRS keratinociták rétege a szőrszál mélyen fekvő részét borító többrétegű köpeny, melynek három alrétegét különítjük el: (i) a Henle-réteget, mely köbös sejtekből felépülő egyetlen sejt sor, melyek közvetlen kapcsolatban vannak az IRS keratinocitákkal, (ii) a Huxley-réteg, mely a középső réteget képezi egy vagy két sejt sorral és (iii) a kutikula, melynek lapos sejtjei közvetlenül a szőrszál kutikulájának sejtjeihez kapcsolódnak, lehorgonyozva ezzel a hajszálat a follikulushoz (Ross 2007). Az IRS sejtek keratinokat (CK) és trichohyalint termelnek, mely intracelluláris cementként szolgál számukra, ezáltal erősítve őket, hogy képesek legyenek a növekvő hajszál formálására, megtartására és a fölfelé irányuló mozgás vezetésére (Ross 2007).

A szőrszálat terminálisan differenciált, halott keratinociták (trichociták) alkotják, melyek kompakt fibrillumokká szerveződnek és nagy szakítószilárdságot kölcsönöznek ezáltal a hajszálnak (Ralf Paus és Cotsarelis 1999) (**2. ábra**). Felépítését tekintve általában három régiót különíthetünk el kívülről befelé haladva: a kutikulát, kortextet és medullát (utóbbi néhány esetben nem különíthető el). Habár a medulla képezi a centrális régiót, a hajszál összetételének jelentős részét a kortex adja, mely a hajszál fizikai és mechanikai tulajdonságainak is

meghatározója és 90%-ban mátrixba ágyazott mikrofibrillumokból felépülő makrofibrillumok alkotják. A hajszálat teljes hosszában a kutikula borítja, mely ellapuló sejtekből áll. A szőrszál kutikulájának integritása fontos szerepet játszik a kortex védelmében mind a fizikai mind pedig a kémiai behatásokkal szemben, jelentős barrier funkciója révén (Schmidt-Ullrich és Paus 2005a).

Eddig csak érintőlegesen említettük az ORS keratinocitákat, azonban igen prominens sejtrétegről van szó, mely amellet, hogy a HF külső rétegét képezi, keratinocita és melanocita őssejteket is tartalmazó multipotens őssejt rezervoárként is szolgál és folyamatos sejt utánpótlást szolgáltat az epidermisz számára. Az ORS réteg alkotja a jól elkülönülő „dudor” régiót, mely a szőrszálegyenesítő izom csatlakozásánál található. Ezen régióból mind az epidermisz, mind pedig a faggyúmirigy regenerálódni képes az esetleges sérülések során az őssejtekből származó „sokszorozó” (transit-amplifying) sejteknek köszönhetően (Ralf Paus és Cotsarelis 1999), (Zhang és Hsu 2017). A dudor középső régiója CD34⁺ lassan osztódó epidermális őssejteket tartalmaz, melyek az epidermisz sejtjei számára szolgálnak rezervoárként, míg a dudor felsőbb régiójában *Gli1*⁺ epidermális őssejteket azonosítottak, melyek a HF regenerálásában és az epidermisz sebgyógyulása során töltenek be fontos szerepet. Ezen sejtek heterogenitása és kompartmentalizációja a különböző szöveti régiók regenerációjában betöltött szerepükkel magyarázható (Cheng és mtsai. 2018; Brownell és mtsai. 2011). Az ORS keratinociták lassú proliferációs rátával jellemezhetőek, a bazális membrántól az IRS felé differenciálódnak és legfőbb feladatuk a belső sejtrétegek táplálása mellett a különböző növekedési faktorok, neurotrofinok és citokinek termelése. Ennek köszönhetően jelentős szerepük van a hajciklus szabályozásában is. A HF-t teljes hosszában egy dermális eredetű kötőszövetes burok (CTS) borítja, melynek sejtjei a DP sejtjeivel állnak kontaktusban. Sérülés esetén a DP teljes mértékű regenerációra képes a CTS sejtjeiből (Reynolds és Jahoda 1996; Reynolds és mtsai. 1999).



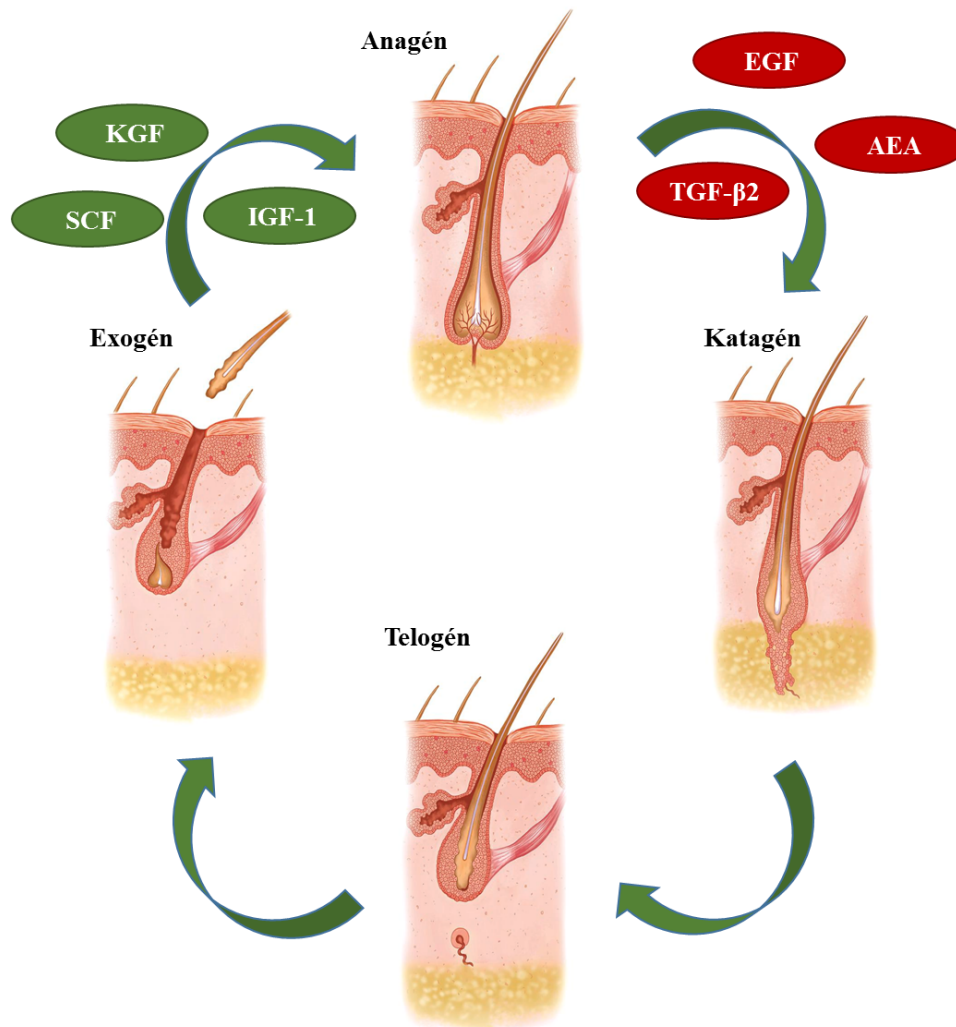
2. ábra: A HF keresztmetszeti képe. He: Henle-réteg, Hu: Huxley-réteg, ORS: külső gyökérhüvely keratinociták rétege, IRS: belső gyökérhüvely keratinociták rétege, CTS: kötőszövetes burok. Forrás: <https://fineartamerica.com>.

A HF élettana: a hajciklus

A hajszál termelődését a meglévő folliculusok genetikailag meghatározott ciklikus működése biztosítja, mely a különböző keratinocita sejtrétegek dinamikus és ciklikus aktivitásának eredménye, melynek egyensúlyát neuroendokrin, vaszkuláris és immunológiai hatások szabályozzák. A legfontosabb szabályozó tényezői ezen ciklikus váltakozásnak a különböző humorális faktorok, melyek keresztül vezetnek a HF-t a megfelelő változásokon, mely sajátos dinamikával jellemezhető, ezáltal minden egyes HF különböző növekedési stádiumban lehet a szomszédjától függetlenül (Oh és mtsai. 2016; R. Paus 1998; Ralf Paus és mtsai. 2003; Ralf Paus, Arck, és Tiede 2008) (3. ábra). Tradicionálisan a hajciklust három főbb fázisra oszthatjuk fel: (i) anagén, azaz növekedési, (ii) katagén vagy átmeneti fázis és (iii) a telogén, kvázi nyugalmi fázis. Az anagén fázis az aktív növekedés szakasza, amikor a HF kiterjed és eléri a jellegzetes hagymaszerű alakot és a hajszál termelődés zajlik. Hat (I-VI)

alszakaszra oszthatjuk fel; anagén (I-III) fázisban a progenitor sejtek proliferálnak, körülölelik a DP-t, belenőnek a dermiszbe, és IRS-é valamint hajszállá kezdenek differenciálódni, azután az újonnan formálódó szőrszál elkezd fejlődni és a mátrixban található melanociták pigmenttermelő aktivitást mutatnak; anagén IV fázisban a hajszál termelő egység teljes kapacitással működik, melyet jellemez az epiteliális eredetű sejtek bulbus formációja körülölelvén a DP-t, mélyen a szubkután szövetbe ágyazódva és az újonnan formálódó hajszál megjelenése a bőr felszínén. Az utolsó (VI) fázis évekig tarthat a HF életében (Randall és Botchkareva 2009), (Dhurat és Deshpande 2010). Az anagén fázis végéhez közeledtével kezdetét veszi a katagén fázis, melynek az inicializálásában számos növekedési faktor (fibroblaszt növekedési factor-5 [FGF-5], epidermális növekedési faktor [EGF]), neurotrofin („brain-derived neurotrophic factor” [BDNF], p73 neurotrofin receptor) és a TGF- β család tagjai (TGF- β 1, - β 2) is részt vesznek (Foitzik és mtsai. 2000; Andl és mtsai. 2004; Hansen és mtsai. 1997; Hébert és mtsai. 1994; Schmidt-Ullrich és Paus 2005b). A katagén fázis indukálásában szerepet játszó molekulák között munkacsoportunk sikerrel azonosította a HF-ben kifejeződő, Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid (TRPV) ioncsatornák alcsaládjába tartozó TRPV1, TRPV3 és TRPV4 receptorokat (Bodó és mtsai. 2005; Borbíró és mtsai. 2011; Imre Lőrinc Szabó és mtsai. 2019), valamint a kannabinoid ligandokat (Telek és mtsai. 2007) is. Ezen szakasz kezdetén a MK-k differenciációja és proliferációja szignifikáns csökkenést mutat, a melanociták pigmenttermelő aktivitása csökken, és a hajszál termelés befejeződik. A HF apoptózis-vezérelt regresszió megy keresztül, melynek eredményeképpen az átmérője megközelítőleg egyhatodára redukálódik (Oh és mtsai. 2016). A katagén fázis végére egy specializált struktúra, a *club-hair* (teljes mértékben keratinizálódott, halott hajszál) formálódik. Ezen keratinizált, kefeszerű struktúra bazális része ORS keratinociták által van körbevéve és ezek horgonyozzák a hajszálat a telogénné váló follikulushoz. A DP kvázi nyugalmi fázisban lévő sejtesoportosulássá transzformálódik közel a regrediáló HF epitéliumához és a

szubkutiszból felhúzódik a dermisz/szubkutisz határára hogy fenntartsa a kapcsolatot a HF epitélium disztális részével, mely magába foglalja a másodlagos *hajcsírát* (*hair germ*) és a dudor régiót. A telogén fázis a katagén fázist követi, ez a HF látszólagos nyugalmi periódusa, mely néhány héttől (szempillák) akár nyolc hónapig is tarthat (fejbőr hajszálai). Mivel a hajszál nem nő ebben a fázisban, a DP is nyugalmi szakaszban pihen. A telogén HF-k jellegzetessége a pigmenttermelő differenciálódott melanociták és az IRS hiánya. Hozzávetőlegesen a HF-k 10-15%-a van nyugalmi stádiumban minden egyes pillanatban (Randall és Botchkareva 2009). Pár hét leforgását követően a HF ismét belép a növekedési fázisba a dudor régió őssejtjeinek stimuláló hatásának következtében (Wosicka és Cal 2010). Többnyire az anagén fázis kezdetén (I-III fázis) figyelhető meg az előző ciklusban termelt hajszál kihullása, melyet exogén fázisnak nevezünk (Higgins, Westgate, és Jahoda 2009). Az új anagén fázis inicializálásában és prolóngálásában valamint az ehhez társuló melanogenezisben az inzulin-szerű növekedési faktort-1 (IGF-1), fibroblaszt növekedési faktor-7 (FGF-7)/keratinocita növekedési faktor (KGF) és őssejt faktor (SCF) bír kiemelkedő szereppel (Langan és mtsai. 2015; Ralf Paus és mtsai. 2014; Stenn és Paus 2001). A follikuláris őssejtek jelenléte, csakúgy, mint az interakció a melanociták, epitheliális- és mesenchimális sejtek között nélkülözhetetlen a hajciklus fenntartásához és regulációjához. A dudor régió hozzáférhető forrást biztosít a differenciálatlan, multipotens őssejtekhez melyek kritikusak a HF fejlődés és funkció szempontjából, beleértve a pigmentációt is (Ralf Paus, Arck, és Tiede 2008). A „bulge aktivációs elmélet” szerint a DP-ben található faktorok a dudor régióban található őssejtekre hatván proliferációt indukálnak, mely láncreakcióként vonja maga után a HF anagén fázisának sajátjaival jellemezhető további proliferációs folyamatok beindulását, tehát a dudor régió és DP sejtek közötti kommunikáció kruciális az új hajciklus beindulása szempontjából (Sun, Cotsarelis, és Lavker 1991; Panteleyev, Jahoda, és Christiano 2001; Stenn és Paus 2001).



3. ábra: A hajciklus és annak különböző fázisai, valamint az egyes fázisok kialakulásában szerepet játszó faktorok. IGF-1: inzulin-szerű növekedési faktor, KGF: keratinocita növekedési faktor, SCF: őssejt faktor, EGF: epidermális növekedési faktor, TGF-β2: transzformáló növekedési faktor -β2, AEA: anandamid. Forrás: <https://fineartamerica.com>

Egy gyakori szőrnövekedési rendellenesség: az androgén alopecia

A hajciklus mechanizmusának megértése esszenciális kérdés a hajnövekedési rendellenességek megoldását illetően. Amikor szőrnövekedési rendellenességekről beszélünk alapvetően minőség- (pl. a hajszál kóros struktúrális felépítése) és mennyiségbeli eltéréseket különböztetünk meg, melyek megnyilvánulhatnak a szőrzet ritkábbá (alopécia) vagy dúsabbá (hipertrichózis és hirsutizmus) válásában is. Természetesen mindkét irányú kóros állapot komoly kozmetikai és pszichés következményekkel járhat; jelen esetben azonban főként a szőrhiányos állapotra, azaz alopeciára fókuszálunk (Kárpáti 2019). Az androgén alopecia (AGA) a férfiak kb 50%-át és a nők 15%-át érinti a 40-50 éves korosztályban, túl a 65. életéven

ez az arány 80%-ra emelkedhet. Az androgén hormonok jelenléte akár kóros, akár egészséges körülmények között, testszerte meghatározza a HF által termelt szőrszál típusát. Normál körülmények között az androgének terminális haj növekedését stimulálják mindkét nemben például férfiaknál pubertást követően a szakáll növekedése, vagy a hónalj régió nemtől függetlenül, míg bizonyos területek egyáltalán nem reagálnak ezen hormonális stimulusokra, mint pl. a szempillák vagy a fejbőr androgén-independens (pl. occipitális) régiója. A genetikailag hajlamosabb egyéneknél az androgének a fejbőr terminális hajszálainak fokozatos vellus hajjává történő tranzícióját indítják el, melynek lassan progresszív hajvesztés, azaz AGA az eredménye (Michael P. Philpott 2018) (4. ábra). Az eloszlása jellegzetes, különböző stádiumait a Norwood-Hamilton skála szerint osztályozzuk (Gupta és Mysore 2016). Megjelenését a HF-k androgén hormonokra mutatott eltérő érzékenysége magyarázza és az érintett területen a terminális haj teljes elvesztését eredményezheti (alopécia totalis). Az AGA molekuláris hátterében a TST 5- α -reduktáz (5-AR) enzim általi biológiailag aktívabb dihidrotesztoszteronná (DHT) történő konverziója áll, hiszen a DHT az androgén fázis folyamatos rövidülése mellett a telogén fázis hosszát nyújtja, valamint szerepet játszik a HF-k miniatürizációjában is. Azon férfiak esetében, ahol az 5-AR II típusának mutációja az enzim rendellenes működését idézi elő, nem alakul ki a kopaszodás, hangsúlyozva ezzel a DHT szerepét az AGA patogenezisében. Kezelése topikálisan alkalmazott Minoxidil (hajnövekedést fokozó hatását vazodilatátor hatása révén éri el, fokozva a HF-k tápanyag és oxigén ellátottságát) vagy orális Finasterid (5-AR gátló; tehát a csökkent DHT szint révén képes gátolni a HF miniatürizációját) mellett antiandrogének adásával történik (Kárpáti 2019; McNeil Products Ltd 2018; Headington 1987; Sheikh Ateeq Ahmad 2015). A sokkal kedvezőbb mellékhatás profil miatt azonban inkább az újabb topikálisan alkalmazható szerek nyújthatnak biztonságos terápiás megoldást; újabb kutatások szerint a Minoxidil és Finasterid koktél

topikális alkalmazása pozitív eredményeket hozott az AGA kezelésében (Sheikh Ateeq Ahmad 2015).

a)



b)



4. ábra: Androgén alopecia kifejeződése férfiaknál (a) és nőknél (b). Forrás: <https://www.webbeteg.hu>, <https://www.capillus.com>.

Miért releváns modell a HF szervkultúra?

Habár az elmúlt 30 évben drámaian nőttek a szőrbiológiai ismereteink, a HF funkcióját és (kór)élettanát illetően elég sok a homályos folt, ennek eredményeként pedig számos szőrnövekedési rendellenesség kezelésében hiányosságaink vannak. Nem meglepő tehát, hogy jelentősen megnőtt az igény arra, hogy a HF-k élettanába mélyebb betekintést nyerjünk, ennek következtében pedig egyre inkább felmerült az igény egy olyan modell rendszerre, mely leginkább alkalmas lehet a szőrbiológiai vizsgálatok *in vitro* elvégzésére. Ezen modell a Michael P. Philpott által megalkotott HF szervkultúra (M. P. Philpott, Green, és Kealey 1990), mely új kapukat nyitott a szőrbiológiai kutatásoknak. Sokakban felmerülhet a kérdés, hogy miért nem kínál megfelelőbb alternatívát az állatmodellek alkalmazása, hiszen potenciálisan *in vivo* képesek lehetünk nyomon követni a HF-ben végbemenő változásokat, sőt a legújabb kutatási eredmények lehetővé teszik az egérbe transzplantált humán HF-k vizsgálatát is (Gilhar és mtsai. 2016), azonban szem előtt kell tartanunk, hogy habár az egér és humán HF-k funkciójukban alapvetően hasonlítanak (azonosak a főbb sejttípusok és a hajciklus három fő fázisa [anagén, katagén, telogén]), azonban meg kell említenünk néhány lényeges fajok közötti különbséget, úgymint az anagén fázis hossza [2-3 hét vs. 4-6 év], epiteliális össejtek

karakterisztikájának különbözősége, szinkronizált [egér] és aszinkron vagy sztochasztikus [humán] fejlődési ciklusok jelenléte, eltérő válaszreakciók a hormonális behatásokra (az egér modell nem androgén-szenzitív); mindezek az egérmodellek teljes mértékben humánra vetítését nehezkesse teszik és relevanciáját megkérdőjelezzik (Oh és mtsai. 2016). Nem meglepő tehát, hogy a kozmetikai és gyógyszeripari kutatások is inkább a HF szervkultúra alkalmazását részesítik előnyben (Michael P. Philpott 2018).

Az adenzin, metabolizmusa és receptorai

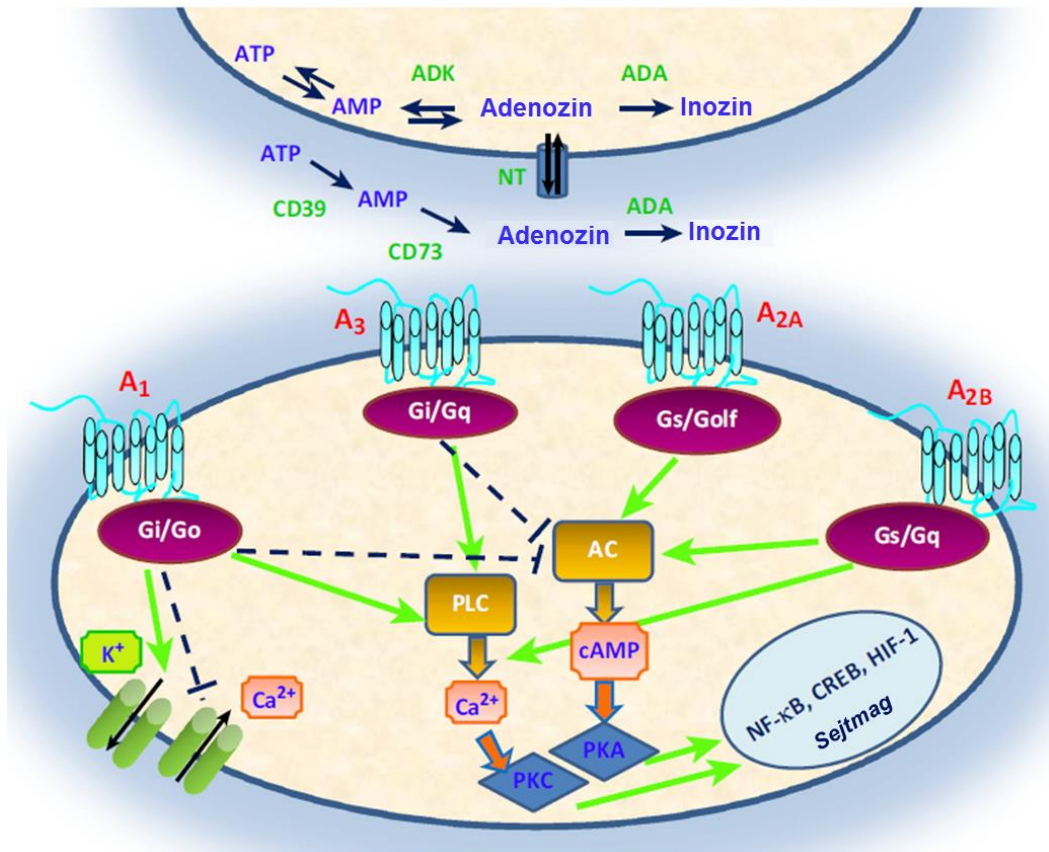
Az adenzin szervezetünk egyik legfontosabb intermedier metabolitja, leginkább a nukleinsavak és a biológiai energiaraktár adenzin-trifoszfát (ATP) építőelemeként ismert molekula (Sheth és mtsai. 2014), emellett, mint parakrin mediátor az extracelluláris térben általános celluláris protektív hatással jellemezhető, biztosítván a szövetek védelmét és regenerációját (Linden 2005). A központi idegrendszerben (KIR) számos komplex folyamat szabályozásában részt vesz; úgymint a neurotranszmitter felszabadulás (Sebastião és Ribeiro 2000), szinaptikus plaszticitás (Mendonça és Ribeiro 2001), iszkémiás neuroprotekciónak valamint az oxidatív stresszel járó (Cunha és mtsai. 2001; Ferreira és Paes-de-Carvalho 2001; Fredholm és mtsai. 2011) folyamatok. Ezen túlmenően az emberi szervezet számos szövetféleségében hatásai igen szerteágazóak: a kardiovaszkuláris rendszert illetően vazodilatátor hatást fejthet ki (Li és mtsai. 1998), emellett immunológiai hatásait tekintve részt vesz a T-sejtek proliferációjában és a citokintermelésben (Haskó és Pacher 2008), mindezek mellett gátolja a lipolízist és bronchokonstriktorként tartják számon (Bouma és mtsai. 1994; Van der Graaf és mtsai. 1999).

Forrását tekintve az adenzin származhat közvetlenül az extracelluláris térből az ektonukleozid trifoszfát-difoszfahidroláz által ATP-ből, mely folyamat során az AMP tovább hidrolizálódik adenzinná az 5'-nukleotidáz enzim segítségével vagy közvetetten az

intracelluláris téréből adenosin-monofoszfát (AMP) hidrolízise révén, ez esetben membránon keresztüli átjutását a bidirekcionális nukleozid transzporterek segítik (Borea és mtsai. 2015; Zimmermann 2000; King és mtsai. 2006). Az adenosin biológiai hozzáférhetősége függ a biológiai transzformációjától; sejten belül foszforilálódhat AMP-tá az adenosin kináz enzim által vagy metabolizálódhat inozinná az adenosin deamináz által (Borea és mtsai. 2016) (5. **ábra**). Az adenosin különböző formáinak egymásba alakulása a sejt metabolikus állapotától függően szigorú szabályozás alatt áll. Normál esetben az extracelluláris adenosin szint a nanomoláris szintet közelíti, azonban különböző stresszhatásokra (pl. hipoxia, iszkémia, epilepszia, gyulladás, fájdalom) ez a mikromoláris tartományba emelkedhet (Fredholm és mtsai. 2011).

Az extracelluláris adenosin fő molekuláris targetjei az adenosin receptorok (ADOR), melyeknek négy altípusát különíthetjük el: A_1 , A_{2A} , A_{2B} és A_3 . Ezen fehérik a G-protein kapcsolt receptorok szupercsaládjához tartoznak, molekuláris szerkezetüket tekintve jelentős hasonlóságot mutatnak 7-transzmembrán α -helikális szerkezetű doménjük, extracelluláris amino- és intracelluláris karboxi-terminusaik révén (Rosenbaum, Rasmussen, és Kobilka 2009). Szignalizációjukat tekintve az ADOR-kat tradicionálisan az adenilát-cikláz (AC) működésére gyakorolt hatásuk szerint osztályozzuk. Az A_1 és A_3 $G_{i/o}$, míg az A_{2A} , A_{2B} receptorok $G_{s/olf}$ szabályozó fehérjén keresztül gátolják illetve fokozzák az AC működését csökkentve vagy növelve ezzel a ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) szintet, mely a másodlagos jelátviteli folyamatok fontos hírvivő molekulája (Fredholm és mtsai. 2011). Emellett az A_1 és A_3 receptorok gátolják a protein kináz-A (PKA) működését, regulatórikus hatásuk van a foszfolipáz-C (PLC) működésére mediálván ezáltal az intracelluláris Ca^{2+} felszabadulást, mindezek mellett az A_1 receptoron keresztüli szignalizációnak regulatórikus hatása van a kardiális kálium és feszültség-vezérelt Ca^{2+} csatornákra. Az A_{2A} és A_{2B} receptorok aktiválják az AC-t, mely következtében emelkedett cAMP szintet eredményez, PKA és

PKC regulációja révén olyan gének transzkripcióinak szabályozására nyílik lehetőség (nukleáris faktor- κ B: NF- κ B; cAMP response element-binding protein: CREB; hypoxia indukálta faktor: HIF-1), melyek szerepet játszanak a gyulladásban illetve a sejtszintű regulációban. Emellett az A_{2B} receptor szintén képes a PLC-t aktiválni, fokozván a Ca²⁺ felszabadulást (Fredholm és mtsai. 2001; Jacobson és Gao 2006).



5. ábra: Az adenosin bioszintézisének és degradációjának, valamint az egyes AR altípusokhoz kapcsolódó másodlagos jelátviteli útvonalak sematikus áttekintése. PLC: foszfolipáz-C, AC: adenilát-cikláz, cAMP: ciklikus adenosin-monofoszfát, PKA: proteinkináz-A, PKC: proteinkináz-C, ADA: adenosin-deamináz, ADK: adenosin-kináz, CREB: cAMP response element-binding protein, HIF-1: hypoxia indukálta faktor, NF- κ B: nukleáris faktor- κ B, NT: nukleozid transzporter (Borea et al., 2016).

Az ADOR-ok kifejeződése testszerte széles körben megfigyelhető, főként a KIR-ben, azonban alapjában véve elmondhatjuk, hogy szinte minden sejtípuson expresszálódnak és pontosan ez a tulajdonság teszi őket a farmakológiai manipuláció tekintetében érdekes célponttá, hiszen az adenosin rendszer egyensúlyának megbomlása számos patológiás elváltozáshoz vezethet a metabolikus, kardiovaszkuláris és immunrendszert illetően (Faas és

mtsai. 2017; Pardo és mtsai. 2012; Peleli és Carlstrom 2017; Silva-Vilches és mtsai. 2019; Borea és mtsai. 2015).

Az A_1 receptor legjelentősebb mértékben a *cortex* neuronjain illetve a *cerebellum*ban jelenik meg, lokalizációja főként a szinaptikus régiókban figyelhető meg, ahol a neurotranszmitter felszabadulás szabályozásában játszik fontos szerepet (Cunha 2001). Az A_{2A} receptor nagy mennyiségben expresszálódik a *striátum*ban (főként a preszinaptikus régiókban, ahol a neurotranszmitter felszabadulásért felel), a vese immunsejtjein, thymusban, leukocitákban, thrombocitákban; közepes mennyiségben a szívben, tüdőben, vérerekben (Fredholm és mtsai. 2011; Fredholm és mtsai. 2001). Az A_{2B} receptor széles körben, de többnyire kis mennyiségben expresszálódnak. Habár az ADOR-ok különböző affinitást mutatnak az adenzin iránt, mégis az A_{2B} receptor a leginkább adenzin inszenzitív receptor mind a négy altípus közül, mikromoláris koncentráció tartományt igényelvén aktivációjához (Schulte és Fredholm 2003). Ilyen mértékű adenzinszint emelkedést patofiziológiás (hypoxia, iszkémia vagy gyulladás) vagy extrém fiziológiás (megerőltető testmozgás) körülmények között figyelhetünk meg, ezen esetekben az A_{2B} receptor funkcionális szerepet tölt be a megváltozott körülményekhez való szöveti adaptációban (Chen, Eltzhig, és Fredholm 2013). Az A_3 receptor kifejeződése szintén testszerte megfigyelhető, azonban legnagyobb mértékben a tüdő és máj míg alacsonyabb szinten az aorta és az agy szövetei expresszálják (Salvatore és mtsai. 1993).

Az adenzin hatása a szőrnövekedésre

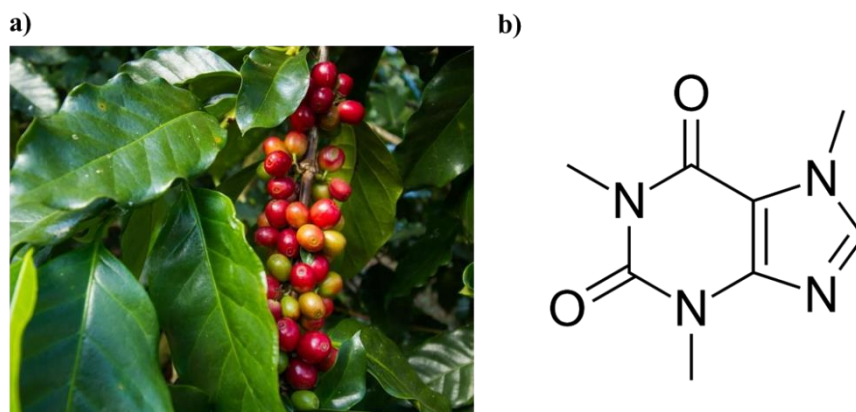
A bőrben az adenzin szintén szerteágazó reguláló funkcióval bír a (pato)fiziológiás folyamatokat illetően, úgymint a sebgyógyulás, szkleroderma, valamint a bőr immunológia és barrier formációjának tekintetében (Burnstock 2012). A bőr mélyebb rétegének esszenciális komponenseinek tekinthető dermális FB-ok esetén fokozza a kollagén termelést és fibrózist

indukáló hatással bír (Fernández és mtsai. 2013). Mindezek mellett klinikai vizsgálatok igazolják, hogy a topikális adenzin kezelés képes fokozni a hajnövekedést, még hozzá leginkább azáltal, hogy enyhíti az alopecia tüneteit, fokozván a hajszál vastagságát és az anagén fázisban lévő HF-k növekedését a japán és kaukázusi populációban egyaránt (Iwabuchi és mtsai. 2016; Watanabe és mtsai. 2015; Oura és mtsai. 2008). Emellett azt is megállapították, hogy a magas extracelluláris adenzin szint képes volt szinergizálni a minoxidil hajnövekedést fokozó hatását (Li és mtsai. 2001).

A hatásmechanizmus közvetítésében nagy valószínűséggel az ADOR-ok játszanak szerepet, jelenlétüket a bőr számos sejttípusán leírták: epidermális keratinocitákon, dermális FB-okon, és a bőrfüggelékeken is, beleértve a HF-t is (Burnstock, Knight, és Greig 2012). Japán kutatók (Iino és mtsai. 2007) demonstrálták az A_{2B} receptor jelenlétét human HF-ből izolált DP FB-okon, ahol a sejtek adenzin révén kiváltott stimulációja fokozta az FGF-7 expresszióját.

A koffein és hatásmechanizmusa

A kávé az egyik legnépszerűbb ital, melyet mi sem bizonyít jobban, minthogy napi 1,6 billió csésze kávét fogyasztanak szerte a világon (Cappelletti és mtsai. 2015). Maga a kávé szó valószínűleg a növény etiópai eredetét jelöli, a *Coffea* nemzetség jelenleg több száz fajt számlál, habár legnagyobb népszerűségnek a *Coffea Arabica* és *Coffea Robusta* fajok örvendenek. A koffein – mely több, mint 60 féle növényben található meg – nem esszenciális komponens a növény létezéshez, de peszticidként védelemet biztosít számára (Lee és Balick 2006) (**6. ábra**). Energetizáló és egyéb kedvező hatásainak köszönhetően nem csoda, hogy Etiópiából indulva gyorsan meghódította az Arab félszigetet – már a perzsa Avicenna (11. sz.) is orvosságként ír a kávéról, mely tisztítja a bőrt és kellemes illatot biztosít (Weinberg, PH.D, és Bealer 2001) – majd az egész világot.



6. ábra: Kávécserje (a) és a koffein szerkezeti képlete (b). Forrás: <https://www.growyoursecretgarden.com>, <https://en.wikipedia.org>.

A koffein töretlen népszerűsége a különböző energetizáló, ugyanakkor élvezeti szerként tekinthető kávé, tea és energitalok széleskörű fogyasztásának köszönhető. Ezen alkaloid vegyület a KIR enyhe stimulánsaként ismert, ahová a vér által jut el, a gyomorban és az intestinumban történő felszívódását követően. A májban a koffein metabolizmusát a citokróm P450 oxidáz rendszer végzi, mely három dimetilxantin végterméket eredményez: (i) paraxantint, mely fokozza a lipolízist, (ii) teobromint, mely tágítja a vérereket és (iii) teofillint, mely a hörgők simaizomzatának relaxációját idézi elő (Kerrigan és Lindsey 2005). A koffein ezen metabolitjai demetilációt és oxidációt követően xantin származékokra és húgysavra bomlanak tovább, változatlan formában mindössze 10%-a választódik ki a veséken keresztül a vizelettel (Burlando 2010). A koffein fél-életideje 2-től 12 óráig terjed emberekben, mely köszönhető az abszorpcióban és metabolizmusban bekövetkező inter-individuális különbségeknek (Garattini 1993).

A koffein hatásmechanizmusára 3 fő potenciális útvonal ismert:

1, *Adenozin receptorok blokkolása főleg a KIR-ben:* Az adenozin és koffein kémiai szerkezetét tekintve jelentős hasonlóságot mutat (Huang és mtsai. 2005), azonban a koffein főként az A_1 és A_{2A} receptorok kompetitív antagonizálása révén fejt ki hatást a neurotranszmitterek felszabadulására, fokozván ezzel a dopamin, noradrenain, acetilkolin, szerotonin és glutamát felszabadulását (Herman és Herman 2013) melyek befolyásolják a

hangulatot (Kim és mtsai. 2002), stimulálják a szervezetet, fokozzák a koncentrációs készséget miközben csökkentik a fizikai fáradtság érzetét (Trauer és mtsai. 2009).

2, *Intracelluláris Ca^{2+} felszabadítása a raktárakból*: A metilxantin származékok intracelluláris Ca^{2+} mobilizáló hatását elsőként vázizomban írták le, megfigyelések szerint a koffein elősegíti a Ca^{2+} felszabadulást a szarkoplazmatikus retikulumból és meggátolja annak visszavételét, csökkentvén ezzel a kontrakció kiváltásához szükséges küszöb potenciál értéket és fokozván a kontrakció hosszát, mely összességében fokozott izomerőt eredményez (Nehlig és mtsai. 1992; Grgic és mtsai. 2018).

3, *Foszfodiészteráz (PDE) gátlása*: A koffein a PDE non-szelektív kompetitív inhibitora (Boswell-Smith, Spina, és Page 2006), mely enzim végzi a cAMP gyűrűjének hasítását AMP képződését eredményezve. A cAMP stimulatórikus hatással bír a lipolízisre a hormonszenzitív lipáz triggerelése révén (Chesley, Hultman, és Spriet 1995) és a cAMP szint megváltozásának esszenciális szerepe van a patológiás immunológiai folyamatok kialakulásában, melyek az alopecia egyes formáiban (alopecia areata) felelősek a hajvesztésért (Ralf Paus, Nickoloff, és Ito 2005); irodalmi adatok alátámasztják, hogy ezen kóros állapotok fokozott PDE aktivitással karakterizálhatóak (Suárez-Farinas és mtsai. 2015). A PDE gátlás a PKA aktiválása révén csökkenti a gyulladáshoz vezető citokinek felszabadulását (Keren és mtsai. 2015), amely potenciális terápiás lehetőségként veti fel a PDE inhibitorok alkalmazását az alopecia egyes formáinak kezelésében.

A koffein, mint potenciális kozmetikum

Habár a koffein szervezetre kifejtett szisztémás hatásai mára elég széles körben tanulmányozottak és feltártak, a kozmetikai hatásai és az azok háttérében álló mechanizmusok még nem teljesen tisztázottak. Mivel felhasználása a különböző kozmetikai termékekben egyre növekvő népszerűségnek örvend, főként magas biológiai aktivitásának és a bőr barrier rétegén

keresztüli penetrációjának köszönhetően, fokozott érdeklődés övezi a hatásmechanizmusának felderítését is. A kozmetikai iparban a koffeint leginkább cellulit ellenes készítmények aktív hatóanyagaként használják, mivel lipolízist stimuláló hatása (PDE gátlás révén) gátolja a sejtekben a zsír felhalmozódását. Emellett fontos antioxidáns vegyület, mely segíti a sejteket az ultraviola (UV) sugárzás elleni védekezésben, és lassítja a bőr “fénykárosodás” okozta öregedését. Ezekon felül jótékony hatásait a mikrocirkuláció fokozásával éri el, serkentvén az adott terület tápanyag- és oxigén ellátását (Gherardini és mtsai. 2019).

A kozmetikumokban található, a hatást közvetítő aktív vegyületeknek a sejtek metabolizmusára és egyéb folyamataira kifejtett hatásai nagymértékben függenek az adott anyag bőr barrieren való penetrációs képességétől. Éppen ezért nagyon fontos, hogy a célmolekula kiváló penetrációs készséggel rendelkezzen. A koffein, mint a bőr penetrációs vizsgálatok gyakran használt hidrofil modell vegyülete is egyben (Kim és mtsai. 2002; Trauer és mtsai. 2009; Heard és mtsai. 2006; Shakeel and Ramadan, 2010; Trauer és mtsai. 2010), tökéletesen megfelel ezen kritériumoknak, melyet az alábbi adatok támasztanak alá: a koffein humán bőrön keresztüli maximális abszorpciós rátája $2,24 \pm 1,43 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ és a maximális abszorpció 100 perccel a topikális applikációt követően volt elérhető. 24 óra elteltével a koffein a legnagyobb koncentrációban az epidermiszben lokalizálódott ($200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), legkisebb koncentrációban pedig a dermiszben ($50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Úgy tűnik, hogy a koffein a leghatékonyabb penetrációra ún. víz az olajban nanoemulzióban képes (Shakeel és Ramadan 2010).

A koffein hatása a hajnövekedésre

A koffein szőrnövekedésre kifejtett „pozitív” hatása abban rejlik, hogy a férfias típusú hajhullásban fokozott TST szint által telogén fázisban „megragadt” HF-k újbóli anagén fázisba lépésének indukálásában játszik szerepet (Fischer, Hipler, és Elsner 2007). A HF-k különösen érzékenyen reagálnak a DHT hatásaira, ahogy azt már korábban az **Egy gyakori**

szőrnövekedési rendellenesség: az androgén alopecia c. alfejezetben említettük. A koffein gátolja az 5-AR enzim működését felszabadítva ezáltal a HF-t a kényszeredett telogén fázisban maradása alól ismételten lehetővé téve a növekedési fázisba való belépését (Fischer, Hipler, és Elsner 2007). A koffein különböző koncentrációkban alkalmazva [0,001 és 0,005 (m/v)%] a HF szignifikáns növekedését eredményezte *in vitro* HF szervkultúrában alkalmazva (Fischer, Hipler, és Elsner 2007). A hatásmechanizmus magyarázatára többféle elképzelés született. Egyrészt a koffein a PDE gátlása révén növeli a sejtek cAMP szintjét, új sejtek sokaságában fokozván ezzel a celluláris metabolizmust. Másrészt simaizom relaxáló hatása van, mely a HF közvetlen környezetében fokozott tápanyag ellátást biztosít a DP számára a vérkeringés útján. Emellett fokozza a kapilláris keringést, jobb tápanyag és oxigén ellátottságot biztosítva ezáltal a HF-nek. A rendszeres tápanyag ellátottság révén pedig gyors és látványos növekedést stimulál (Conney és mtsai. 2008). A koffein samponban való alkalmazása során (**7. ábra**) jogosan merül fel a kérdés, hogy egy hajmosás alkalmával vajon képes-e a fejbőrön keresztüli illetve intrafollikuláris penetrációra a koffein. Egyes kutatócsoportok vizsgálatai szerint mindössze 2 perc elegendő a samponnal való érintkezés során, hogy a koffein a HF-k mélyebb rétegeibe jusson és 48 órán keresztül ott is maradjon egy újonnan hajmosás ellenére is (Teichmann és mtsai. 2007; Lademann és mtsai. 2010). Otberg és munkatársai (Otberg és mtsai. 2008) megmutatták, hogy kvantitatív különbség van a follikuláris penetrációjában és interfollikuláris diffúziójában a 2,5 (m/v)% koffeint tartalmazó formulációnak, melyet kaukázusi férfiak mellkasán alkalmaztak. Amennyiben a follikulusok nyitottak voltak a topikális applikációt követően 5 perccel 3,75 ng/ml koffein koncentráció volt mérhető a vérmintákban, míg a legmagasabb koncentrációt (11,75 ng/ml) 1 órával a felvitel után sikerült elérniük. Amikor a follikulusokat lezárták (viasszal) 20 perccel az alkalmazást követően a mérhető koncentráció 2,45 ng/ml volt. A koffein HF-be való bejutásának képessége és ezáltal növekedést stimuláló hatása klinikai relevanciával bír az AGA-ban szenvedő páciensek

számára. Nem meglepő tehát, hogy egyre több tanulmány számol be a koffein hajhullást csökkentő és az alopecia progresszióját lassító valamint a hajszál erősségét (ellenállóképesség a töredezés ellen és szubjektíven megítélt hajtömeg növekedés) fokozó hatásról AGA-ban szenvedő férfi pácienseknél koffein tartalmú sampon 6 hónapon keresztül alkalmazását követően (Bussoletti és mtsai. 2010; Sisto és mtsai. 2013). A koffein Minoxidillel és azelainsavval történő kombinált alkalmazása hamarabb hozott eredményes kezelést az AGA terápiájában az önmagában Minoxidilt kapott csoporthoz képest, azonban bizonyos idő elteltével a csoportok között nem volt kimatható különbség (Golpour és mtsai. 2013).



7. ábra: Koffein tartalmú Alpecin sampon család. Forrás: <http://www.acdoco.com/alpecin>

Mindezen tulajdonságai teszik a koffeint biológiailag fontos aktív vegyületté, melyet különböző kozmetikai termékekben használnak. Az újabbnál újabb, a koffein biológiai tulajdonságaira vonatkozó felfedezések révén ezen alkaloid egyre szélesebb körben használható mind a kozmetológia, mind pedig a dermatológia területén. Ezen célból további kísérletek szükségesek a megfelelő dózis és optimális penetráció elérésének érdekében. A klinikai vizsgálatokon alapuló tudományos megfigyelések közös vonása a koffein hatására vonatkozóan, hogy mellékhatásokról egyik sem számol be (Herman és Herman 2013).

CÉLKITŰZÉS

Az adenzin és koffein szőrnővekedésben betöltött szerepe még nem teljesen tisztázott, ezért munkánk során az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Milyen potenciális szereppel bír az adenzin a humán HF-k és a HF eredetű ORS keratinociták biológiai folyamatainak szabályozásában *in vitro* és milyen receptorok mediálhatják a hatását?
2. A koffein, mint potenciális hajnövekedést indukáló természetes származék, női donoroknál is képes-e kifejteni hajciklus reguláló hatását; ezen lehetséges hatások hogyan befolyásolják a humán HF-k és a HF eredetű ORS keratinociták biológiai folyamatait férfiakban és nőkben, és milyen jelátviteli molekulák azonosíthatóak a folyamat hátterében?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Felhasznált anyagok

Kísérleteink során az alábbi ágenseket használtuk: adenzin, transzformáló növekedési faktor- $\beta 2$ (TGF $\beta 2$), CGS 15943 (nem-szelektív ADOR pán antagonist) (mind Sigma-Aldrich, St Louis, MO), koffein (Azelis, Antwerpen, Belgium), keratinocita növekedési faktor (KGF), tesztoszteron (TST), inzulin-szerű növekedési faktor-1 (IGF-1), minoxidil, isotretinoin (13cRA), anandamid (AEA) (mind Sigma-Aldrich). Az alkalmazott anyagokat a megfelelő oldószerben oldottuk: nukleáz mentes víz, abszolút etanol; dimetil-szulfoxid (DMSO), (mind Sigma-Aldrich), és a kezelések végkoncentrációjához képest 1000-szeres töménységű törzsoldatokat készítettünk, melyeket felhasználásig a gyártó által javasolt hőfokon (-20°C vagy 4°C) tároltunk. A törzsoldatokból közvetlenül a kezelések előtt készítettük el a szükséges hígításokat a sejtek tenyésztő oldatában. Ezen protokoll alól egyedül a vízben oldódó anyagok (adenozin és koffein) képeztek kivételt, mivel ezek törzsoldatait mindig felhasználás előtt frissen készítettük és nem tároltuk. A koffein kezelések során a koncentrációt minden esetben m/v%-ban tüntettük fel. Kontrollként az önmagában alkalmazott oldószer azonos hígítását használtuk.

Humán szőrtüszők izolálása, tenyésztése, elongációjának nyomon követése

A hajás fejbőr mintákat bőrgyógyászati szempontból egészséges, idegsebészeti beavatkozáson átesett önkéntesekből nyertük. A kísérletek a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával történtek (protokollszám: DE OEC RKEB/IKEB 3724-2012; ügyiratszám: IX-R-052/01396-2/2012), a Helsink Deklaráció irányelveinek betartásával. A donorok a megfelelő tájékoztatást követően írásban járultak hozzá a minták kutatási célú felhasználásához.

A HF-k izolálását és tenyésztését a Michael Philpott által kidolgozott eljárás szerint végeztük (Philpott és mtsai. 1990; Philpott és mtsai. 1994). Röviden: a hajas fejbőr feldarabolását (0,5 x 1 cm) követően, határozott vágást ejtettünk a dermo-szubkutikuláris határon és az epidermisz valamint a dermisz eltávolítását követően a HF-eket csipesz segítségével kiemeltük a szubkutiszból. Ezt követően az ép, anagén VI-os növekedési fázisban levő HF-eket hármásával tenyésztettük 5 napon keresztül 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú atmoszférában (**9/a ábra**). Az izolált HF-k fenntartása Williams' E médiumban (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, USA) történt kiegészítve 2 mM L-glutaminnal (Life Technologies), 10 ng/ml hidrokortizonnal, 10 mg/ml inzulinnal (mind Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), és antibiotikummal (Life Technologies). A tenyésztő médium cseréje minden második napon történt, míg a kezeléseket naponta végeztük, közvetlenül a tenyésztőoldathoz adva a kezelőanyagot. *Ezen munkafolyamatokban Hollósi Erika asszisztensnő (Élettani Intézet) és Einav Shirit orvostanhallgató voltak segítségemre.* A HF-k hossznövekedésének detektálását naponta végeztük egyesével, a fénymikroszkóp okulárjába épített mikrométer segítségével. Az analízis során az első nap mért hosszából kivontuk az adott napon mért hosszt, majd ezt a különbséget normalizáltuk az első napon mért értékre ($\frac{l_{1.nap} - l_{x.nap}}{l_{1.nap}} \times 100$). Az utolsó mérési napon a HF-eket kriomédiumban (Cryochrom Embedding Medium, Thermo Shandon, Pittsburg, UK) fagyasztottuk folyékony nitrogén felhasználásával. További feldolgozás céljából 6 µm-es metszeteket készítettünk, melyek tárolása -80°C-on történt. *A metszetek készítéséért köszönet illeti Furin Lilla asszisztensnőt (Élettani Intézet).*

Lübecki kollaborációs partnereink a női donorok esetén arcplasztikai műtétekből, míg a férfiak esetén elektív műtétekből származó biopsziás (0,5 x 1,5 cm) mintákat használtak, melyek kimondottan androgén-szenzitív területről származtak (*a biopsziás minták vétele Wolfgang Funk-nak és Tobias Fischer-nek köszönhető*). A férfi donorok kivétel nélkül AGA-ban szenvedtek, moderált stádiumban (Norwood-Hamilton skála szerinti III vertex és IV-es

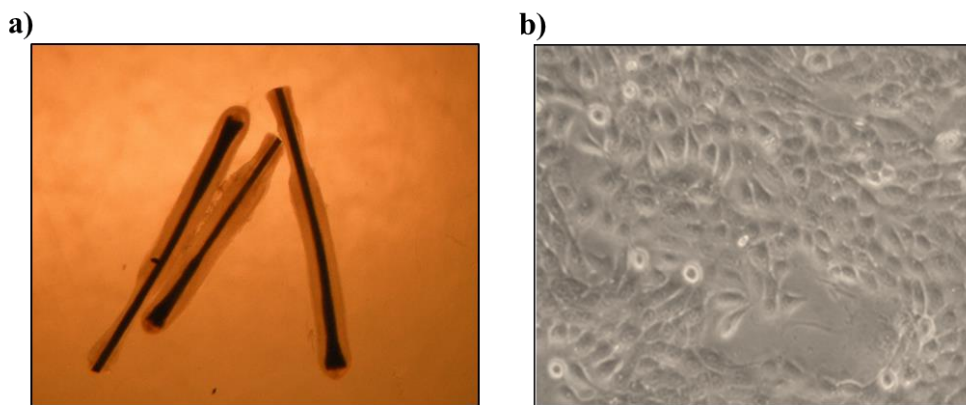
stádium) A Norwood-Hamilton skála grádusait a **8. ábra** részletezi. A kísérletek a Lübecki Egyetem Intézményi Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával történtek (engedélyszám: 06-109), a Helsinki Deklaráció irányelveinek betartásával. A donorok a megfelelő tájékoztatást követően írásban járultak hozzá a minták kutatási célú felhasználásához.



Grádus	Problémás terület
2, 2A	Hajvonal – Frontális rész
3, 3A, 3V	Hajvonal – Frontális rész – Vertex (maximum 2 cm átmérőig)
4, 4A	Hajvonal – Frontális rész – Vertex
5, 5A, 5V	Hajvonal – Frontális rész – Fejtető – Vertex
6, 7	Hajvonal – Frontális rész – Fejtető – Vertex

8. ábra: Norwood-Hamilton skála reprezentatív ábrázolása és az egyes grádusok jellemzése. Forrás: <https://hairdoctor.hu>

A HF-k izolálása az előzőekben leírtaknak megfelelően történt, majd a HF-k szérumban, szupplementált William's E médiumban regenerálódtak 24 órán keresztül. A kísérletek minden esetben ezt követően, a tápoldat lecserélésével kezdődtek, mely már tartalmazta a szükséges kezelő anyagokat. A HF-k tenyésztése és kezelése a fent leírtakkal megegyezően történt, 5 napon keresztül (*a HF-k izolálása, fenntartása és kezelése során nyújtott technikai segítségért köszönet illeti Antja Winter-Keilt*). A HF-k növekedésének nyomon követése, majd a további vizsgálatok elvégzése végett fagyasztásuk szintén a fentebbiekkel megegyezően történt.



9. ábra: HF szervkultúra (a) és ORS keratinocita sejt kultúra (b).

Humán szőrtüsző-eredetű külső gyökérhüvely keratinociták izolálása és tenyésztése

A humán hajás fejbőrrel szarmazó anagén VI-os stádiumú szőrszálakat egészséges férfiakból, tarkó és halánték tájékról nyertük, miután minden donor írásbeli hozzájárulását adta a megfelelő tájékoztatást követően. Kísérleteink a Debreceni Egyetem Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával történtek, a Helsinki Deklaráció irányelveinek betartásával.

A HF-eket, csoportonként 20-30 darabot, csipesz segítségével távolítottuk el a hajás fejbőrrel (Borbíró és mtsai. 2011; Limat és Noser 1986; Ramot és mtsai. 2018), majd Ca^{2+} - és Mg^{2+} -mentes foszfát puffer oldattal (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM foszfát, pH: 7,4; mind Sigma-Aldrich) történő alapos mosást követően 0,1% tripszin-0,2% EDTA (Life Technologies Corporation) keverékével emésztettük egy órán keresztül 37 °C-on. A sejtek leválásának mechanikai elősegítése végett vortexelést alkalmaztunk. Az emésztőoldat inaktiválása 10 (v/v)% embrionális borjuszérumot (FBS, Sigma-Aldrich) tartalmazó oldattal történt. A sejteket 1000 fordulat/perc-el centrifugáltuk 8 percen keresztül, majd az így nyert ORS keratinocitákat osztódásában gátolt (0,4 μ g/ml mitomycin-C előkezelés, 12 órán át; Sigma-Aldrich) humán dermális FB tápláló rétegre szélesztettük. Az ORS keratinociták tenyésztése Ham's F12 és Dulbecco's Modified Eagle's médiumok (mindkettő Life Technologies) 1:3 arányú keverékében történt, kiegészítve az alábbi anyagokkal: 10 (v/v)%

Fetal Clone II (HyClone, Thermo Shandon, South Logan, Utah, USA), 0,1 nM koleratoxin, 5 µg/ml inzulin, 0,4 µg/ml hidrokortizon, 2,43 µg/ml adenin, 2 nM trijód-tironin, 10 ng/ml epidermális növekedési faktor, 1 mM aszkorbil-2-foszfát, 100 IU/ml penicillin G (mind Sigma-Aldrich), valamint 25 µg/ml gentamicin (Life Technologies). A tenyésztést 5% CO₂ tartalmú, párasított légtérben, 37°C-on végeztük (**9/b ábra**). A tápoldatot kétnaponta lecseréltük, és a sejteket a 70-80%-os konfluencia szint elérésekor passzáltuk, megelőzve ezzel a tenyészetek konfluencia-indukált differenciálódását. *Az ORS keratinociták izolálásában és a tenyésztéssel kapcsolatos munkálatokban Hollósi Erika volt segítségemre.*

Sejtprolifерáció vizsgálata ORS keratinocitákon

A sejtek proliferációjának nyomon követése végett egy, a DNS tartalom meghatározásán alapuló fluoreszcens kimutatási eljárást, CyQUANT assay-t (Life Technologies) használtunk. Az ORS keratinocitákat 10 000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük osztódásukban gátolt FB tápláló rétegre (900 sejt/lyuk) 96 lyukú fekete falú, áttetsző aljú lemezekre (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország), majd elvégeztük a megfelelő kezeléseket, négy ismétléssel. Ezt követően eltávolítottuk a felülúszót, majd a lemezt -80 °C-ra helyeztük. A felolvasztást követően a gyártó protokollja szerint elkészített munkareagenssel inkubáltuk a sejteket (200 µl/lyuk) 5 percig, majd a fluoreszcencia intenzitását FlexStation II 384 spektrofluorométer (Molecular Devices, San Francisco, CA, USA) segítségével detektáltuk (excitáció/emisszió hullámhosszok: 480/520 nm), (Szabó és mtsai. 2019).

Az ORS keratinociták proliferációját nem csak nukleáris alapú fluorimetriás sejtes assay alkalmazásával vizsgáltuk, hanem elvégeztük a Ki67 proliferációs marker protein szintű kimutatást is immunfluoreszcens jelöléssel (lásd **Immunfluoreszcens jelölések** c. alfejezetben).

Apoptotikus folyamatok vizsgálata ORS keratinocitákon

Az apoptózis egyik korai jelének tekintjük a mitokondriális membrán potenciál csökkenését (Green és Reed 1998), melynek nyomon követését kísérleteink során MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit (Life Technologies) segítségével végeztünk (Tóth és mtsai. 2009; Szabó és mtsai. 2019), a gyártó utasításainak megfelelően. Az ORS keratinocitákat 10 000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük fluoreszcencia detektálásához alkalmas 96 lyukú lemezekre (fekete falú, áttetsző aljú, Greiner BioOne), melyekre előzőleg osztódásában gátolt FB-okat (900 sejt/lyuk) szélesztettünk. A kezelést követően, melynek időtartama 48 óra volt, a felülúszót eltávolítottuk, és a sejteket 30 percen keresztül inkubáltuk 37 °C-on MitoProbe™ DiIC₁(5) munkareagenssel 1:200 hígításban. A festék ebben a koncentrációban alkalmazva elsősorban az aktív membránpotenciállal rendelkező sejtek mitokondriumában akkumulálódik. Az apoptotikus folyamatok során tapasztalható mitokondriális membránpotenciál csökkenésével együtt csökken a fluoreszcencia intenzitás is, csak úgy, mint az általunk pozitív kontrollként alkalmazott TGF-β2 és AEA esetében. A fluoreszcencia detektálása a 630 nm-en történő gerjesztést követően 670 nm-en történt FlexStation II 384 készülék segítségével (Molecular Devices).

Nekrotikus folyamatok nyomon követése ORS keratinocitákon

A nekrozissal jellemezhető sejthalál detektálására SYTOX™ Green (Life Technologies) nukleinsav jelölő festéket alkalmaztunk (Tóth és mtsai. 2009; Szabó és mtsai. 2019). A festék sajátosságai közé tartozik, hogy méreténél fogva nem képes átjutni az ép sejtmembránon, ezzel ellentétben a nekrozis során dezintegrálódott membránnal rendelkező sejtekbe bejutva a nukleáris DNS-hez kötődve, jelentős fluoreszcencia intenzitásbeli növekedést eredményez (pozitív kontrollként a sejtek membránját lízis puffer alkalmazásával tettük átjárhatóvá, szabad utat adva ezzel a festéknek). Az ORS keratinociták szélesztése fluorimetriás mérésre alkalmas

96 lyukú lemezekon (Greiner BioOne) történt lyukanként 10 000 sejttel. A kezeléseket követően, 48 óra leteltével, a felülúszó eltávolítását követően a sejteket PBS-es mosásnak vetettük alá, majd 1 μ M SYTOXTM Green reagenssel inkubáltuk 30 percig 37 °C-on. A fluoreszcencia meghatározása FlexStation II 384 készülék segítségével (Molecular Devices) történt 490 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhossz mellett.

Mint láthatjuk az apoptotikus és nekrotikus folyamatok meghatározására használt módszerek azonos körülményeket kívánnak, viszont eltérő hullámhosszon gerjeszthetőek illetve detektálhatóak. Ezen tulajdonságból előnyt kovácsoltunk és a két festési eljárást szimultán alkalmaztuk.

Génexpressziós változások vizsgálata

Kísérleteink során a különböző gének expressziós változásait reverz transzkripciót követő kvantitatív, „valós idejű” polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) vizsgáltuk. Az ORS keratinocitákból TRIzol reagens segítségével izolált teljes RNS 1 μ g-jából kiindulva High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et (mind Life Technologies) alkalmazva cDNS-t állítottunk elő. A lehetséges genomi szennyezések elkerülése végett a reverz transzkripciót megelőzően minden esetben DNase I (Life Technologies) kezelést alkalmaztunk, melyet a gyártó utasításainak megfelelően hajtottunk végre. Az így előállított cDNS-ből az RT-qPCR kísérleteinket ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), valamint Stratagene MxPro3005P QPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) készülékek segítségével végeztük az 5'-nukleáz módszer felhasználásával (Borbíró és mtsai. 2011; Oláh és mtsai. 2014; Szabó és mtsai. 2019). Az adott célgének specifikus szekvenciájának amplifikációja TaqMan primerek és próbák felhasználásával történt (TaqMan Gene Expression Assay ID-k: TGF- β 2: Hs00234244_m1; IGF-1: Hs01547656_m1; ADORA1: Hs00379752_m1; ADORA2A: Hs00169123_m1; ADORA2B: Hs00386497_m1; ADORA3:

Hs00252933_m1; EGF: Hs01099999_m1); SCF: Hs00241497_m1; IGF1R: Hs00609566_m1). Belső kontrollként gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH: Hs99999905_m1), β -aktint (ACTB: Hs99999903_m1), és ciklofilin A-t (PPIA: Hs99999904_m1) alkalmaztunk. Eredményeink kiértékelése során, amennyiben a relatív génextpresszió kimutatása volt a cél, Δ CT módszert alkalmaztunk, míg a génextpresszióban bekövetkező változások kimutatásához a $\Delta\Delta$ CT módszert használtuk, mely során a relatív expressziót a belső kontrollra normalizáltuk.

A citokinfelszabadulás vizsgálata (ELISA)

Az ORS keratinociták által, különböző kezelések hatására termelt és felszabadult citokinek meghatározásához a sejtek felülűsóját összegyűjtöttük, majd a felszabadult TGF- β 2 és IGF-1 mennyiségét specifikus ELISA kitéket (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) felhasználva határoztuk meg, követve a gyártó protokollját. A gyártó által antitesttel előre bevont felületű, 96 lyukú lemezekre vittük fel a mintákat és standard-eket a megfelelő hígításban, majd két órán keresztül inkubáltuk a lemezeket, mosási lépéseket (“mosó puffer” alkalmazásával) követően hozzáadtuk a HRP (torma peroxidáz)-konjugált detekciós antitestet, amivel egy órán keresztül inkubáltunk. Ismételt mosási lépést követően hozzáadtuk a szubsztrát reagenst, majd 30 percen keresztül fénytől védett inkubációt követően a reakciót leállítottuk a “Stop puffer” (2 N H₂SO₄) hozzáadásával, majd az abszorbanciát 450 nm-en mértük a reakció leállítását követő 30 percen belül. A citokinek mennyiségét standard görbe segítségével határoztuk meg.

Immunfluoreszcens jelölések

➤ Az adenzin receptorok kimutatása

Kísérleteink során mind a négy ADOR altípus kimutatását elvégeztük HF-kön és ORS keratinocitákon egyaránt indirekt fluoreszcens immunjelölés segítségével (Borbíró és mtsai. 2011; Szabó és mtsai. 2019). A fagyasztott HF metszetek fixálása -20 °C-ra hűtött etanol-

ecetsav 2:1 arányú elegyével történt, míg az ORS keratinociták fixálást acetonnal végeztük (mind Sigma-Aldrich). Mind a HF-k, mind pedig az ORS keratinociták esetében az adott ADOR altípusra specifikus elsődleges antitesttel (1:100 hígítás minden esetben; A₁ és A_{2A} [Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság], A_{2B} és A₃ receptorok [Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael]) történő inkubálás egész éjszakán át tartott 4°C-on. PBS-el történő mosást követően a lemezeket Alexa Fluor 488 fluoreszcens festékkel konjugált kecskében termeltetett nyúl ellenes másodlagos antitesttel (1:500 hígítás; Life Technologies) végeztük szobahőmérsékleten 45 percen keresztül. A sejtmagok jelölése 4',-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Life Technologies) segítségével történt, melyet 1 µg/ml végkoncentrációban oldottunk desztillált vízben és 5 percen keresztül alkalmaztunk. Végül a metszeteink fedése Fluoromount-G médiummal történt (Southern Biotech, Birmingham, USA). Eredményeink vizualizálását Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóp (Nikon, Tokió, Japán) segítségével végeztük (Borbíró és mtsai. 2011). Az immunfestéseink specificitásának ellenőrzése az elsődleges ellenanyag elhagyásával történt. Az antitestek hígítása minden esetben speciális oldatban történt (DCS, Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Németország).

➤ **Ki67 proliferációs marker kimutatása ORS keratinocitákon**

A sejteket fedőlemezre szélesztettük, majd a megfelelő konfluencia elérését követően elvégeztük a szükséges kezeléseket. Ezt követően PBS-el mostuk, majd acetonnal (Sigma Aldrich) fixáltuk a sejteket. A fedőlemezeket egérben termeltetett Ki67 ellenes elsődleges antitesttel (1:100 DCS-ben hígítva, DAKO, Glostrup, Németország) inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán keresztül (a jelölés specificitásának ellenőrzése végett, negatív kontrollként az elsődleges antitest elhagyását alkalmaztuk). Annak érdekében, hogy az immunreaktivitást fluoreszcensen láthatóvá tegyük, PBS-el történő mosást követően, rodaminnal konjugált másodlagos antitestet (1:200 DCS-ben hígítva, BioRad, Hercules, CA, USA) alkalmaztunk egy órán keresztül. A sejtmagok festésére DAPI-t (Life Technologies) használtunk 1 µg/ml-es

koncentrációban., végül a fedés Fluoromont G-vel (Southern Biotech) történt. Eredményeink vizualizálását Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóp (Nikon, Tokió, Japán) segítségével végeztük (Borbíró és mtsai. 2011).

Hisztológia

A HF-eket a tenyésztési napok leteltét követően fagyasztó médiumba (Cryochrom embedding medium, Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA) ágyasztuk, majd folyékony nitrogén segítségével blokkokat készítettünk, melyeket -80 °C-on tároltunk a további hisztológiai vizsgálatok elvégzéséig. A kriomédiumba ágyazott HF blokkokból kriosztát (Shandon Cryotome E, Thermo Shandon) segítségével 6 µm vastagságú metszetek készültek, melyeket acetonnal fixáltunk, majd a továbbiakban hematoxilin-eozin (HE; Sigma-Aldrich) festést végeztünk a HF-k hisztomorfometriai analízisének céljából. A metszeteket desztillált vizes mosást követően hematoxillinba helyeztük 10 percre, majd 15 perces csapvizes mosást követően 1 percre 0,1%-os alkoholos Eozin oldatba merítettük, majd felszálló alkoholsorral dehidráltuk a metszeteinket és végül Eukitt médiummal (mind Sigma-Aldrich) történt a fedésük. A hajciklus különböző fázisainak elkülönítésére az irodalomban lejegyzett morfológiai kritériumok alapján történt (Klopper és mtsai. 2010; Szabó és mtsai. 2019).

Proliferáló és apoptotizáló sejtek együttes jelölése HF-kön

Annak érdekében, hogy a HF-kön végzett kezeléseink életképességre gyakorolt hatását elemezni tudjuk Ki67/TUNEL kofestést alkalmaztunk (Borbíró és mtsai. 2011; Klopper és mtsai. 2010; Szabó és mtsai. 2019). A Ki67 nukleáris antigén a sejtproliferáció egyik jellegzetes markere (Scholzen és Gerdes 2000), míg a TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) assay az apoptotizáló sejtek azonosítására szolgáló eljárás, melynek alapja a fragmentálódott DNS szálak szabad 3'-OH végeinek enzimatiszikus jelölése módosított nukleotidokkal. Kriosztát segítségével készített HF metszeteinket kettős fixálásnak vetettük alá,

elsőként 1%-os paraformaldehid oldattal (PBS-ben hígítva), majd etanol:ecetsav 2:1 arányú elegyével (mind Sigma-Aldrich). Ezt követően a gyártó utasításait követve, terminális deoxinukleotid transzferáz (TdT) enzim, valamint a digoxigeninnel jelölt nukleotidokat tartalmazó reakció puffer elegyével inkubáltuk metszeteinket 60 percen keresztül 37 °C-on (ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis detection kit; Millipore, Billerica, MA). A reakció leállítását követően Ki67 monoklonális egérben termeltetett elsődleges antitesttel (1:20 DCS-ben hígítva; Dako, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) jelöltük mintáinkat egész éjszakán keresztül 4°C-on. A következő napon a fluoreszcensen jelölt digoxigenin antitesttel inkubáltuk metszeteinket azon DNS fragmentumok jelölésére, melyek 3' hidroxil csoportjához a TdT enzim hozzákapcsolta a digoxigenin jelölt nukleotidokat. A Ki67 antitesttel jelölt sejtek láthatóvá tételének érdekében Alexa Fluor 568 kecskében termeltetett másodlagos antitestet (1:500 DCS-ben hígítva; Life Technologies) alkalmaztunk. Utolsó lépésként a sejtmagok jelölésére DAPI-t (Life Technologies) használtunk 1 µg/ml-es koncentrációban, majd a kész metszeteinket Fluoromont G-vel (Southern Biotech) fedtük le. Negatív kontroll metszeteink a TdT-enzim és Ki67 antitest elhagyásával készültek munkánk specificitásának ellenőrzése végett. Az eredményeink értékelése során a Ki67+ és TUNEL+ sejtek számát normalizáltuk az össz-sejtszámra (DAPI+).

TGF-β2 és IGF-1 immunfluoreszcencia kimutatása HF-kön

A hajciklus regulátor markerek kimutatására tiramid szubsztrát amplifikációs (TSA) módszert alkalmaztunk. A fagyasztott natív metszeteket 10 perces szobahős szárítást követően acetonnal (Sigma Aldrich) fixáltuk 10 percen keresztül -20 °C-on, majd 1×TNT pufferrel (Tris-HCl/NaCl/Tween® 20, pH 7.5; Sigma-Aldrich) mostuk háromszor. Az endogén peroxidázok gátlása érdekében 3%-os H₂O₂ -ot alkalmaztunk 15 percig, majd 1×TNT oldattal mostuk a lemezeket háromszor. Ezt követően a metszetek elő-inkubációja 30 percen keresztül – az

elsődleges antitest nem-specifikus kötőhelyeinek blokkolása érdekében – 2%-os kecske szérummal történt a TGF- β 2, míg 2%-os nyúl szérummal az IGF-1 fehérje kimutatásánál. A metszetek egy éjszakán keresztül inkubálódtak a megfelelő elsődleges antitesttel: poliklonális nyúlban termeltetett TGF- β 2 elleni immunoglobulin-G (IgG) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:4000) 2%-os kecske szérum jelenlétében vagy poliklonális kecskében termeltetett IGF-1 ellenes IgG (Santa Cruz Biotechnology; 1:500) 2%-os nyúl szérum jelenlétében. Az inkubációt követően 1×TNT pufferrel mostuk a lemezeinket, majd 2%-os kecske szérum jelenlétében jelöltük 45 percen keresztül szobahőmérsékleten a másodlagos, biotin jelölt, kecskében termeltetett nyúl-ellenes IgG-al (TGF- β 2 kimutatás) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA; 1:200), vagy 2%-os nyúl szérum jelenlétében, biotin jelölt, nyúlban termeltetett kecske-ellenes IgG-al (DAKO; 1:200) (IGF-1 kimutatás). Ezt követően a lemezeket ismét 1×TNT pufferrel mostuk és tiramid jelölést alkalmaztunk az alábbiak szerint: metszeteinket tormaperoxidáz-konjugált sztreptavidinnal jelöltük (1:100) 30 percen keresztül, ezt egy mosási lépés követte (1×TNT), majd 5 percen keresztül inkubáltuk a fluoreszcéinnel jelölt tiramid reagenssel (1:50) , TGF- β 2 jelölés esetén. Az IGF-1 kimutatása során rodamin jelölt tiramid reagenssel történt az inkubáció (1:50) (mindkét TSA rendszer Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Utolsó lépésként lemezeinket DAPI-val (1 μ l/ml) festettük és Fluoromount-G médiummal fedtük (SouthernBiotech). A fluoreszcens metszetek értékeléséhez Keyence BZ-8000 invertáló fluorescence mikroszkópot alkalmaztunk (Keyence GmbH, Neu-Isenburg, Germany).

„DP Stalk” vagy másnéven „DP szár” analízis

Ezen kvantitatív módszer azon a megfigyelésen alapszik, hogy a tenyésztett HF-k DP-jából FB-ok migrálnak a CTS proximális vége felé a katagén fázisban. Ezen sejtek jól meghatározott referencia területen belüli megszámlálása révén az anagén VI fázisú HF-kben alacsonyabb, míg

a katagén fázisban lévő folliculusok esetén magasabb értékeket kapunk (Kloepper és mtsai. 2010). Kísérleteink során a HF-eket fagyasztva metszést követően DAPI-val festettük és a DP szár területére illesztett azonos méretű négyzet által meghatározott referencia tartományon belül megszámláltuk a sejtmagokat.

Hisztomorfometriai analízis

A HF-eket fagyasztva metszést, majd HE festést követően az irodalomban jól körülhatárolt (Kloepper és mtsai. 2010; Oh és mtsai. 2016), adott hajciklus fázisra jellemző morfológiai jegyeik alapján csoportokba soroltuk (**10. ábra**). Mindezek alapján az alábbi csoportokat különítettük el: anagén, korai- közép- és késői katagén, majd a csoportok százalékos összetételét ábrázoltuk.

	Anagén VI	Korai katagén	Közép katagén	Késői katagén
Dermális papilla alakja	hagyma alak	ovális alak	kondenzált, ovális alak	kondenzált, golyó alak
Melanin tartalom	maximális melanin tartalom	melanin tartalom	melanin tartalom	melanin tartalom
Hajmátrix	vastagabb, széles átmérő	vékonyabb, keskenyebb átmérő	1-2 sejtsor vékony, epiteliális szár formálódik	epiteliális szár megnyúlik, cipzár alak
Proximális hajmátrix	zártabb	nyitottabb	nyitott	nyitott
Dermális papilla szár	sejtek elszórtan	kondenzáltabb sejtcsoportosulások	sejtek elszórtan	sejtek elszórtan

10. ábra: A különböző hajciklus fázisok elkülönítésére szolgáló morfológiai jegyek. Forrás: Prof. Dr. Ralf Paus munkacsoportjának felvételei.

Hajciklus pontszám („hair cycle score”: HCP) analízis

Ezen értékelési módszer szerint a HF-khöz egy adott értéket rendelünk, a hisztomorfometriai jegyeik alapján besorolt hajciklus fázisának megfelelően (anagén: 100;

késői anagén 200; korai katagén 300; késői katagén 400). Az így kapott értékeket összeadjuk, majd az egy kezelési csoporton belüli értékek összegét elosztjuk az elemszámmal (kontroll: n=37; tesztoszteron: n=29; tesztoszteron és koffein: n=28) (Magerl és mtsai. 2004; Fischer és mtsai. 2007).

Statisztikai analízis

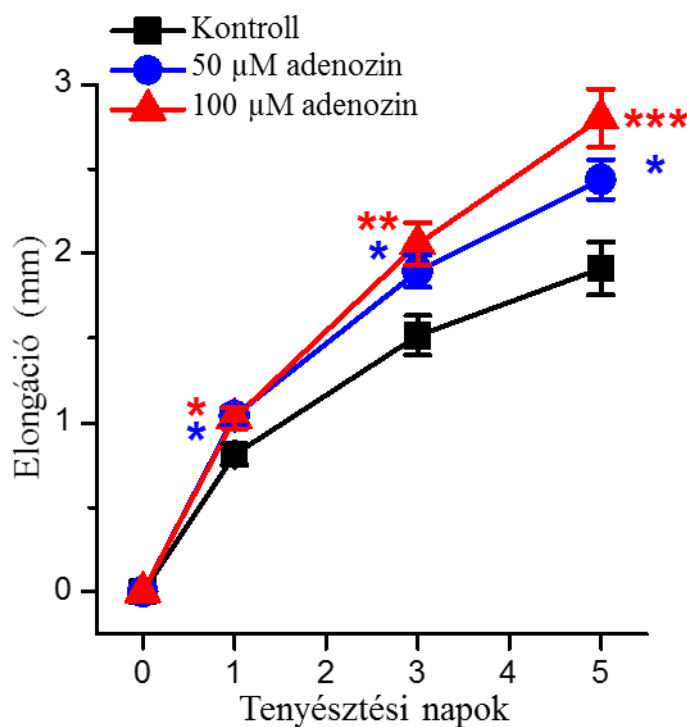
A kapott eredményeket a kontroll csoport százalékában adtuk meg. Hibasávban az eredmények standard hibájának átlagát (SEM) tüntettük fel, szintén a kontroll százalékában kifejezve. Az átlagok különbségét összetartozó minták esetén páros t – próbával, kettőnél több csoport esetén pedig egyszempontos variancia analízissel (ANOVA) vizsgáltuk, melynek során Bonferroni *post hoc* tesztet alkalmaztunk a többszörös összehasonlításra és Dunett *post hoc* tesztet használtunk, amikor a kontroll csoporthoz viszonyítottuk az eloszlást. A különböző kezelési csoportokban a HF-k eloszlását páronként vetettük össze Fisher-féle egzakt teszt alkalmazásával SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) statisztikai szoftver segítségével. Szignifikánsnak a 0,05 szignifikancia szint alatti különbségeket fogadtuk el ($p < 0,05$).

EREDMÉNYEK

1. Az adenzin hajciklusra gyakorolt hatásainak áttekintése

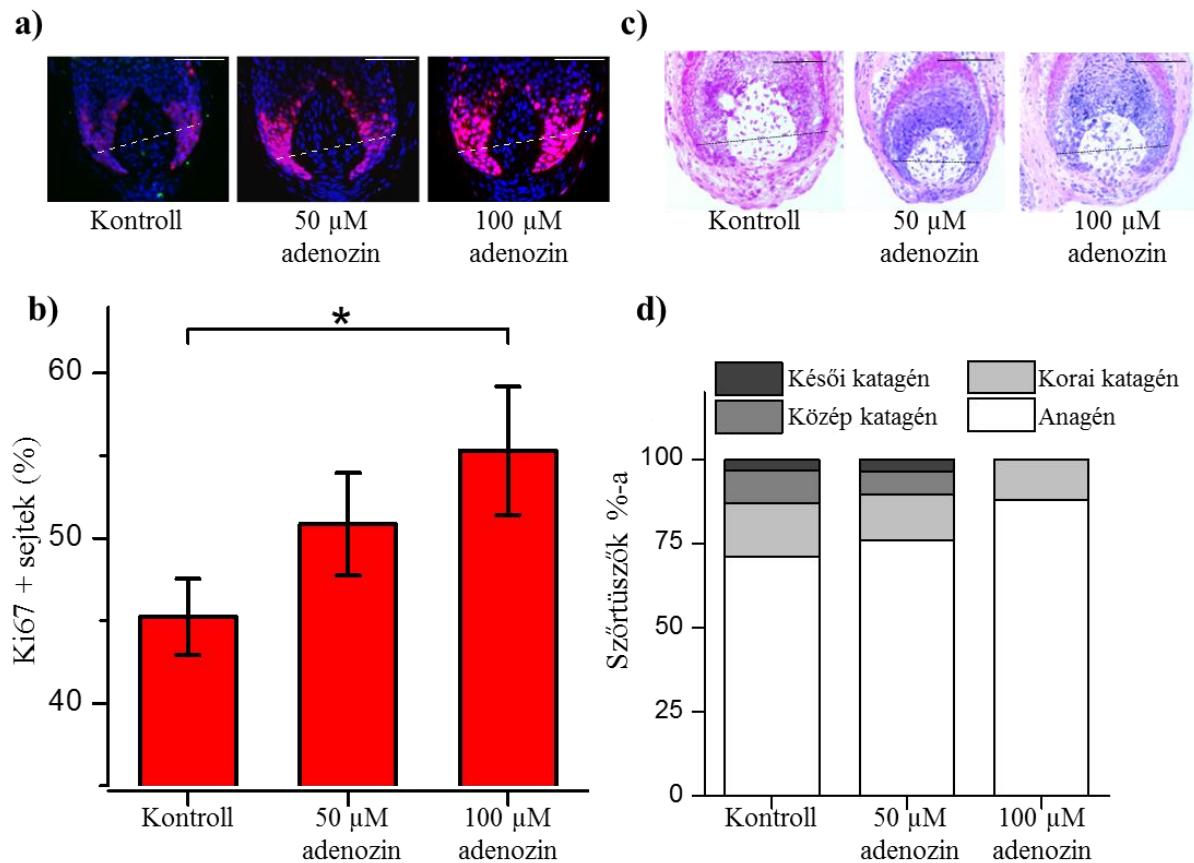
Az adenzin fokozza a HF-k növekedését, a MK-ák proliferációját és anagén fázist hosszabító hatással bír

Kísérleteink során elsőként azt vizsgáltuk, hogy az adenzin miként befolyásolja a HF-k biológiai folyamatait. Vizsgálataink során a minél nagyobb transzlációs relevancia elérése érdekében az **Anyagok és módszerek** fejezetben bemutatott módon izolált, mikrodisszektált HF szervkultúrákkal dolgoztunk. A HF-ket 50 és 100 μM adenzinnal kezeltük, majd hossznövekedésüket az első, harmadik és ötödik napon követtük nyomon. Vizsgálataink szerint a kontroll csoporthoz képest mindkét koncentrációban alkalmazva az adenzin kezelés képes volt szignifikánsan fokozni a HF-k elongációját (**11. ábra**).



11. ábra: Az adenzin fokozza a HF-k elongációját. Növekedési görbe. A HF-k 50 és 100 μM adenzin jelenlétében a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan fokozott hossznövekedést mutatnak. Átlag \pm SEM, N=36 HF/kezelési csoport, 3 független donorból. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ a kontrollhoz képest egyszempontos ANOVA és Dunnett *post hoc* teszt alkalmazásával.

A látottak háttérében álló folyamatok alaposabb megismerése érdekében a HF-eket az elongációs vizsgálatok befejeztével (5 nap után) kriomédiumba ágyasztuk, lefagyasztottuk, majd metszeteket készítettünk immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzéséhez. Látható, hogy az adenzin kezelés szignifikánsan és dóziszfüggő módon fokozta a Ki67 pozitív, proliferáló sejtek számát a HF-k bulbusában (12/a-b ábra).



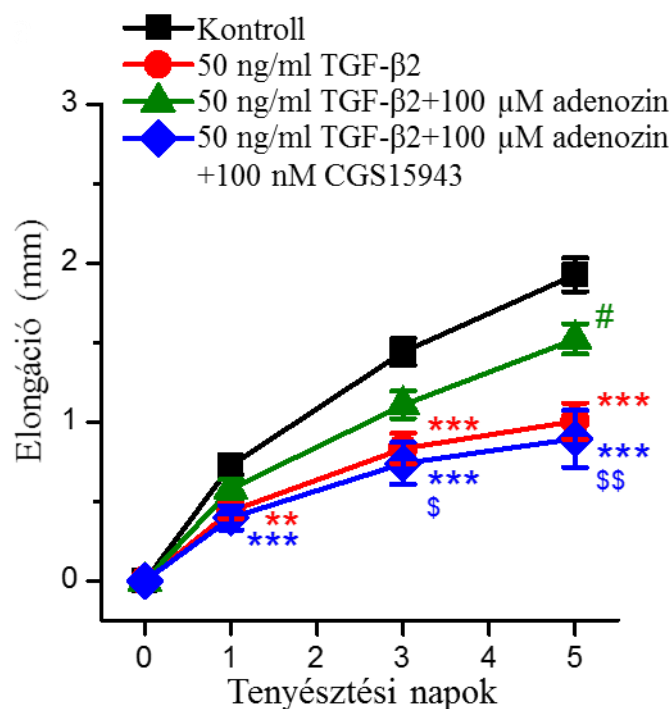
12. ábra: Az adenzin fokozza az intrafollikuláris sejtek proliferációját, és anagén fázist prolongáló hatással bír. **a)** A proliferáló (Ki67+, piros) és apoptotizáló (TUNEL+, zöld) sejtek immunjelölése adenzin kezelést követően. A sejtmagok 4',6-diamidino-2'-phenylindole-lal (DAPI) jelölve (kék). **b)** A Ki67+ sejtek össz-sejtszámra (DAPI+) vonatkoztatott százalékos aránya, átlag±SEM, N=25-31 HF/kezelési csoport 3 független donorból, *p<0,05 a jelölt csoportok között egyszempontos ANOVA és Bonferroni *post hoc* teszt alkalmazásával. **c)** Reprezentatív hisztológiai fotók demonstrálják az adenzin anagén fázist meghosszabbító hatását (HE festés). **d)** Az anagén fázisban és a katagén fázis különféle szakaszaiban lévő HF-k százalékos aránya (kvantitatív hisztomorfometriai analízis). N=25-31 HF/kezelési csoport 3 független donorból. Az **a)** és **c)** panelen szaggatott egyenes jelöli a kvantifikálás szempontjából fontos Auber vonalat, azaz a bulbus legszélesebb horizontális átmérőjét. A méretvonalak minden esetben 50 μm-es távolságot jelölnek.

Következő lépésként elvégeztük a HF-kből készült metszetek hematoxilin-eozin (HE) festését követő hisztomorfometriai analízisét (12/c ábra). A fentiekkel jó összhangban azt tapasztaltuk, hogy a 100 μM koncentrációban alkalmazott adenzin kezelés hatására a HF-k nagyobb arányban maradtak anagén fázisban, azaz gátlódott a katagén fázisba történő átmenetük (12/d ábra). Érdekes módon, a katagén follikulusok aránya az 5 napos kezelést

követően relatíve alacsony maradt a kontroll csoportban (kb. 25%), és ennek megfelelően az adozin kezelés még ehhez képest is tovább csökkentette a katagén fázisban lévő HF-k arányát. Éppen ezért a továbbiakban az adozin katagén fázist gátló és egyúttal proliferációt elősegítő hatását vizsgáltuk a jól ismert katagén-induktor TGF- β 2 jelenlétében (Langan és mtsai. 2015).

Az adozin kivédi a TGF- β 2 katagén-indukáló hatását

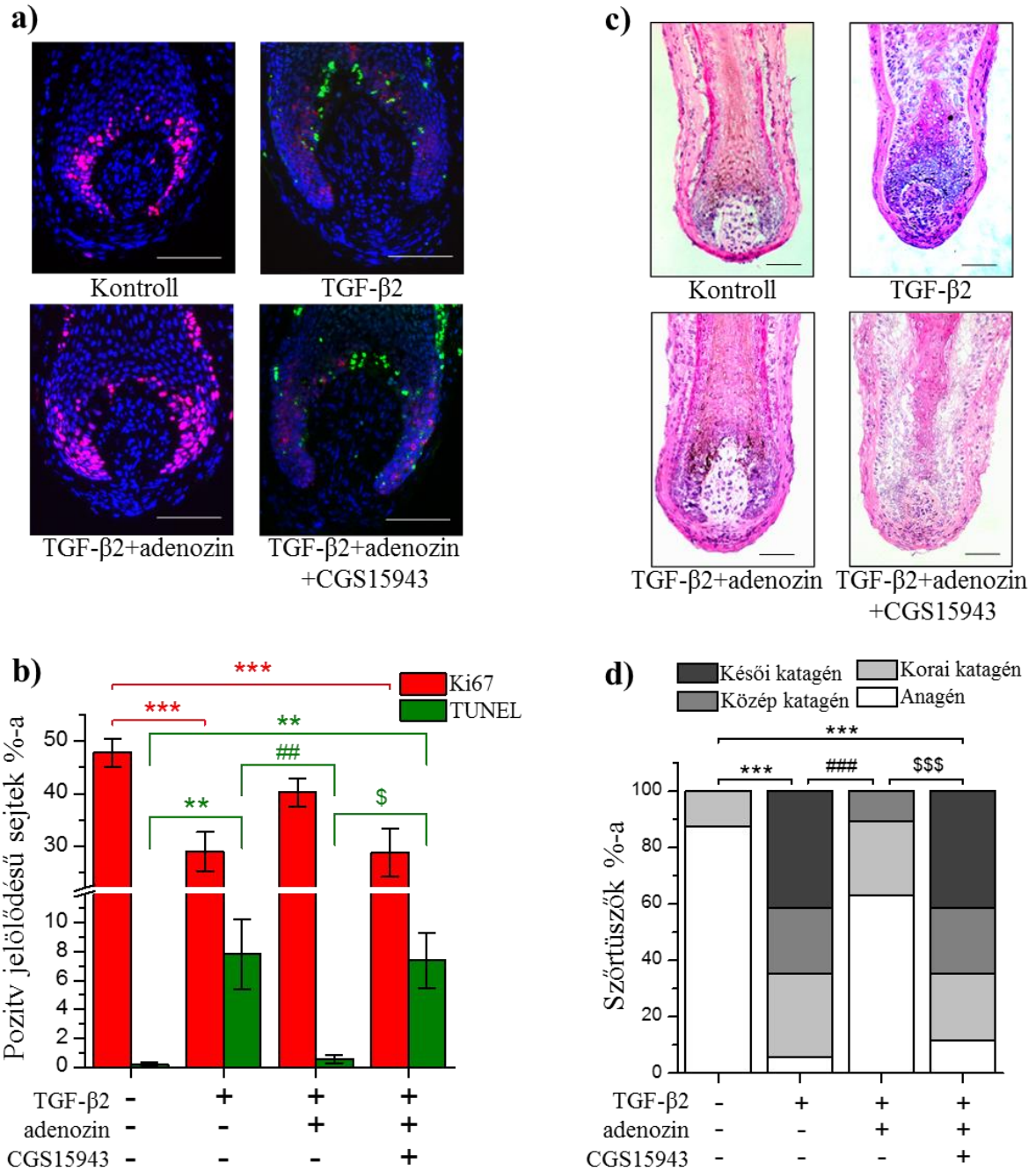
Kísérleteink során elsőként a folliculusok hossznövekedését vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy – az irodalmi adatokkal (Soma, Tsuji, és Hibino 2002) összhangban – az önmagában alkalmazott TGF- β 2 szignifikánsan csökkentette a HF-k elongációját, 100 μ M koncentrációjú adozin szimultán alkalmazása azonban képes volt kivédeni ezt a gátló hatást (**13. ábra**). Annak érdekében, hogy meggyőződjünk az adozin hatásának specifikusságáról, a kísérletet elvégeztük az általános ADOR antagonistá CGS15943 jelenlétében is, és azt tapasztaltuk, hogy ebben az esetben az adozin hatástalannak bizonyult.



13. ábra: Az adozin képes kivédeni a TGF- β 2 HF növekedést gátló hatását. HF növekedési görbék. A HF-eket az ábrán jelzettek szerint kezeltük, kontrollként pedig a kezelőanyagok oldószereit alkalmaztuk. Átlag \pm SEM, N=28-29 HF/kezelési csoport 3 független donorból. * p <0,05, ** p <0,01, illetve *** p <0,001 a kontrollhoz képest, # p <0,05, ## p <0,01, illetve ### p <0,001 a kizárólag TGF- β 2-vel kezelt csoporthoz viszonyítva és \$ p <0,05, \$\$ p <0,01 és \$\$\$ p <0,001 a TGF- β 2 és adozin kombinációjával kezelt csoporthoz képest (egyszempontos ANOVA Bonferroni *post hoc* teszt alkalmazásával).

A továbbiakban a fentebb ismertetett Ki67-TUNEL immunhisztokémiai technikát alkalmazva elemeztük a proliferáló és apoptotizáló sejtek arányát. Elongációs kísérleteinkkel jó összhangban azt tapasztaltuk, hogy a kontroll metszetekhez képest a TGF- β 2-vel kezelt csoportban jelentősen megnőtt az apoptotizáló sejtek aránya (**14/a** ábra), ezzel párhuzamosan pedig a Ki67 pozitív, azaz proliferáló sejtek száma csökkenést mutatott. Az adenzin alkalmazása ezt a hatást kivédte, hiszen - ahogyan az a **14/b** ábrán is jól követhető - az adenzinnal és TGF- β 2-vel egyidejűleg kezelt HF-*knél* a kontroll csoporthoz képest nem látunk jelentős változást a Ki67 pozitivitást mutató sejtek arányában, azonban a TGF- β 2-vel önmagában kezelt csoporthoz képest ezen kezelés szignifikáns csökkenést eredményezett a TUNEL pozitív sejtek százalékos arányában. A látott hatás adenzin receptor-függőnek bizonyult, hiszen a *pán*-antagonista CGS15943 teljes mértékben blokkolta az adenzin TGF- β 2-vel szemben kialakuló protektív hatását.

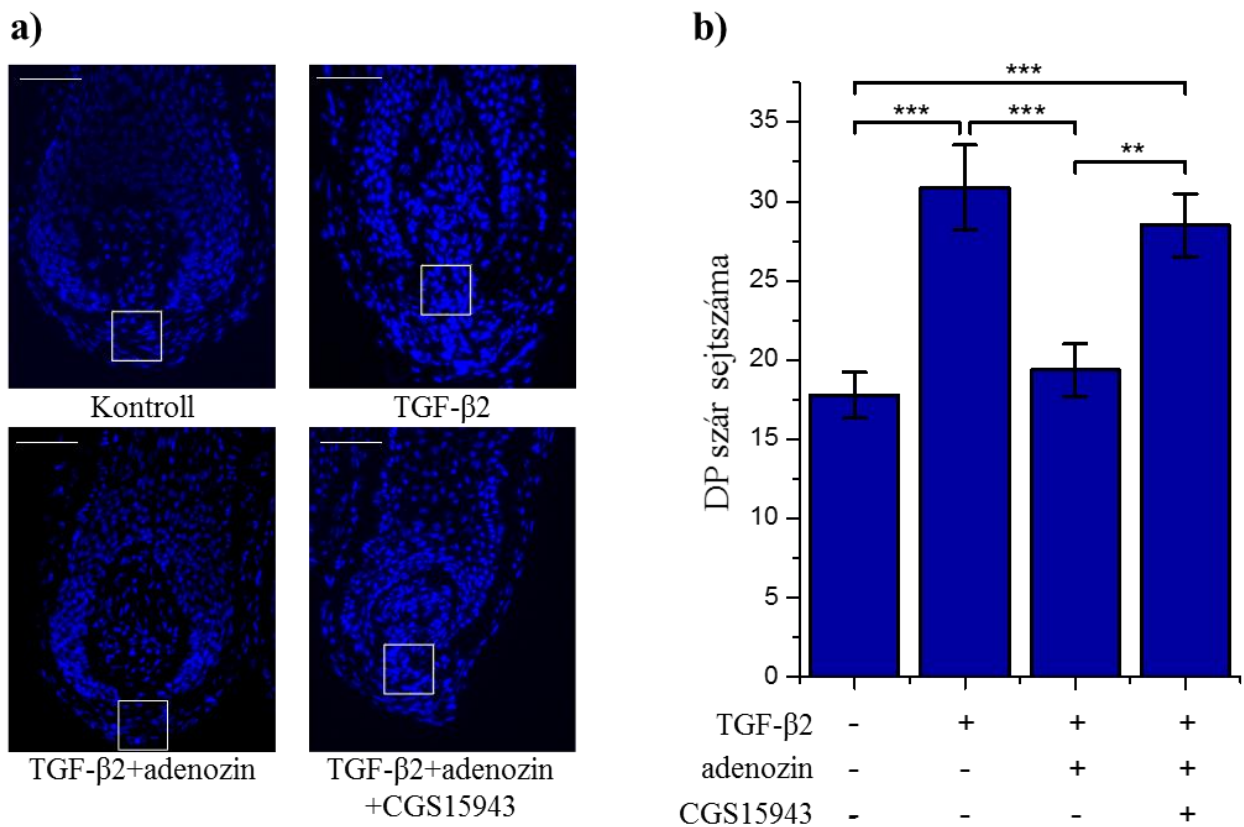
A következőkben hisztomorfometriai hajciklus analízis elvégzésével vizsgáltuk tovább az adenzin hatásait (Klopper és mtsai. 2010). A **14/c** és **d ábrák** tanúsága szerint a TGF- β 2 önmagában történő alkalmazásával jelentős katagén tranzíciót sikerült kiváltanunk, azaz a kontroll csoporthoz képest növekedett a korai-, közép- és késői katagén fázisban lévő follikulusok aránya. Az adenzin képes volt szignifikáns mértékben csökkenteni a TGF- β 2 hatását mind a közép- mind pedig a késői katagén fázisban lévő HF-*k* esetén, mindemellett fokozta (pontosabban megközelítőleg a kontroll szintjén tartotta) az anagén és korai katagén fázisú follikulusok arányát. A CGS15943 itt is felfüggesztette az adenzin hatását, hiszen a HF-*k* százalékos eloszlása szinte teljes mértékben megegyezik a kizárólag TGF- β 2-vel kezelt csoport esetén látottakkal. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy az adenzin, valamint tágabb értelemben az adenzin receptorokon keresztüli szignalizáció, a katagén fázis kialakulásának meggátolásával és az anagén hajciklus fázis fenntartásával szerepet játszik a szörnövekedés szabályozásában.



14. ábra: Az adenzin kivédi a TGF-β2 katagén indukáló hatását humán HF-kön. **a)** Kettős immunjelölés a proliferáló (Ki67+, piros) és apoptotizáló (TUNEL+, zöld) sejtek kimutatására. A sejtmagokat DAPI-val (kék) tettük láthatóvá. A reprezentatív ábrák demonstrálják a különböző kezelésekre hatását. **b)** A proliferáló és apoptotizáló sejtek statisztikai analízise (Ki67/TUNEL kettős jelölés; a DAPI+ sejtek %-ára vonatkoztatva). Átlag±SEM, N=16-24 HF/kezelési csoport 3 független donorból. **c)** Reprezentatív HE festés, mely demonstrálja a kezelésekre hatására a HF morfológiájában bekövetkező változásokat. **d)** Az anagén és katagén fázisban lévő HF-k kvantitatív hajciklus analízise a HE festés alapján. N=17-24 HF/kezelési csoport 3 független donorból. *p<0,05; **p<0,01 és ***p<0,001 a kontrollhoz képest, #p<0,05; ##p<0,01 és ###p<0,001 a kizárólag TGF-β2 kezelt csoporthoz viszonyítva és \$p<0,05; \$\$p<0,01 és \$\$\$p<0,001 a TGF-β2-vel és adenzinnal kezelt csoporthoz képest. A statisztikai elemzéshez egyszempontos ANOVA-t és Bonferroni *post hoc* tesztet (**b** panel), illetve páronként Fisher-féle egzakt tesztet (**d** panel) használtunk. Méretvonal: 50 µm. TGF-β2: 50 ng/ml; adenzin: 100 µM; CGS15943: 100 nM.

Eredményeink további megerősítése végett elvégeztük a HF-k úgynevezett „DP stalk” („DP szár”) analízisét, mely azon a megfigyelésen alapszik, hogy a tenyésztett HF-k DP-jából

FB-ok migrálnak a CTS proximális vége felé a katagén fázisban. Ezen sejtek jól meghatározott referencia területen belüli megszámlálása révén (15. ábra) az anagén VI fázisú HF-kben alacsonyabb, míg a katagén fázisban lévő folliculusok esetén magasabb értékeket kapunk (Kloepper és mtsai. 2010). Az elvégzett DP szár analízis eredménye az eddigiekkel összhangban azt mutatta, hogy adenozin kezelés hatékonyan (és ADOR függő módon) ellensúlyozta a TGF- β 2 katagén indukciós hatását (15. ábra).



15. ábra: Az adenozin kivédi a TGF- β 2 katagén indukáló hatását. **a)** Reprezentatív képek illusztrálják a DP szár analízis során kiválasztott területet, ahol megszámláltuk a DAPI+ sejtmagokat. A katagén fázisban lévő HF-knél lényegesen több sejtmag látható az anagén fázisú HF-khöz képest. **b)** A DP szár referencia területén számolt sejtek kvantitatív analízise. Átlag \pm SEM, N=17-24 HF/kezelési csoport, 3 független donorból. * p <0,05; ** p <0,01 és *** p <0,001 a jelölések szerint egyszempontú ANOVA és Bonferroni *post hoc* teszt alkalmazásával.

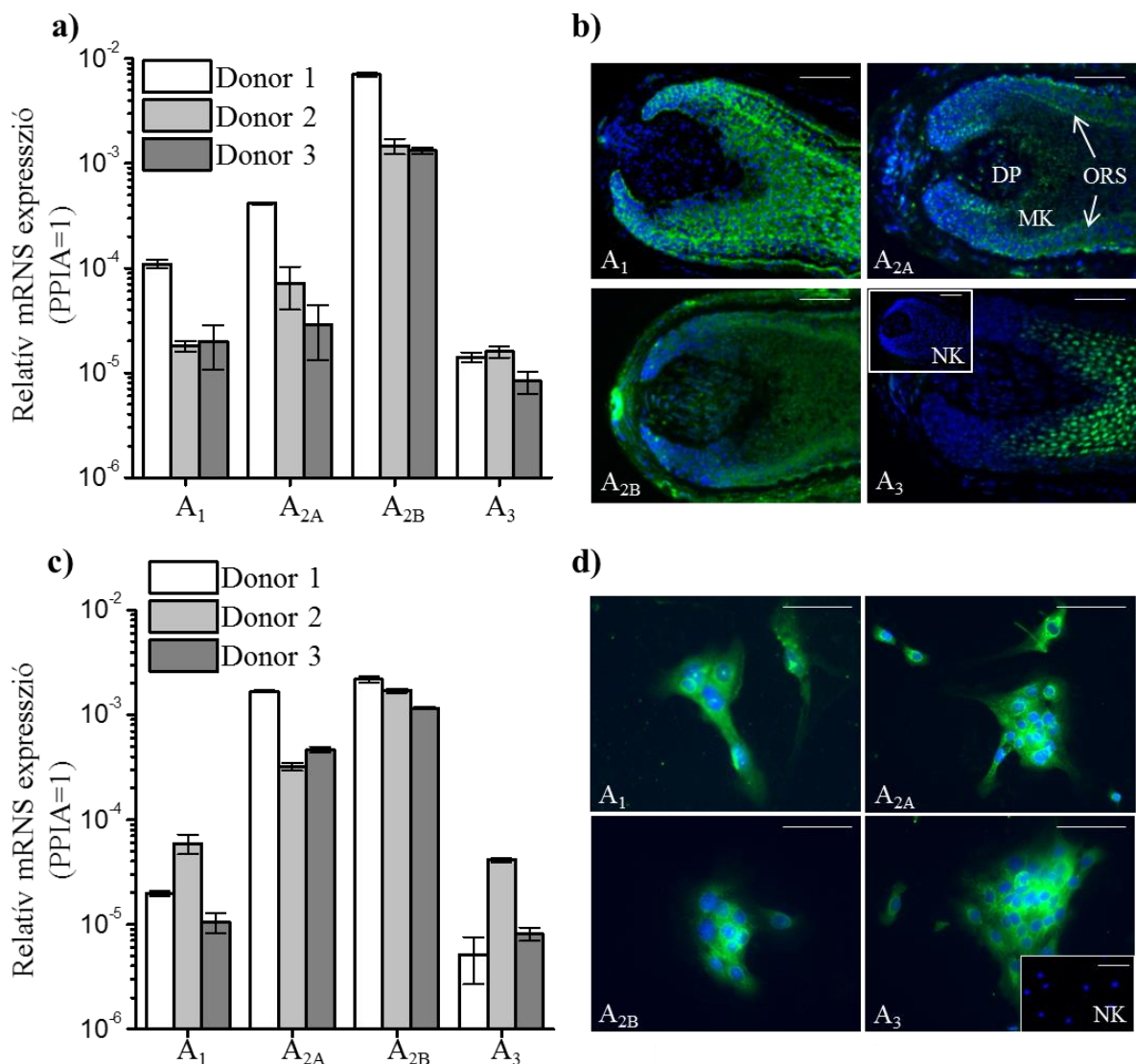
A HF-k és az ORS keratinociták egyaránt kifejezik az adenozin receptor izoformákat

A háttérben zajló szignalizációs folyamatok alaposabb felderítése érdekében megvizsgáltuk az egyes ADOR altípusok kifejeződését humán HF-kön. Az anagén folliculusokból teljes mRNS izolálását követő reverz transzkripció során három különböző

donorból állítottunk elő cDNS-t. Ezt követően Q-PCR technika alkalmazásával kimutattuk, hogy mind a négy ADOR altípus (A_1 , A_{2A} , A_{2B} és A_3) kifejeződik HF-kön (**16/a ábra**), és közülük (legalábbis mRNS szinten) az A_{2B} a domináns izoforma.

Annak érdekében, hogy az ADOR-ok protein szintű jelenlétéről és lokalizációjáról pontosabb információt szerezzünk, humán anagén HF-kből fagyasztva metszés során nyert metszeteinken immunhisztokémiai kimutatást végeztünk (**16/b ábra**). Megállapítottuk, hogy – bár a különböző receptor altípusok eltérő expressziós mintázatot mutatnak - mind a négy receptor kifejeződik fehérje szinten humán HF-kön. Az A_1 receptor kifejeződése diffúz expressziós mintázatot mutat a mátrix- és ORS keratinocitákon. Az A_{2A} receptor szintén az ORS rétegben, a DP sejteken, valamint az IRS keratinociták rétegében figyelhető meg. Az A_{2B} izoforma kifejeződése leginkább az ORS keratinociták rétegére lokalizálódik, valamint felfedezhető a DP-ban is néhány pozitivitást mutató sejt, ahogyan azt már korábbi irodalmi adatok is demonstrálják (Iino és mtsai. 2007). Végezetül az A_3 receptor jelenléte a MK-ák disztális régiójában figyelhető meg, valamint csökkent jelintenzitással ugyan, de az ORS keratinociták rétegében is kimutatható.

Mivel az ORS keratinociták rétege minden adozin receptor izotípus kifejeződésének tekintetében pozitivitást mutatott, és ezen sejtek fontos szerepet töltenek be a hajciklus szabályozásában, hiszen különböző mediátorok termelésével képesek a hajciklust mind pozitív (IGF-1, SCF) (Langan és mtsai. 2015; Liao és mtsai. 2017) mind pedig negatív (TGF- β 2, EGF) (Soma és mtsai. 2002; Szabó és mtsai. 2019; Bodó és mtsai. 2005) irányban befolyásolni, vizsgálatainkat HF-kből izolált primer ORS keratinocita tenyészeteken folytattuk tovább.



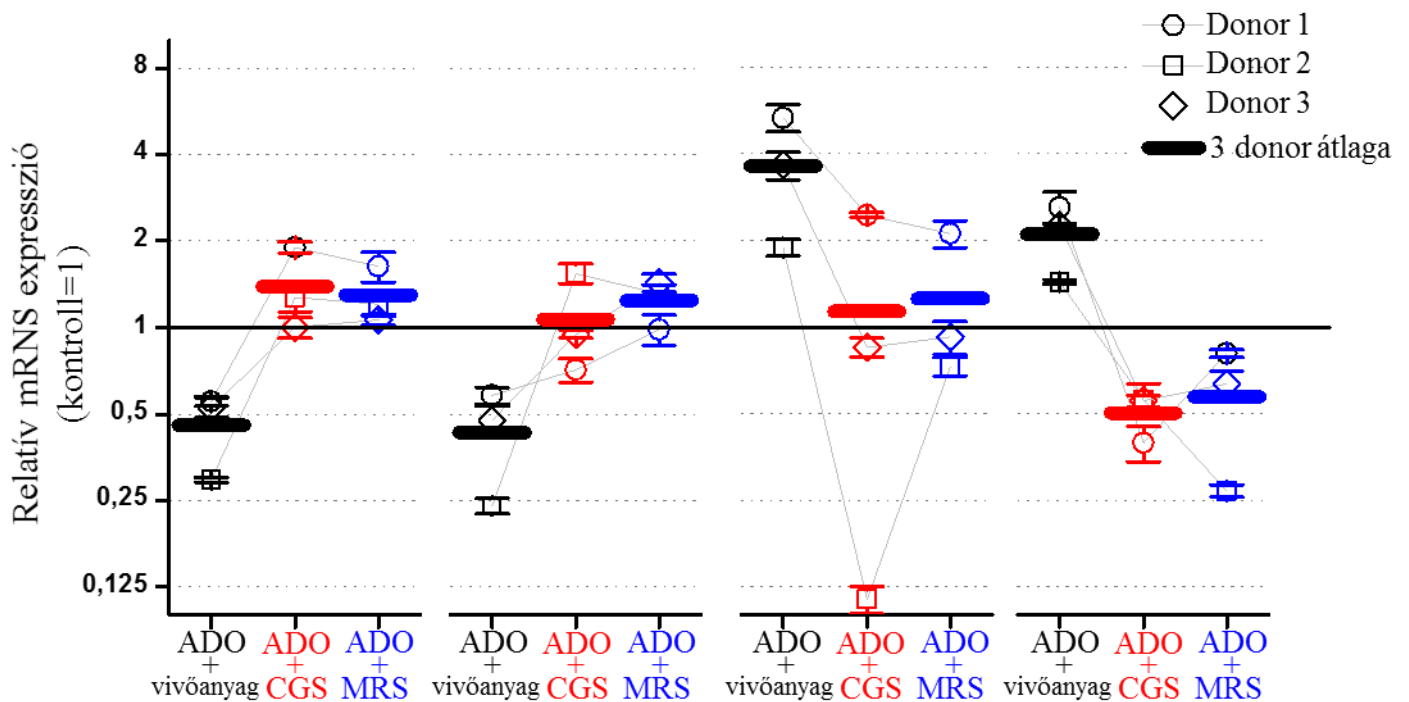
16. ábra: Az adenosin receptorok expressziójának kimutatása HF-kön és ORS keratinocitákon. **a)** Az adenosin receptor altípusok kimutatása HF-kön RT-qPCR technika alkalmazásával, 3 független donorból, átlag±SEM. Az adatok normalizálásánál a ciklofilin A-t (PPIA) alkalmaztuk belső kontrollként. **b)** Az adenosin receptor izoformák immunhisztokémiai jelölése specifikus elsődleges antitest alkalmazását követően FITC konjugált másodlagos antitesttel történt (zöld fluoreszcencia), a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá (kék fluoreszcencia). Méretvonal 50 µm. DP: dermális papilla; MK: mátrix keratinociták; ORS: külső gyökérhüvely; inzert: negatív kontroll (NK). **c)** ORS keratinocitákon a különböző adenosin receptor izoformák kimutatása RT-qPCR segítségével, 3 független donorból; átlag±SEM. Belső kontrollként ciklofilin A-t használtunk. **d)** Az adenosin receptorok immuncitokémiával történő kimutatása ORS keratinocitákon (FITC, zöld fluoreszcencia), a sejtmagokat DAPI-val vizualizáltuk (kék jelölés). Méretvonal 10 µm; inzert: negatív kontroll (NK).

Korábbi, HF-kön végzett kísérleteinkkel teljes összhangban azt találtuk, hogy mind a négy ADOR izoforma expressziója kimutatható primer humán ORS keratinocitákon mind mRNS (RT-qPCR) - A_{2B} receptor dominanciával, mind pedig fehérje (immunfluoreszcens jelölés) szinten (**16/c-d ábra**).

Az adenzin lehetséges hatásmechanizmusának vizsgálata

Miután eddigi kísérleteink meggyőzően demonstrálták az adenzin hajciklusra gyakorolt hatását fontosnak tartottuk, hogy betekintést nyerhessünk a háttérben meghúzódó hatásmechanizmusba. Kísérleteinket izolált ORS keratinocita sejt kultúrákon folytattuk, mivel ezen sejtek a számos pozitív és negatív regulátor termelése révén fontos szereppel bírnak a hajciklus szabályozásában (Stenn és Paus 2001; Ralf Paus és mtsai. 2014). A három különböző donorból származó ORS sejteket adenzinnal kezeltük CGS15943-mal (ADOR pán-antagonista) vagy MRS1754-gyel (szelektív A_{2B} antagonista) kombináltan. Ezt követően RT-qPCR technika alkalmazásával vizsgáltuk egyes negatív, illetve pozitív hajciklus regulátor génekre gyakorolt hatását a fent említett kezeléseknél. Amint az a **17. ábrán** is látható, az adenzin csökkentette a katagén induktor TGF- β 2 és az epidermális növekedési faktor (EGF) expresszióját (Soma és mtsai. 2002; Hansen és mtsai. 1997), míg az anagén fázist fenntartó és pigmentációt fokozó őssejt faktor (SCF), illetve az inzulin-szerű növekedési faktor-1 receptor (IGF1R) (Langan és mtsai. 2015; Liao és mtsai. 2017) expressziója növekedést mutatott. Ezen eredmények jó összhangban vannak a korábban tapasztaltakkal, és bepillantást engednek azon komplex folyamatokba, amelyek az adenzin-kezelés hajciklusra gyakorolt hatásainak kialakulásához vezetnek. Fontos kiemelni, hogy az adenzinnal egyidejűleg alkalmazott pán-antagonista CGS15943 képes volt ezt kivédeni, tehát az adenzin által kiváltott expressziós változások adenzinreceptor-függő módon alakultak ki. Tekintettel arra, hogy az adenzin receptorok közül az A_{2B} mutatta a legmagasabb mRNS-szintű expressziót, kísérleteinket a szelektív A_{2B} receptor antagonista MRS1754 jelenlétében is elvégeztük, és azt tapasztaltuk, hogy az expressziós változások az előzőleg bemutatott, CGS15943 jelenlétében tapasztalt

változásokat követik, mely nagymértékben valószínűsíti, hogy az adozin esetünkben A_{2B} receptoron keresztül fejti ki hatását.



17. ábra: Az adozin kezelés A_{2B} receptor függő módon „pro-anagén” irányba hangolja több hajciklus regulátor mRNS-szintű kifejeződését ORS keratinocitákon. a) Az ORS keratinocitákat 3 független donorból történő izolálást követően tenyésztettük, majd az ábrán jelzett kombinációkban kezeltük 100 μ M adozin (ADO), valamint az általános adozin receptor antagonistá CGS15943 (CGS, 100 nM), illetve a A_{2B} szelektív blokkoló MRS1754 (MRS, 10 nM) jelenlétében 3 órán keresztül. A relatív génexpressziót a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva adtuk meg (melyet az ábrán vízszintes fekete vonal jelöl) átlag \pm SEM értékeket megjelenítve donoronként, míg belső kontrollként szintén a PPIA-t alkalmaztuk. TGF- β 2: transzformáló növekedési faktor- β 2 (pro-katagén), EGF: epidermális növekedési faktor (pro-katagén), SCF: össejt faktor (pro-anagén), IGF1R: inzulin-szerű növekedési faktor-1 receptor (pro-anagén).

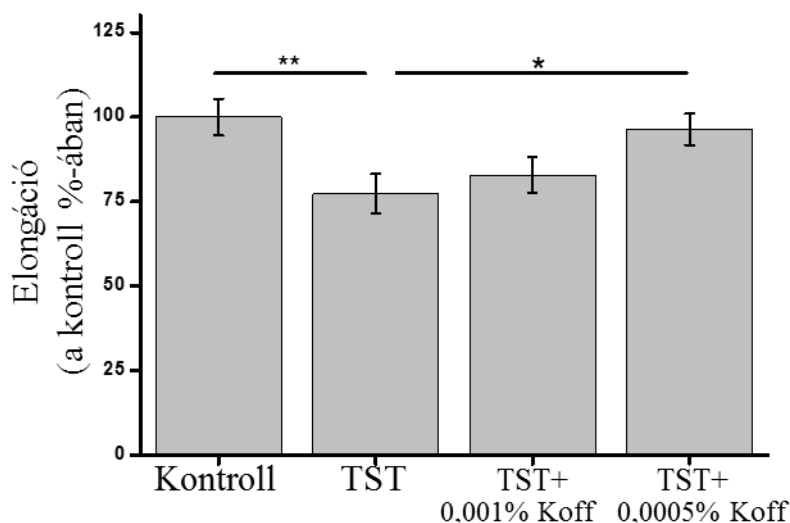
A fentiek egyértelműen arra utalnak, hogy az adozin fontos szerepet tölthet be a humán hajciklus szabályozásában. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a hatás kifejlődésében az ORS keratinocitákon kifejeződő ADOR-okon (és közöttük is a domináns A_{2B} izoformán) keresztüli jelátvitel, illetve a pozitív és negatív hajciklus-regulátorok expressziós mintázatának következményes „pro-anagén” irányú változása fontos szerepet játszhatnak a hajciklus szabályozásában.

2. A koffein hajciklusra gyakorolt hatásainak vizsgálata

A humán női és férfi HF-k eltérően reagálnak a koffein stimulációra

Korábbi, társzerzőink által végzett kísérletek már beszámoltak a koffein hatásáról: TST-al együttesen alkalmazva képes volt felfüggeszteni a TST HF-kre kifejtett szőrnövekedést gátló és MK-kra gyakorolt anti-proliferatív hatását humán férfi donorokból származó HF szervkultúrában (Fischer, Hipler, és Elsner 2007).

Jelen kísérleteink szintén megerősítették ezt a jelenséget férfi donorokból származó HF-k esetében, de tekintettel arra, hogy a szőrnövekedés zavaraival járó problémák nemcsak a férfiakat érintik, kísérleteinket női donorok bevonásával egészítettük ki. Vizsgálataink során mikrodisszektált HF szervkultúrákon alkalmaztunk TST kezelést önmagában, illetve különböző koncentrációjú koffeinnel kombináltan, majd a hosszúnövekedést az 5. napon mért értékeknek megfelelően ábrázoltuk. Eredményeink szerint (**18. ábra**) a TST csökkentette a HF-k elongációját és az alacsonyabb koncentrációban alkalmazott koffein kezelés ezt szignifikáns mértékben képes volt ellensúlyozni. Megfigyeléseink alapján a női donorokból származó HF-k érzékenyebben reagáltak az alkalmazott koffein dózissra, hiszen már alacsonyabb koncentrációban alkalmazva hatásosnak bizonyult.

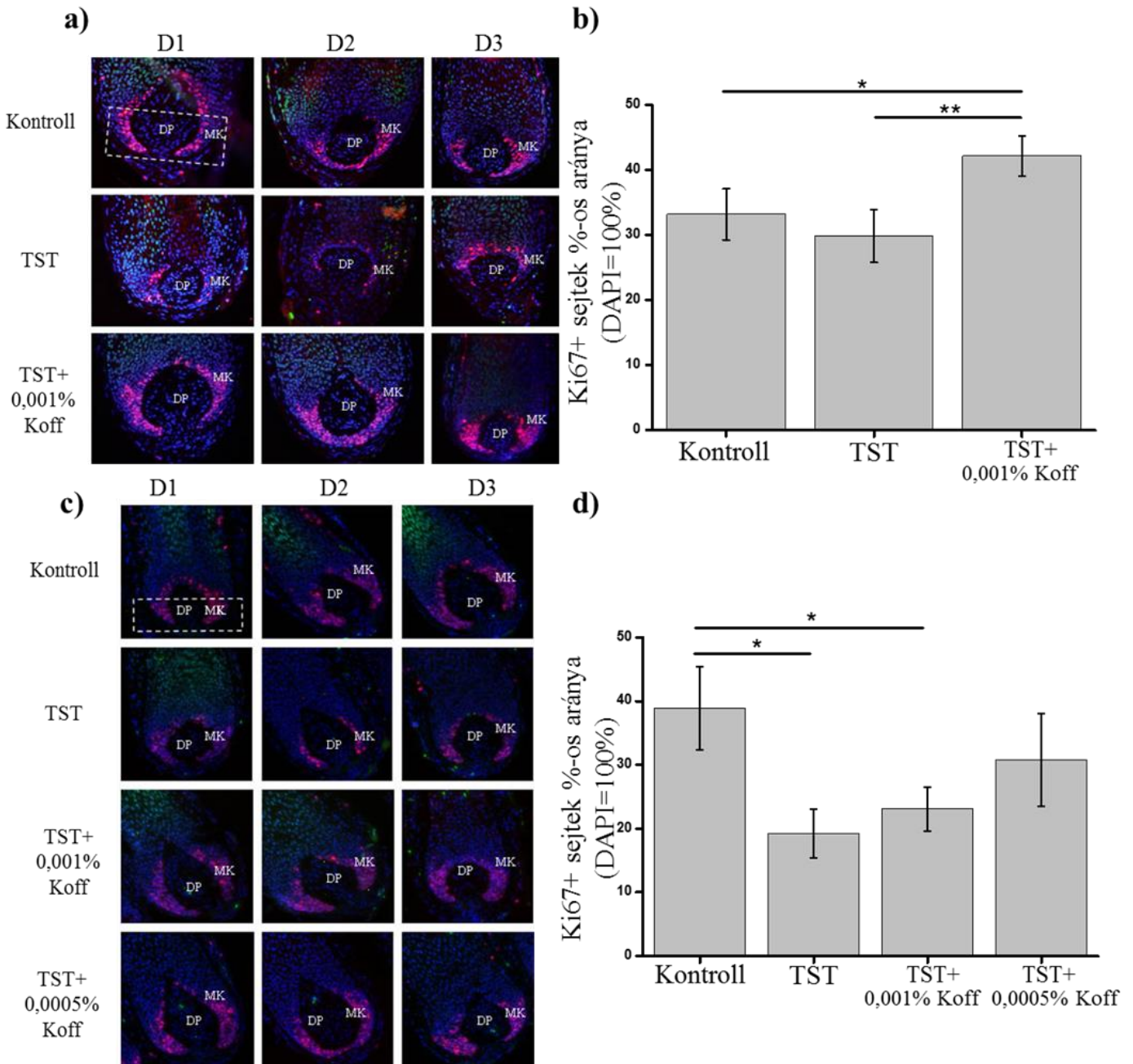


18. ábra: A koffein ellensúlyozza a TST HF növekedést gátló hatását női donorokból származó HF szervkultúrában is. A vivőanyaggal kezelt kontroll csoporthoz képest szignifikáns hossznövekedés csökkenést látunk 0,5 µg/ml TST kezelés hatására. Ezen hatás 0,001% és 0,0005% koffein jelenlétében részben ellensúlyozhatóan bizonyult, az alacsonyabb koffein koncentráció alkalmazása esetén pedig a változás szignifikánsnak adódott. Kísérleteinket 3 független donor bevonásával végeztük (N=28-37 HF/kezelési csoport; 5 napos kezelések). Átlag±SEM, *p<0,05; **p<0,01 a jelölt csoportok között egyszempontos ANOVA és Bonferroni post hoc teszt alkalmazásával. TST: tesztoszteron (5 µg/ml), Koff: koffein.

A koffein stimulálja a női és férfi donorokból származó HF-k MK-inak proliferációját

Mivel a koffein fokozta a HF-k növekedését, kísérleteink folytatásaként mélyebb betekintést szeretnénk volna nyerni a koffein HF-kre gyakorolt celluláris hatásaiba. Első lépésként azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a MK-k proliferációját. Ennek során HF szervkultúrákon alkalmaztunk TST kezelést önmagában, illetve koffeinnel kombináltan, majd fagyasztva metszéssel készített mintáinkat Ki67-TUNEL kombinált festéssel jelöltük. Megállapítottuk, hogy 0,001%-os koncentrációban alkalmazva a koffein képes volt szignifikáns mértékben növelni a Ki67 pozitív sejtek számát, mind a kontroll, mind pedig a TST-nal kezelt csoportokhoz képest férfi donorok esetén (**19/a-b ábra**). Női donorokból származó HF-kön is elvégeztük a kísérleteket, melyeknél jól látható, hogy a TST kezelésre sokkal érzékenyebben reagáltak, mivel az nagymértékben csökkentette a proliferáló MK-k számát. Ezen hatás részben ellensúlyozhatóan bizonyult; bár 0,001%-ban alkalmazva a koffein csak minimálisan

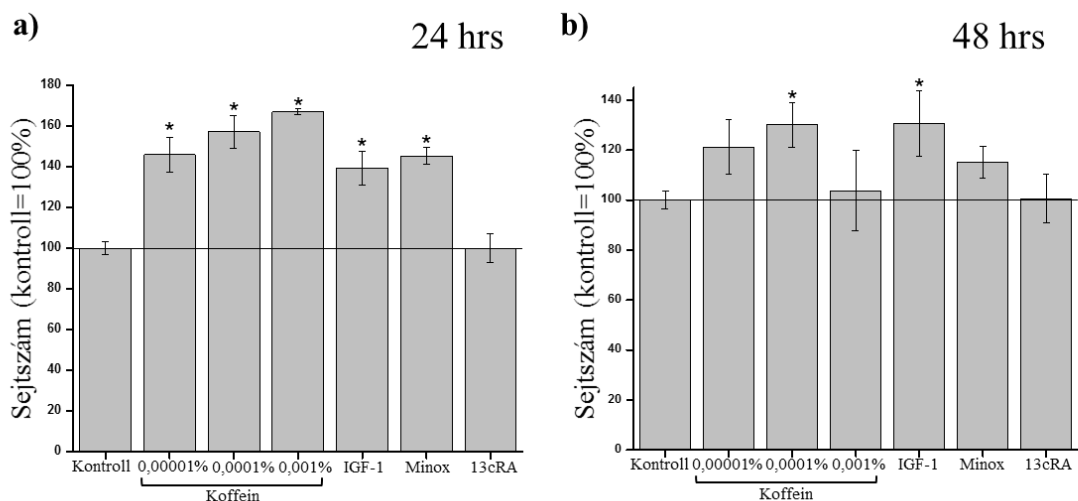
csökkentette a TST hatását, az alacsonyabb, 0,0005%-os dózisban alkalmazva nagyjából 30%-ra növelte a Ki67 pozitivitást mutató sejtek arányát, ami már nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoport értékétől (19/c-d ábra).



19. ábra: A koffein stimulálja a HF-k MK-inak proliferációját. **a, c)** Kettős immunjelölés a proliferáló (Ki67+, piros) és apoptotizáló (TUNEL+, zöld) sejtek kimutatására. A sejtmagokat DAPI-val (kék) tettük láthatóvá 5 napos kezeléseket követően; N=28-37 HF/kezelési csoport. A reprezentatív ábrák demonstrálják a koffein MK proliferációját fokozó hatását, mely a TST gátló hatásának ellenében is szignifikánsan növelte a proliferáló sejtek számát. Kísérleteinket 3 független férfi (**a**) és női (**c**) donor bevonásával végeztük. Nagyítás: 200-szoros. **b, d)** Statisztikai analízis. A Ki67+ sejtek a DAPI+ sejtek %-ában vannak ábrázolva. Átlag±SEM, 3 független férfi (**b**) és női (**d**) donorból, *p<0,05; **p<0,01 a jelölt csoportok között egyszempontos ANOVA és Bonferroni *post hoc* teszt alkalmazásával. TST: tesztoszteron (5 µg/ml), Koff: koffein, D:donor. A szaggatott vonallal rajzolt téglalapok a számolásnál figyelembe vett referencia területeket jelölik.

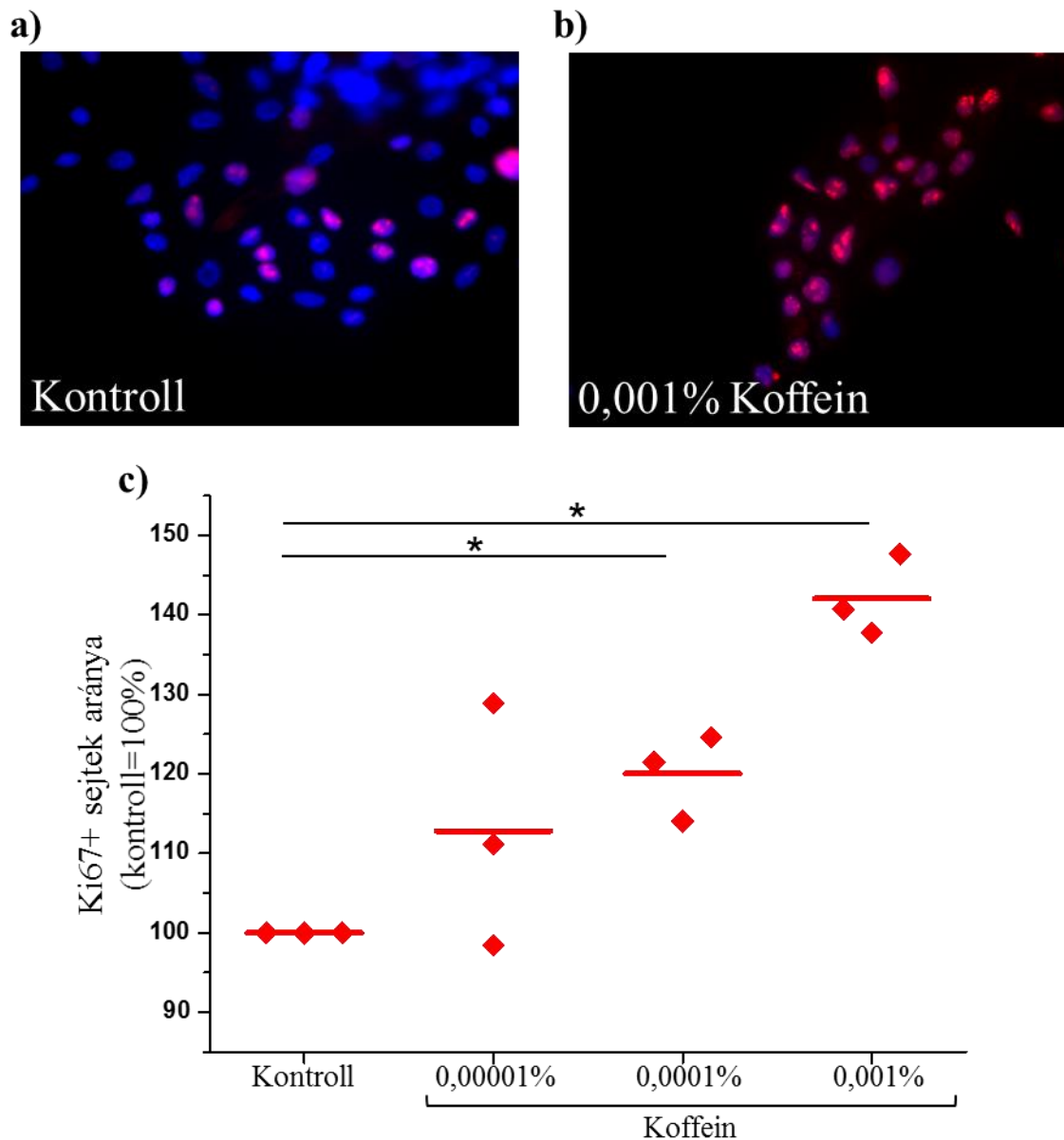
A koffein fokozza a tenyésztett ORS keratinociták proliferációját

Miután megállapítottuk, hogy a koffein HF szervkultúrában alkalmazva fokozza a MK-k proliferációját, szeretnénk volna behatóbban is megvizsgálni a celluláris hatásait, ezért férfi donorokból származó primer ORS keratinocita tenyészetet alkalmazva folytattuk vizsgálatainkat, ahogy azt az előzőekben ismertett, adenzinnal végzett kísérleteink során is tettük. Az ORS keratinociták proliferációs vizsgálatánál fluoreszcens CyQUANT-assay-t alkalmaztunk, és különböző koncentrációkban kezeltük a sejteket koffeinnel 24, és 48 órás mérési végpontokkal. Kísérleteink pozitív kontrolljaként IGF-1-et és minoxidilt (Minox) (Weger és Schlake 2005; Goren és mtsai. 2015) alkalmaztunk, valamint isotretinoint (13cRA), ami az irodalmi adatok alapján várhatóan gátolja a sejtek proliferációját (İslamoğlu és Altinyazar 2019). Amint az a **20. ábrán** is látható, a koffein szignifikánsan fokozta a sejtek proliferációját. Ez a hatás a 24 órás vizsgálatoknál bizonyult a legkifejezettebbnek, ahol a kontroll csoporthoz képest 160%-os növekményt láttunk. Érdekes módon az általunk alkalmazott pozitív regulátorok szignifikáns mértékben ugyan, de a koffeinhez képest kevésbé hatékonyan fokozták a sejtek proliferációját.



20. ábra: A koffein fokozza az ORS keratinocytáinak proliferációját. Fluoreszcens CyQUANT-assay segítségével vizsgáltuk az ORS keratinociták proliferációját az ábrán látható kezelési csoportokban, különböző időpontokban: 24 (a), 48 (b) óra. A 24 órás mérésnél jól látható, hogy a koffein szignifikáns mértékben fokozta a sejtszámot; a mért értékek meghaladják a pozitív kontrollként alkalmazott IGF-1 és Minoxidil által kiváltott hatásokat is. Kísérleteinket 3 független férfi donor bevonásával végeztük, adatainkat átlag±SEM formában ábrázoltuk, a kontroll csoportot minden esetben 100%-nak tekintettük, * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest egyszempontos ANOVA és Dunnett *post hoc* teszt alkalmazásával. IGF-1: inzulin-szerű növekedési faktor-1 (100 ng/ml); Minox: minoxidil (0,1 μ M); 13cRA: isotretinoin (1 μ M);

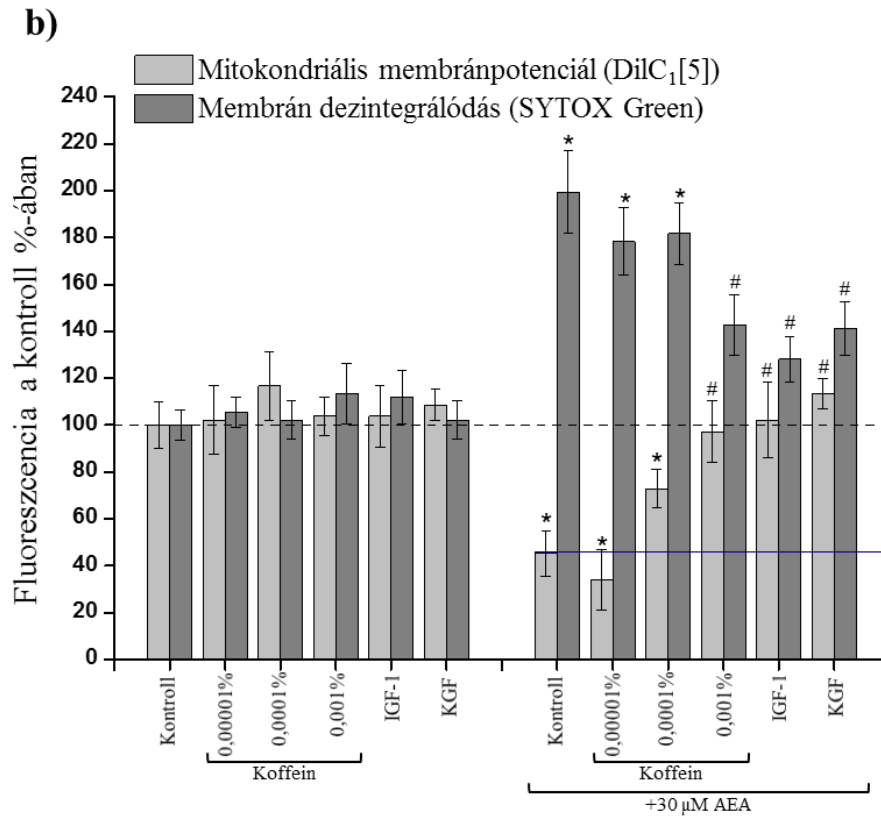
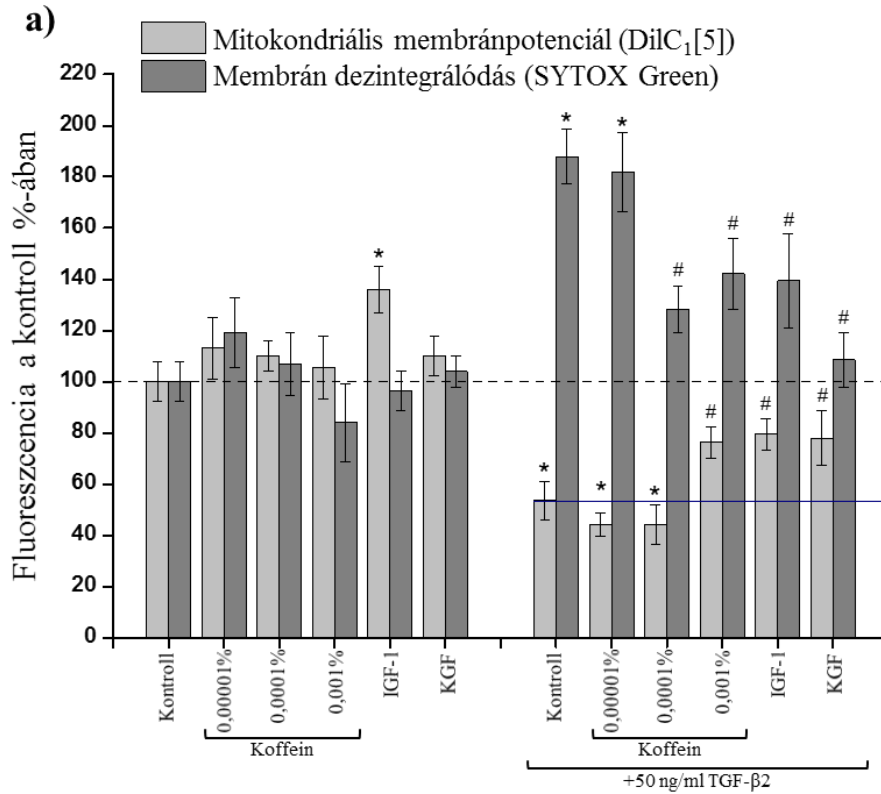
Proliferációs vizsgálataink eredményeinek független megerősítésére Ki67-specifikus immuncitokémiai festést alkalmaztunk (21/a-b ábra). Az adatok kvantitatív analízisének elvégzését követően megállapítottuk, hogy a 24 órás koffein kezelés dóziszfüggő módon, szignifikánsan növelte a Ki67 immunpozitivitást mutató, azaz proliferáló ORS keratinociták arányát (21/c ábra).



21. ábra: A koffein fokozza az ORS keratinociták proliferációját. Az ORS keratinocitákon immuncitokémiai jelöléssel vizualizáltuk a Ki67+ (piros fluoreszcencia), azaz proliferáló sejteket, míg a sejtmagokat DAPI festéssel (kék fluoreszcencia) tettük láthatóvá 24 órás kezelést követően. A reprezentatív képek demonstrálják a koffein proliferációt fokozó hatását (a,b). Kísérleteinket 3 független férfi donorból származó sejteken végeztük el (c). A Ki67 immuncitokémia analízise során nyert eredmények jól prezentálják, hogy a legnagyobb koncentrációban alkalmazott koffein kezelés minden esetben fokozta a sejtek proliferációját. Átlag±SEM, a kontroll csoport esetén mért értéket minden esetben 100%-nak tekintettük, * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest egyszempontos ANOVA és Dunnett *post hoc* teszt alkalmazásával.

A koffein csökkenti a TGF- β 2 sejthalált okozó hatását ORS keratinocitákon

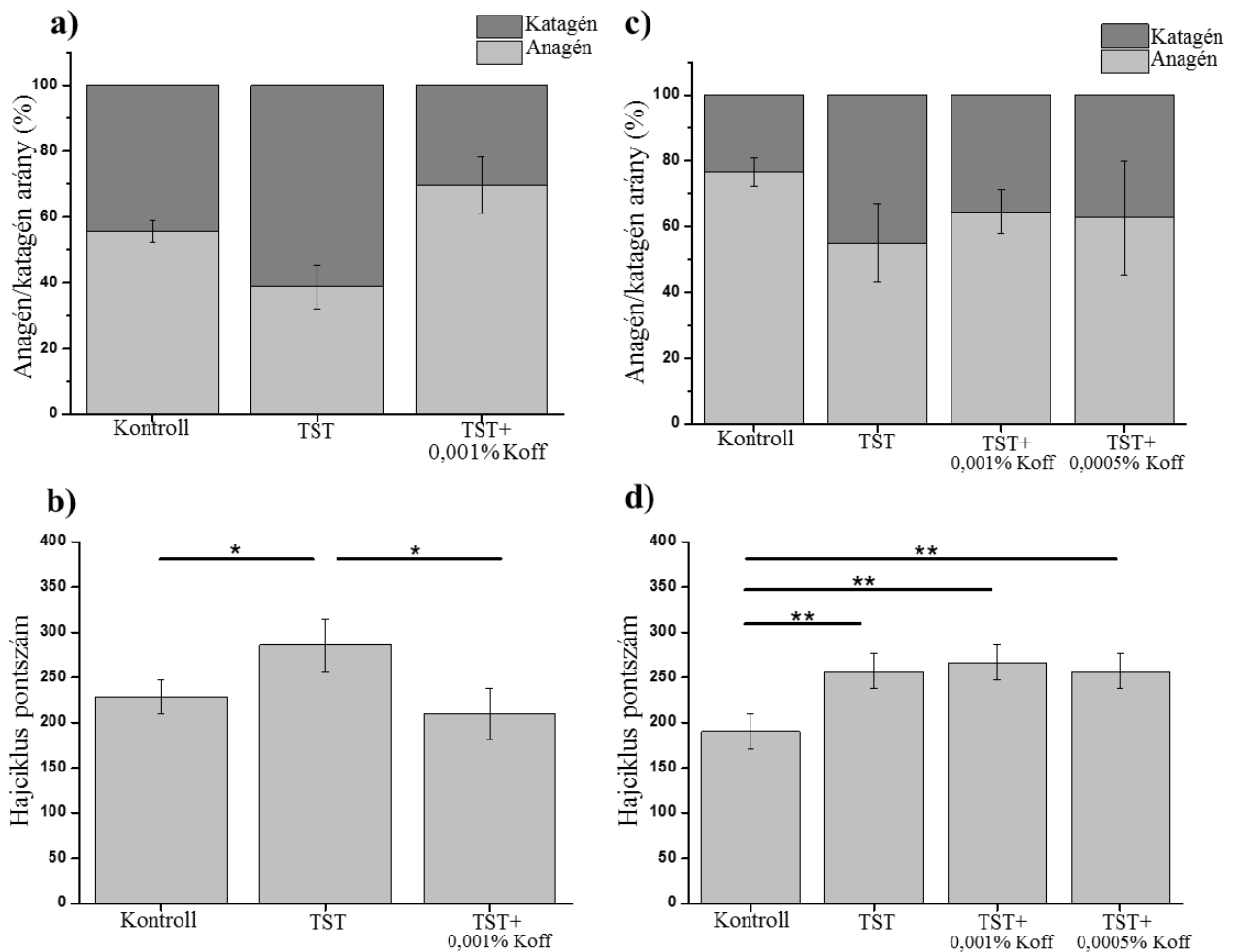
Ismert, hogy katagén indukáló hatásának kialakulása során a TGF- β 2 a HF-k több sejtpopulációjában (ideértve az ORS keratinocitákat is) sejthalál folyamatokat indít be (Langan és mtsai. 2015). Ezen tulajdonságára építettük következő kísérleteinket, melyekben arra a kérdésre szeretnénk volna választ kapni, hogy a koffein, a már megismert proliferációt indukáló hatása mellett vajon képes-e ellensúlyozni a sejthalál folyamatok beindulását/lezajlását az ORS keratinocitákban. A kombinált DilC₁(5)-SYTOX Green jelölés tanúsága szerint a koffeint önmagában alkalmazva nem tapasztaltunk jelentős eltérést, míg a TGF- β 2 jelentősen csökkentette a mitokondriális membránpotenciállal korreláló DilC₁(5), és fokozta a sejtmembrán dezintegrációt jelző SYTOX Green jelét, azaz korai sejthalál folyamatokat indított el (**22. ábra**). Koffein kezelést alkalmazva azonban ezek a változások kivédhetőnek bizonyultak. Alacsonyabb koncentrációban (0,0001%) alkalmazva a koffein csak a SYTOX Green szignál nekrozisra utaló növekedését volt képes ellensúlyozni, míg magasabb dózisban ezen hatás mellett az apoptotikus folyamatok is csökkenni látszottak, hiszen a mitokondriális membránpotenciált jelző DilC₁(5) jel TGF- β 2-indukálta csökkenése mérséklődött, csakúgy, mint a pozitív kontrollként alkalmazott IGF-1 és keratinocita növekedési faktor (KGF) (Marchese és mtsai. 1990) esetében (**22/a ábra**). Kísérleteinket a TGF- β 2 mellett az ismert katagén-induktor endokannabinoid anandamiddal (AEA) is megismételtük (Telek és mtsai. 2007; Tóth és mtsai. 2019), és a fentiekkel jó összhangban lévő eredményeket kaptunk. A koffein itt is dóziszfüggő módon protektív hatással bírt, csakúgy, mint ahogyan az, az alkalmazott pozitív kontrollok (IGF-1 és KGF) esetében is megfigyelhető (**22/b ábra**).



22. ábra: Az apoptotikus és nekrotikus folyamatok vizsgálata ORS keratinocitákon. Az ORS keratinocitákat a mitokondriális membránpotenciál detektálására szolgáló DiIC₁(5) és a nekrotikus folyamatok nyomkövetésére alkalmas SYTOX Green fluoreszcens festékekkel töltöttük fel a fent látható 48 órás kezeléseket követően. Kísérleteinket 3 független férfi donorból származó sejteken végeztük el. Adatainkat átlag±SEM (N=4) alakban ábrázoltuk, a kontroll csoportot minden esetben 100%-nak tekintettük. *p<0,05 a kontrollhoz képest, #p<0,05 a TGF-β2-vel (a) vagy anandamiddal (AEA) (b) kezelt csoporthoz viszonyítva egyszempontos ANOVA és Bonferroni *post hoc* teszt alkalmazásával. IGF-1: inzulin-szerű növekedési faktor (100 ng/ml); KGF: keratinocita növekedési faktor (20 ng/ml).

A koffein a TST katagént indukáló hatását képes volt férfiaknál teljes egészében, míg nőknél részlegesen felfüggeszteni

A koffein celluláris hatásainak vizsgálata után a hajciklusra gyakorolt hatásait követtük nyomon. A szőrtüszőket TST és koffein kezelést követően fagyasztva metszettük, majd HE festés elvégzése után vizsgáltuk az adott fázisra jellemző morfológiai jegyeket (Klopper és mtsai. 2010). Megállapítottuk, hogy a TST férfiaknál 20%-kal csökkentette az anagén VI fázisban lévő HF-k arányát a kontroll csoporthoz képest. A koffeinnel történő együttes alkalmazás során ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy az anagén fázisban lévő HF-k aránya feltűnő növekményt mutatott, és egészen 70%-ig emelkedett (**23/a ábra**). Hasonló, bár kevésbé kifejezett változásokat tapasztaltunk női donorok esetében is, azaz a TST katagént indukáló hatását a koffein különböző koncentrációi képesek voltak részlegesen visszafordítani (**23/b ábra**). Ezen eredményeket férfi donorok esetében sikerült egyértelműen alátámasztanunk a hajciklus pontszám („hair cycle score”: HCP) vizsgálatával. Ennek során a hajciklus egyes fázisaihoz számértékeket (korai anagén: 100, késői anagén: 200; korai katagén: 300; késői katagén: 400) rendelünk a kiértékelés során, így a katagén fázisú HF-ket nagyobb arányban tartalmazó csoport átlagos értéke magasabb, a dominánsan anagén HF-kből álló csoportoké pedig alacsonyabb lesz. Ennek megfelelően a TST kezelés fokozta a HCP értékét, míg (férfi donorok esetén) a koffeinnel egyidejű alkalmazása az érték normalizálódását eredményezte (**23/b ábra**), ellenben a női donorok esetén a koffein hatástalannak bizonyult (**23/d ábra**).



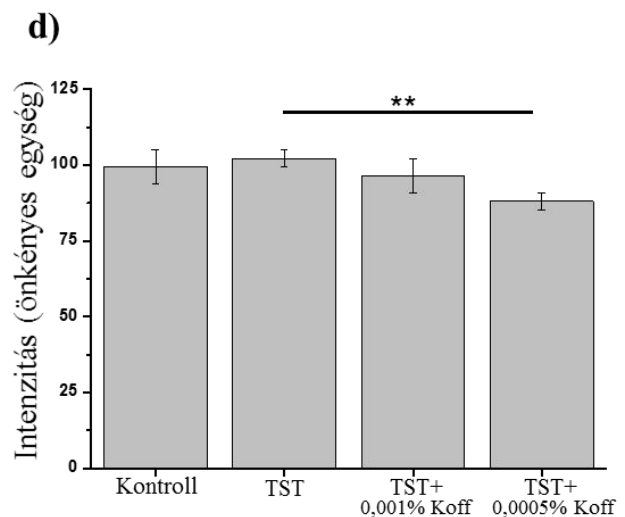
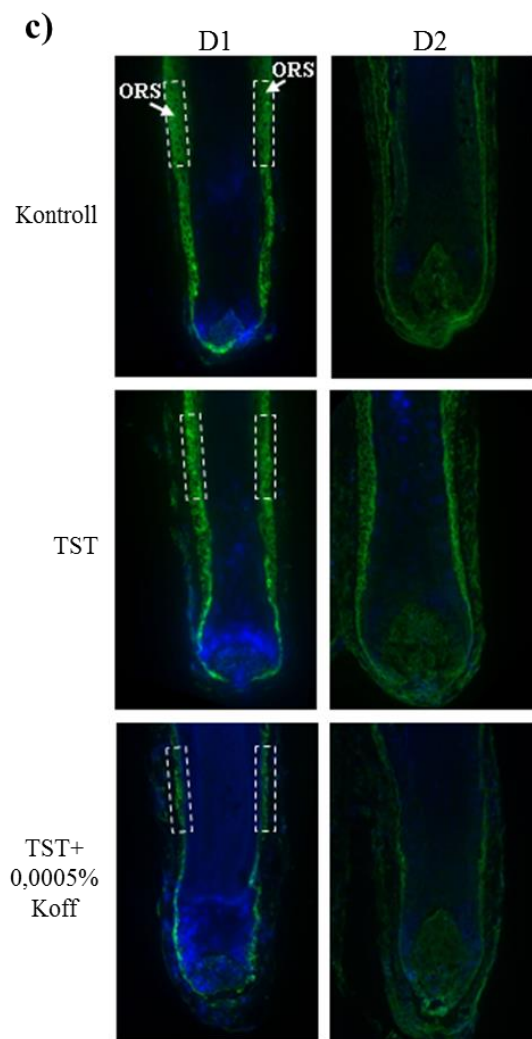
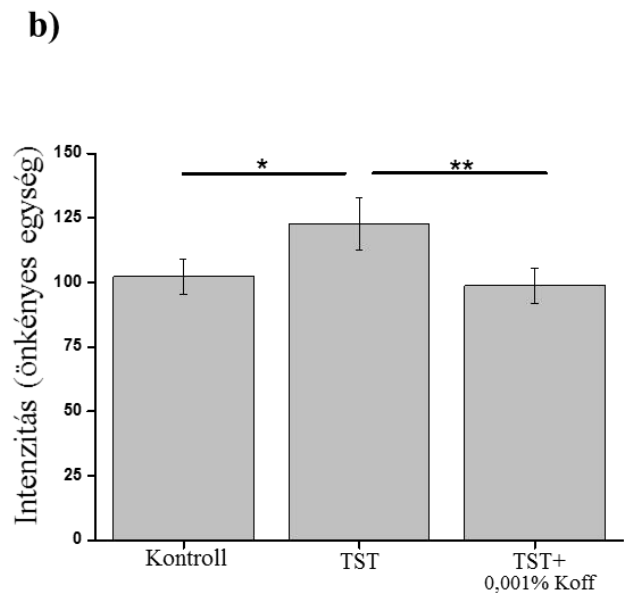
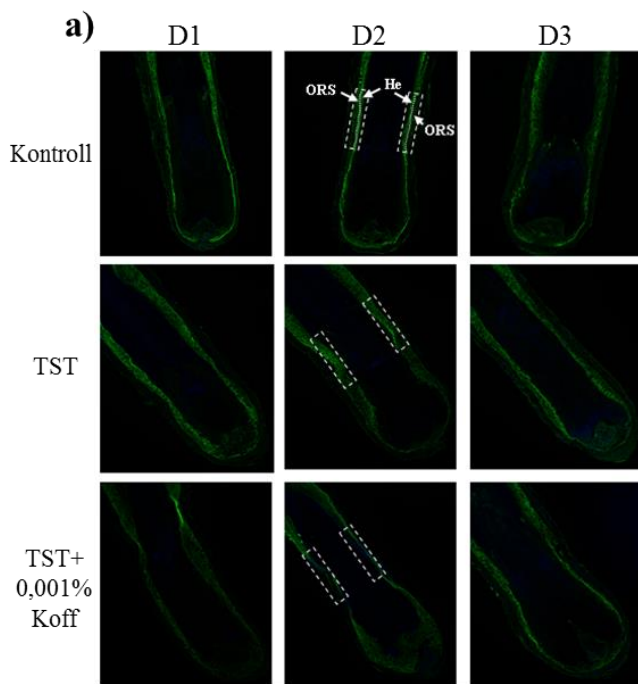
23. ábra: A koffein férfi donoroktól származó HF-k esetén képes ellensúlyozni a TST katagént indukáló hatását. Hajciklus vizsgálat és hajciklus pontszám analízis férfi (a, b) és női (c, d) donorok HF-in végzett 5 napos kezeléseket követően. Férfi donorok esetén a TST hatását képes volt kivédeni a koffein. (b, d): Átlag±SEM, N=28-36 HF/kezelési csoport, *p<0,05 a jelölt csoportok között egyszempontos ANOVA és Bonferroni *post hoc* teszt alkalmazásával. TST: tesztoszteron (5 µg/ml), Koff: koffein.

A koffein kezelés differenciáltan befolyásolja a hajciklus-modulátor TGF-β2 és IGF-1 intrafollikuláris kifejeződését férfi és női donoroktól származó HF-k esetén

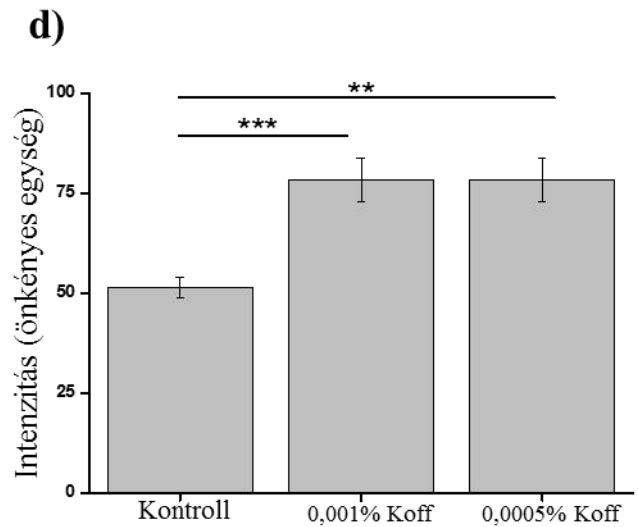
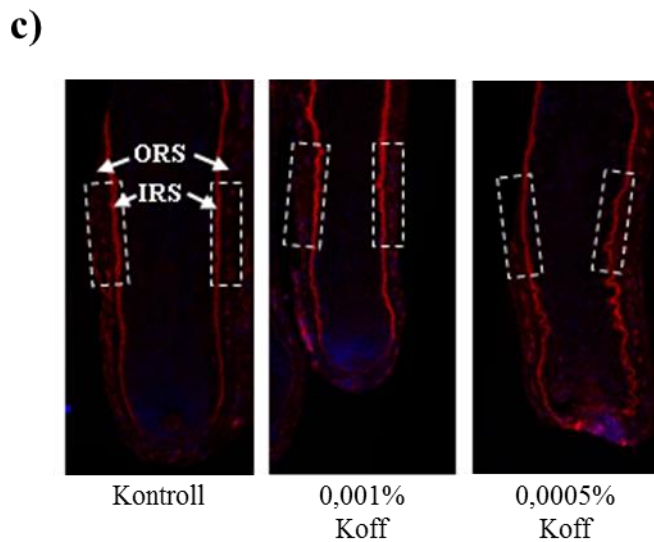
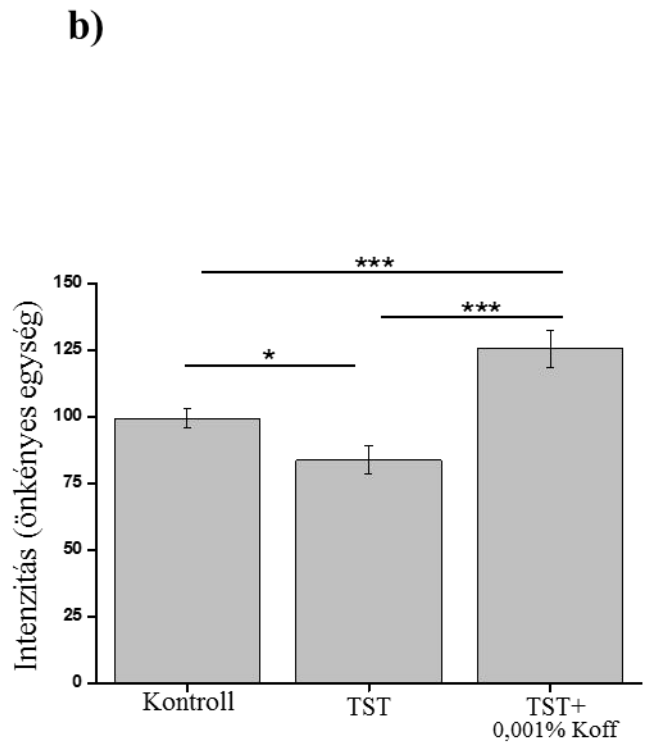
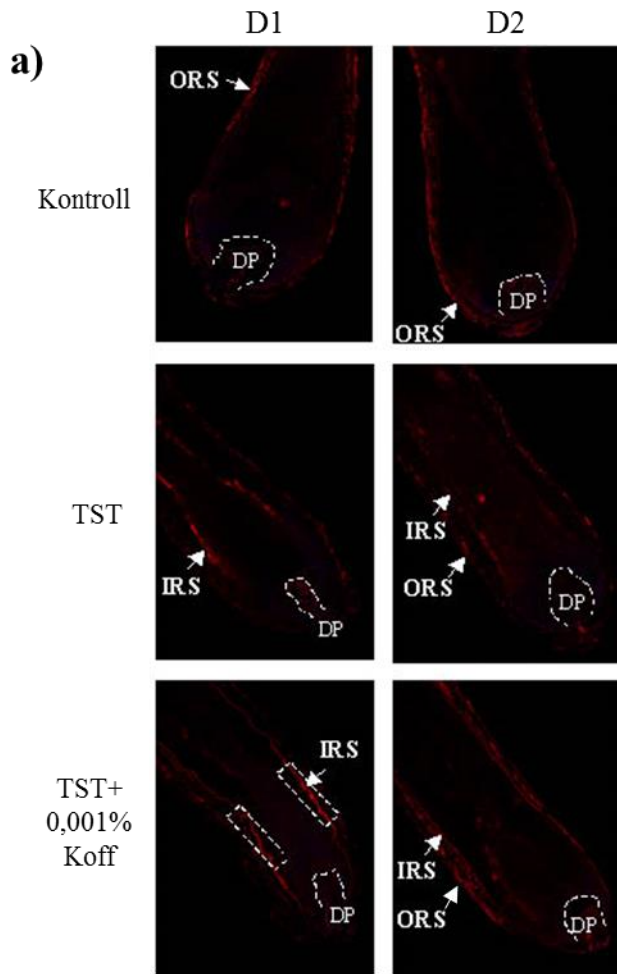
Miután kimutattuk, hogy a koffein férfi donorok HF-i esetén képes a TST katagén fázist indukáló hatását felfüggeszteni, kísérleteink középpontjába a hajciklus szabályozásában kiemelkedő fontosságú pro-anagén (IGF-1) és pro-katagén (TGF-β2) faktorok vizsgálatát állítottuk. Első lépésként a TST-nal és koffeinnel 5 napig kezelt, majd fagyasztott HF-kből származó metszeteken elvégeztük a hajciklus regulátorok immunhisztokémiai kimutatását. A TGF-β2 expressziója az ORS réteg mellett a Henle-réteg (IRS) sejtjeiben is megfigyelhető volt. Amint az várható volt, férfi donoroktól származó HF-k esetén TST kezelés hatására a katagén

fázist indukáló TGF- β 2 kifejeződése szignifikáns mértékben fokozódott, míg eddigi eredményeinkkel teljes összhangban a koffeinnel történő együttes kezelés hatására, a TGF- β 2 intrafollikuláris protein expressziója normalizálódott, tehát a koffein képes volt kivédeni a TST TGF- β 2 kifejeződést indukáló hatását (**24/a-b ábra**). Női donorokból származó HF-kön elvégezve a kísérletet némileg eltérő eredményre jutottunk, hiszen a TST kezelés nem fokozta a TGF- β 2 kifejeződését, viszont a koffeinnel történő együttes kezelés a kontroll csoporthoz képest is jelentősen csökkentette az expressziót (**24/c-d ábra**).

A következő lépésben egy az anagén fázis elindításában/fenntartásában szerepet játszó hajciklust szabályozó protein, az IGF-1 expressziójának változását követtük nyomon a fentebb leírt kísérletes rendszerben. Az irodalmi adatokkal (Weger és Schlake 2005) összhangban az IGF-1 fehérje kifejeződése mind az ORS, mind pedig az IRS rétegben megfigyelhető volt. Férfi donoroknál a TST kezelés hatására csökkenő intrafollikuláris kifejeződést nemcsak ellensúlyozta a koffein alkalmazása, de szignifikáns növekedést látunk a kontroll csoporthoz képest is (**25/a-b ábra**). Női donorok esetén ezzel szemben a TST kezelés hatásai jelentős donorfüggést mutattak, ezért ezen adatokat nem mutatjuk, viszont a koffein önmagában alkalmazva szignifikánsan fokozta az IGF-1 expresszióját (**25/ c-d ábra**).



24. ábra: A koffein kezelés differenciálisan befolyásolja a TGF- β 2 expresszióját férfi és női donorokból származó HF-kben. A TGF- β 2 (zöld fluoreszcencia) immunfluoreszcens jelölése férfi (a) és női (c) donorok HF-in; a sejtmagokat DAPI-val (kék) jelöltük. A kvantitatív analízis tanúsága szerint férfiaknál (b) a TST kezelés szignifikánsan fokozta a TGF- β 2 kifejeződését, míg a koffein együttes alkalmazása normalizálta az expressziót. A női donorok analízise során (d) látható, hogy – habár a TST nem fokozta érdemben a TGF- β 2 kifejeződését – a koffein kezelés a kontroll csoportnál mérthez képest alacsonyabb intenzitást eredményezett. N=9-11 HF/kezelési csoport 3 független donorból férfiak esetén, míg női donoroknál N=17-32 HF/kezelési csoport 2 független donorból 5 napos kezeléseket követően. Átlag \pm SEM, * p <0,05, illetve ** p <0,01 a jelölt csoportok között egyszempontos ANOVA és Bonferroni *post hoc* teszt alkalmazásával. TST: tesztoszteron (5 μ g/ml), Koff: koffein, D: donor, ORS: külső gyökérhüvely keratinociták rétege, He: Henle réteg. A szaggatott vonallal határolt téglalapok az intenzitás mérésekhez használt referencia területeket jelöli.

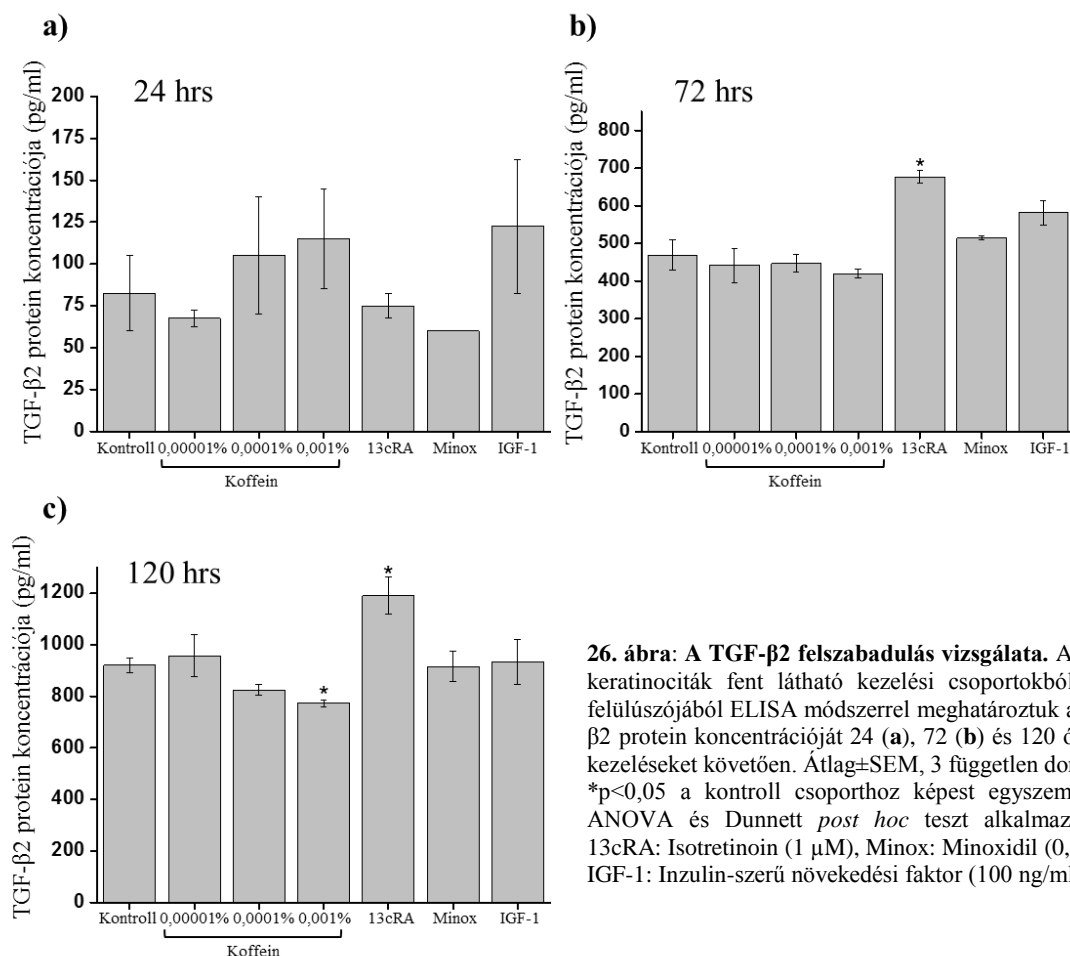


25. ábra: A koffeinkezelés fokozza a pro-anagén IGF-1 expresszióját. Az IGF-1 (piros fluoreszcencia) immunfluoreszcens jelölése az ORS réteg mellett megfigyelhető az IRS rétegben is mind férfi (a), mind pedig női (c) donoroknál. A sejtmagokat DAPI-val (kék) jelöltük. Férfiak esetén (b) a TST kezelés szignifikánsan csökkentette az IGF-1 kifejeződését. Érdekes módon a koffein nemcsak kivédte ezt a hatást, hanem a kontroll csoport szintje fölé emelte az expressziót. A női donorok analízise során (d) látható, hogy a koffeinkezelés a kontroll csoportnál mértékhez képest is jelentősebb IGF-1 immunjelölődési intenzitást eredményezett. N=21-27 HF/kezelési csoport 2 független donorból férfiakra esetén, míg női donoroknál N=6-16 HF/kezelési csoport 1 donorból 5 napos kezeléseket követően. Átlag±SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, illetve *** $p < 0,001$ a jelölt csoportok között egyszempontos ANOVA és Bonferroni *post hoc* teszt alkalmazásával. TST: tesztoszteron (5 $\mu\text{g/ml}$), Koff: koffein, D: donor, ORS: külső gyökérhüvely keratinociták rétege, IRS: belső gyökérhüvely keratinociták rétege, DP: Dermális papilla. A szaggatott vonallal határolt téglalapok az intenzitásmérésekhez használt, anatómiailag pontosan definiált referencia területeket jelöli.

A koffein befolyásolja a TGF- β 2 és az IGF-1 kifejeződését és felszabadulását ORS

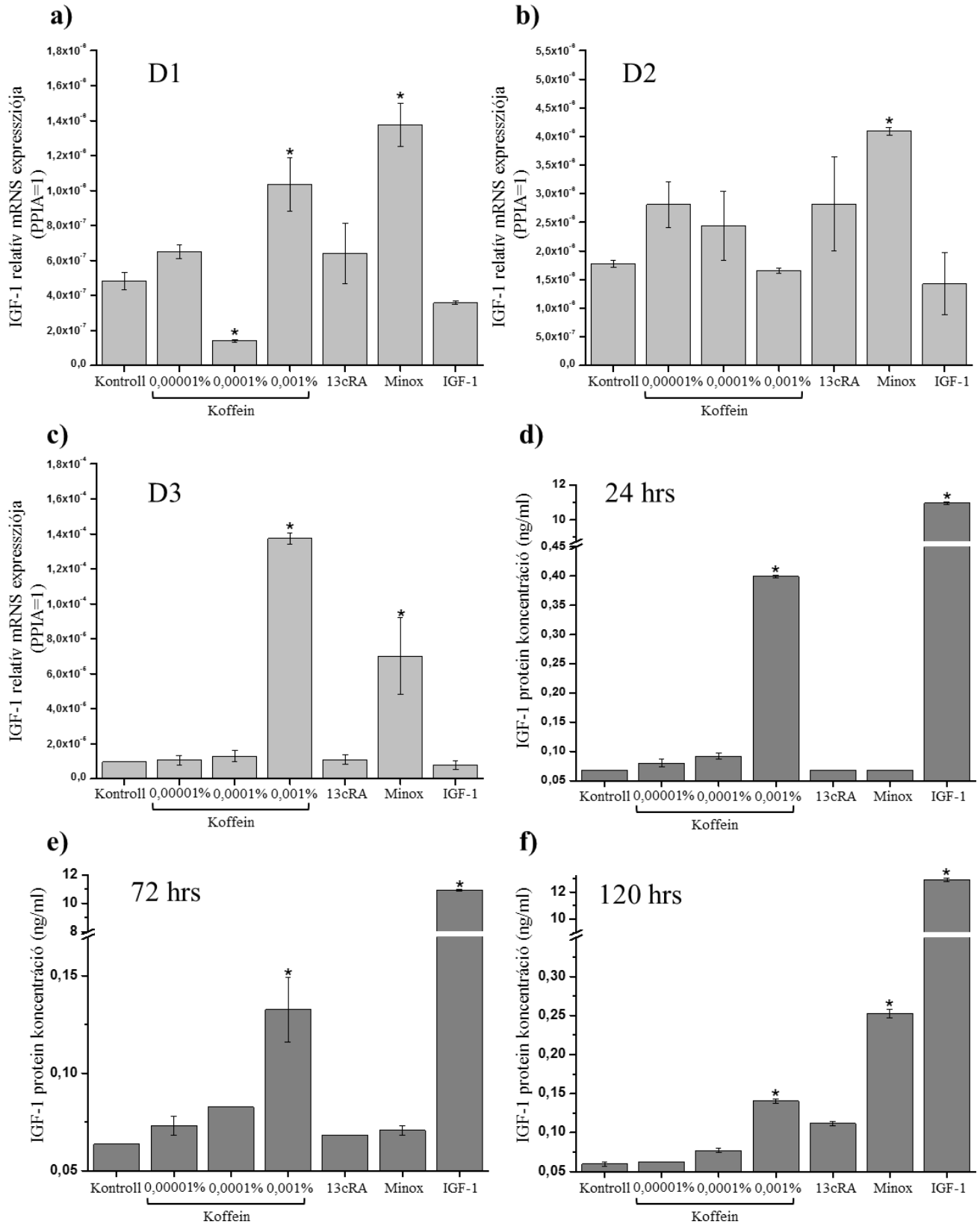
keratinocitákon

A TGF- β 2 és IGF-1 sejtszintű kifejeződésének vizsgálatára ismét a primer ORS keratinocita kultúrákat használtunk. A specifikus mRNS szakaszok kifejeződésének vizsgálatára RT-qPCR-t, míg a felszabaduló molekulák fehérje szintű vizsgálatára ELISA módszert alkalmaztunk. Habár a TGF- β 2 mRNS kimutatását hat különböző férfi donorból izolált sejteken is elvégeztük, egyik donornál sem tapasztaltunk expressziós változást a koffein kezelés hatására, ezért ezen adatokat nem mutatjuk. Ezt követően a sejtek felülűszóját vizsgálva megállapítottuk, hogy a pozitív kontrollként alkalmazott pro-katagén isotretinoin (İslamoğlu és Altınyazar 2019) szignifikánsan fokozta a detektálható TGF- β 2 mennyiségét (**26. ábra**), míg a koffein hatására 120 órás kezelést követően szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a TGF- β 2 felszabadulásában.



26. ábra: A TGF- β 2 felszabadulás vizsgálata. Az ORS keratinociták fent látható kezelési csoportokból nyert felülűszójából ELISA módszerrel meghatároztuk a TGF- β 2 protein koncentrációját 24 (**a**), 72 (**b**) és 120 órás (**c**) kezeléseket követően. Átlag \pm SEM, 3 független donorból, * $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz képest egyszempontos ANOVA és Dunnett *post hoc* teszt alkalmazásával. 13cRA: Isotretinoin (1 μ M), Minox: Minoxidil (0,1 μ M), IGF-1: Insulin-szerű növekedési faktor (100 ng/ml).

Az IGF-1 specifikus mRNS szakaszok génexpressziós vizsgálata során a hat férfi donorból három esetében detekciós küszöb alatt voltak a mért értékeink, míg három donor esetében sikerült expressziót kimutatnunk, még ha alacsony szinten is. Ez utóbbi hátról két donor esetében a koffein kezelés (0,001%) képes volt szignifikánsan fokozni az IGF-1 kifejeződését, míg a harmadik donor esetében nem láttunk érdemi változást (**27/a-c ábra**). A következőkben ELISA módszerrel fehérje szinten vizsgálva a változásokat megállapítottuk, hogy a 0,001% koffein kezelés hatására mindhárom vizsgált időpontban jelentősen nőtt az IGF-1 felszabadulása (**27/d-f ábra**).



27. ábra: A koffein fokozza az IGF-1 mRNS szintű kifejeződését és felszabadulását. RT-qPCR technika alkalmazásával 3 különböző donorból vizsgáltuk az IGF-1 gén expressziójának változását a fent látható 120 órás kezeléseket követően (a, b, c). Az IGF-1 protein felszabadulásának vizsgálatánál az ORS keratinociták fent látható kezelési csoportokból nyert felülcszójából ELISA módszerrel meghatároztuk az IGF-1 koncentrációját három különböző időpontban 24 óra (d), 72 óra (e), 120 óra (f). Átlag±SEM, 3 független donorból. *p<0,05 a kontroll csoporthoz képest egyszempontos ANOVA és Dunnett *post hoc* teszt alkalmazásával. D: donor, 13cRA: Isotretinoin (1 µM), Minox: Minoxidil (0,1 µM), IGF-1: Inzulin-szerű növekedési faktor (100 ng/ml).

MEGBESZÉLÉS

A haj- és szőrnövekedés rendellenességei – mint a fokozott szőrnövekedéssel járó hirzutizmus vagy a szőrvesztést okozó alopecia különböző típusai – emberek millióinak életét nehezítik meg világszerte. Ezen kondíciók a klinikai relevancián túl (habár közvetlenül nem életet veszélyeztető állapotokról van szó) igen jelentős pszicho-szociális nyomást gyakorolnak az érintett betegek életminőségére, melynek köszönhetően egyre nagyobb igény formálódik az effektív terápiás beavatkozások szükségességét illetően (Breitkopf és mtsai. 2013; Keegan és mtsai. 2003).

Amint, azt az **Egy gyakori szőrnövekedési rendellenesség: az androgén alopecia** alfejezetben említettük, a populáció jelentős százalékának hajvesztéséért az AGA tehető felelőssé férfiakat és nőket érintve egyaránt. A folyamat molekuláris hátterében a patogenetikailag prediszponált HF-k DHT-al szembeni fokozott érzékenysége áll. Terápiáját illetően a legelterjedtebben alkalmazott 5-AR gátló Finasterid vagy Dutaszterid és a topikálisan alkalmazható Minoxidil mellett alacsony frekvenciájú lézeres beavatkozást, mezoterápiát és hajtranszplantációt is alkalmaznak több-kevesebb sikerrel (Kelly, Blanco, és Tosti 2016). Az új farmakológiai terápiás szerek fejlesztése lassú ütemben halad, bár a legújabb kutatások szerint hatékonynak bizonyult az autológ trombocita-gazdag plazma injektálása az érintett fejbőr területre (Stevens és Khetarpal 2018). Alopecia areataban kezelési stratégia terén hatékonynak bizonyultak a Janus-kináz inhibitorok (Xing és mtsai. 2014) és az egyelőre kezdeti fázisban, változó hatékonyságú PDE inhibitorok (Mikhaylov és mtsai. 2019) alkalmazása, melyek felvetik az esetleges későbbi terápiás kezelés lehetőségét AGA-ban.

A csak részleteiben ismert patofiziológia, az ebből adódóan még napjainkban is kiforratlan terápia, valamint az egyre élesebben megfogalmazódó társadalmi igényeknek

megfelelve világszerte számos kutatócsoport tesz erőfeszítéseket a szőrnövekedés biológiájának jobb megismerésére. Ennek köszönhetően az elmúlt évtizedekben jelentős előrehaladás történt ezen a területen, és számos lehetséges új mechanizmus azonosítására került sor, legyen szó akár a szőrnövekedés elősegítését vagy éppen gátlását célzó terápiáról.

A kóros állapotok mögöttes folyamatainak megértéséhez nélkülözhetetlen, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a szőrnövekedés molekuláris (pato)mechanizmusába. Ezen indítatásból kísérleteink első szakaszában az adenzin, második szakaszában pedig a koffein HF-re és ORS keratinocitákra gyakorolt közvetlen és ezáltal a hajciklus szabályozásában betöltött közvetett hatását elemeztük.

Az adenzin, mint potenciális hajciklus szabályozó molekula

Az adenzin kedvező szisztémás hatásai széles körben ismertek, nem meglepő tehát, hogy a HF biológiában is egyre nagyobb teret nyer alkalmazása. Korábbi klinikai tanulmányok beszámolnak az adenzin hajnövekedésre gyakorolt pozitív hatásairól mind a férfias típusú hajhullásban (AGA), mind pedig a nőket érintő hajvesztésben: a topikálisan alkalmazott adenzin kezelés fokozta mind a hajsálak átmérőjét, mind pedig a hajnövekedési rátát a japán és kaukázusi populációkban egyaránt (Iwabuchi és mtsai. 2016; Oura és mtsai. 2008; Watanabe és mtsai. 2015). Habár ezen eredmények az adenzint, mint pozitív hajciklus szabályozó molekulát írják le, a molekuláris szabályozó folyamatokra nem terjedtek ki a vizsgálatok, így az adenzin pontos hatásmechanizmusa továbbra is felderítetlen maradt.

Annak érdekében, hogy mélyebb betekintést nyerjünk az adenzin hajnövekedést fokozó hatásába és a mögöttes molekuláris mechanizmusokba mikrodisszektált HF szervkultúrákkal és HF-ből izolált ORS keratinocitákkal végeztük kísérleteinket. A korábbi klinikai tanulmányokkal jó összhangban azt találtuk, hogy az adenzin kezelés fokozta a hajsál növekedését *in vitro* (**11. ábra**). A mögöttes folyamatok alaposabb megértése érdekében

immunfluoreszcens és hisztológiai jelöléseket követően azt találtuk, hogy az adenzin kezelés fokozta az intrafollikuláris MK-ák proliferációját, valamint csökkentette a regresszív, katagén fázisban lévő HF-k, és fokozta a növekedési, azaz anagén ciklusban lévő HF-k arányát a hisztomorfometriai paramétereknek megfelelően (**12. ábra**). Mindezen eredmények azt sugallják, hogy az adenzin potenciális szabályozója a hajciklusnak, amit más oldalról is szeretünk volna alátámasztani. Ennek érdekében TGF- β 2 alkalmazásával katagén fázist indukáltunk a humán HF szervkultúrában, majd adenzinnal történő kezelést követően az alábbi megállapításokat tettük: az adenzin részlegesen képes volt felfüggeszteni a TGF- β 2 HF hossznövekedést gátló hatását (**13. ábra**), fokozta a MK-ák proliferációját és csökkentette az apoptotizáló sejtek arányát, kivédve ezzel a katagén-induktor által kiváltott hatásokat, valamint gátolta a HF-k katagén fázisba történő átmenetét, megtartva a HF-k anagén fázisra jellemző morfológiai sajátosságait (**14. ábra**). Eredményeink megerősítése végett DP szár analízist végeztünk, mely szintén alátámasztotta fenti eredményeinket, miszerint az adenzin képes ellensúlyozni a TGF- β 2 katagén fázist indukáló hatását (**15. ábra**). A potenciális hajnövekedésben szerepet játszó jelátviteli célpontok felderítése érdekében kísérleteink során az ADOR pán-antagonista CGS15943-at alkalmaztunk, melynek jelenléte teljes mértékben felfüggesztette az adenzin HF hossznövekedést és MK proliferációt fokozó és anagén fázist prolongáló hatását (**13-15. ábra**).

Irodalmi adatok alapján egerek bajuszából nyert HF szervkultúrákon végzett kísérletek szerint az adenzin anagén fázist fenntartó szereppel bír, valamint fokozza az intrafollikuláris sejtek cisztein felvételét, mely a proliferáló sejtek egyik jellegzetes markere (Hwang és mtsai. 2012). Habár a humán és rágcsálók hajciklusát jól meghatározott különbségek jellemzik, eddigi eredményeink alátámasztják a korábban rágcsálókon leírt megfigyeléseket.

A komplex molekuláris interakciókon alapuló kapcsolat a HF mezenchimális és epitheliális eredetű sejtcsoportjainak kommunikációja során jelentős szereppel bír a hajciklus szabályozását illetően (Schneider, Schmidt-Ullrich, és Paus 2009; Stenn és Paus 2001). Habár számos – a hajciklus egyes fázisai közötti átmenetért felelős – faktor ismert és az egyes hajciklus fázisok is jól körülhatárolt morfológiai karakterisztikával rendelkeznek, mégis az intercelluláris interakciók molekuláris háttere valamint a ciklikus szabályozás pontos eredete nem egészen feltárt (Bernard 2012). Irodalmi adatok számos, a hajciklus szabályozása szempontjából pozitívan ható molekulát azonosítottak (pl. IGF-1, KGF, SCF), melyek fokozzák a hajszál növekedését, fenntartják az anagén fázist és indukálják a melanogenezist, mely szintén az anagén fázis során fokozott aktivitással jellemezhető folyamat (Langan és mtsai. 2015; Paus és mtsai. 2014; Stenn és Paus 2001). Ezzel ellentétet hatást kiváltó ún. negatív hajciklus regulátorok között tartják számon az EGF-t és TGF- β 2-t, FGF5-öt és interferon gammát, melyek katagén átmenetet indukálnak és csökkentik a HF-k hossznövekedését (Langan és mtsai. 2015; Paus és mtsai. 2014; Stenn és Paus 2001). Ezen molekulák és receptoraik széles körű dokumentációnak örvendenek az irodalomban a HF számos mezenchimális és epitheliális kompartmentjén, kiterjedt parakrin szabályozó rendszert lefedvén a hajciklus regulálása szempontjából. A parakrin szabályozó körök modulációja effektív terápiás megoldásokkal kecsegtethet a hajnövekedés problémáit illetően, ezért kísérleteink következő lépéseként azt vizsgáltuk, hogy az adenzin kezelés hogyan befolyásolja a potenciális, hajciklust szabályozni képes molekulák kifejeződését ORS keratinocitákon.

Korábbi, egereken végzett kísérletek rávilágítottak, hogy az adenzin kezelés képes volt fokozni egyes pozitív hajciklus szabályozó faktorok (FGF2, FGF7, IGF-1 és VEGF) kifejeződését bajuszból izolált DP sejt kultúrákon (Hwang és mtsai. 2012). Humán DP sejt kultúrákon végzett kísérletek szerint az adenzin FGF7 expressziót fokozó hatása felfüggeszhetőnek bizonyult a specifikus A_{2B} receptor blokkoló alloxazine jelenlétében,

emellett immunhisztokémiai módszerrel kimutatták az A_{2B} receptor kifejeződését a DP és az ORS sejteken (Iino és mtsai. 2007).

Kísérleteink során a korábbi irodalmi adatokkal jó összhangban kimutattuk, hogy mind a négy ADOR altípus expresszálódik a HF-kön, az A_{2B} receptor kifejeződésének mintázata követi a korábbiakban leírtakat, sőt expressziós szintje az ADOR-ok közül a legmagasabbnak bizonyult mRNS szinten (**16/a-b ábra**). Munkánk folytatása során primer ORS keratinocita tenyészeteken vizsgáltuk az ADOR-ok kifejeződését és kísérleteink a HF-nél látottakhoz hasonló eredményekre vezettek: mind a négy ADOR altípus kifejeződését sikerült kimutatnunk mind protein, mind pedig mRNS szinten és a legtöbb specifikus transzkript az A_{2B} receptornál volt detektálható (**16/c-d ábra**).

Következő lépésként a HF-ből izolált, ORS keratinocita sejt kultúrákon végeztünk adenzin kezelést és eredményeink szerint az adenzin fokozta mind az anagén fázis inicializálásában szerepet játszó IGF-1 (Weger és Schlake 2005), mind pedig az anagén fázishoz kapcsolódó pigmentációért felelős SCF (Liao és mtsai. 2017) kifejeződését. Emellett csökkentette a jól ismert katagén-induktor TGF- β 2 (Soma és mtsai. 2002) és EGF (Langan és mtsai. 2015) kifejeződését (**17. ábra**). Mindezen eredmények azt sugallják, hogy az adenzin anagén fázist- és hajnövekedést támogató hatásainak mediálásában az ORS keratinocitáknak jelentős szerepe van a HF egyes sejtcsoportjainak mezenchimális-epiteliális parakrin kommunikációja révén.

Az intrafollikuláris adenzin rendszer részt vesz a hajnövekedést fokozó szerek hatásának kifejlődésében. Nemrégiben fény derült rá, hogy a népszerű, hajnövesztő szerként ismert Minoxidil (Goren és Naccarato 2018) VEGF felszabadulást fokozó hatása DP sejteken valószínűleg adenzin mediálta intracelluláris Ca²⁺ felszabadulást fokozó hatás révén fejlődik ki, mivel ez a hatás részlegesen felfüggeszthetőnek bizonyult A₁ és A₂ receptorok

antagonizálásával (Li és mtsai. 2001). Habár a HF lokális adenzin termelés mechanizmusa nem ismert, irodalmi adatok olyan konnexin és pannexin csatornákat azonosítottak interfollikuláris keratinocitákon (Cowan és mtsai. 2012), melyek az ATP felszabadulásért felelősek (Lazarowski 2012), potenciális prekuzort szolgáltatva ezzel az adenzin termelődéséhez az intersticiális térben (Zimmermann 2000).

Habár a HF adenzin rendszerének pontos jellemzése még várat magára, eredményeink mégis mélyebb betekintést engednek nyújtani az adenzin szörnövekedést és intrafollikuláris proliferációt fokozó hatásába és közelebb visznek a potenciális jelátviteli folyamatok megértéséhez, ezen felül pedig rávilágítanak az ORS keratinociták adenzin szignalizációban betöltött központi szerepére. Mindezen eredmények alapján hangsúlyozottá válik az adenzin szörnövekedésben betöltött szerepe, valamint potenciális terápiai célpontként való alkalmazása a szörnövekedési rendellenességek kezelésében.

A koffein, mint potenciális hajciklus szabályozó molekula

A koffein szervezetre gyakorolt kedvező hatásainak széles spektruma miatt évszázadok óta áll az emberiség szolgálatában, mind élvezeti szerként, mind pedig magas biológiai aktivitásának köszönhetően kozmetikumokban történő felhasználása révén. A hajnövekedésre gyakorolt hatása a korábban társszerzőink munkássága nyomán, irodalmi adatok alapján ismeretes: a koffein az AGA-ban fokozott TST szint által telogén fázisban „megragadt” HF-k, újbóli anagén fázisba lépésének indukálásában játszik szerepet (Fischer, Hipler, és Elsner 2007). Emellett egyre növekszik azon klinikai tanulmányok száma, melyek a koffein önmagában, vagy más szerekkel kombinációban történő alkalmazásának hatékonyságát írják le az AGA-ban megjelenő hajvesztéssel szemben (Bussoletti és mtsai. 2010; Sisto és mtsai 2013; Golpour és mtsai. 2013).

Mivel a hajvesztéssel járó kóros állapotok egyre több embert érintenek, nem kímélve a nőket sem, jelen kísérleteinket női donorok bevonásával kiterjesztve vizsgáltuk a koffein hajciklus szabályozásában betöltött potenciális szerepét.

Elsőként megmutattuk női donorokból származó mikrodisszektált HF szervkultúrán, hogy a koffein képes ellensúlyozni a TST hossznövekedést gátló hatását (**18. ábra**), azonban fontos megjegyezni, hogy a női donorok HF-i érzékenyebben reagáltak az alkalmazott koffein koncentrációra, így a dózist csökkentettük a korábban férfiakon sikerrel alkalmazott koncentrációhoz képest.

A mögöttes intarfollikuláris folyamatok alaposabb megismerése érdekében immunfluoreszcens jelöléseket végeztünk és azt találtuk, hogy a koffein kezelés képes volt szignifikánsan fokozni a proliferáló MK-ák számát, ellensúlyozva ezzel a TST hatását (**19. ábra**) mind női, mind pedig férfi donorok esetén. Hisztomorfometriai analízist követően megállapítottuk, hogy – a MK-ák proliferációját fokozó hatása mellett – a koffein képes kivédeni a TST katagén fázist indukáló hatását, hiszen a koffeinnel együttesen alkalmazott TST kezelés esetén az anagén hajciklus fázisban lévő HF-k aránya nem mutatott csökkenést a kontroll csoporthoz képest (**23. ábra**).

Kísérleteinket primer ORS keratinocita sejt kultúra bevonásával kiterjesztve, különböző metodikai módszerek révén megmutattuk, hogy a koffein kezelés hatására a sejtek fokozott proliferációval (**20-21 ábra**), valamint csökkent apoptotikus rátával válaszoltak, még a katagén induktor TGF- β 2 és AEA jelenlétében is (**22. ábra**). Ezen eredményeink összhangban állnak a korábbi, egereken végzett kísérletek eredményeivel, miszerint a vaszkuláris sima izom sejteken a koffein fokozta a sejtek proliferációját, csökkentette az apoptózist és a reaktív oxigén gyökök felszabadulását (Mercer et al., 2012). Emellett képes volt felfüggeszteni a TST proliferációt gátló hatását humán epidermális keratinocitákon (Tsianakas, Hüsing, és Moll

2005), valamint képes helyreállítani a TST által károsított bőr barrier funkciókat humán vizsgálatokon alapuló *in vivo* tanulmányok szerint (Brandner és mtsai. 2006).

Eddigi eredményeink szerint – mikrodisszektált HF szervkultúrát és primer ORS keratinocita sejt kultúrát alkalmazva – a koffein anagén fázist megtartó, proliferációt fokozó és apoptózist csökkentő hatással bír ellensúlyozván a katagén fázist indukáló TST és TGF- β 2 hatását is. Kísérleteink következő szakaszában a koffein hajciklust szabályozó faktorok – a már korábban említett anagén fázist indukáló IGF-1 és a jól ismert katagén induktor TGF- β 2 – kifejeződésére gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Azt már korábban kimutatták, hogy a koffein más rendszerekben is sikeresen képes kivédeni a TGF- β 2 hatásait: protektív hatással bír patkány cirrózis modellben, csökkentve a szérum TGF- β 2 koncentrációját (Arauz és mtsai. 2013; Arauz és mtsai. 2014); gátolta májsejtekben a TGF- β 2 által fokozott kötőszöveti növekedési faktor (CTGF) felszabadulást (Gressner és mtsai. 2008), valamint gátolta az oxidált-glutation és TGF- β 1 fehérje expressziót kísérletes körülmények között direktén indukált patkány májgyulladásban (Furtado és mtsai. 2012).

Vizsgálataink során mikrodisszektált HF szervkultúrán immunfluoreszcens jelölést alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy a koffein hatékonyan ellensúlyozta férfiaknál a TST által indukált TGF- β 2 protein szintű kifejeződésének fokozódását, míg nőknél, habár a TST általi indukáló hatás elmaradt, szignifikánsan csökkentette a TGF- β 2 kifejeződését (**24. ábra**). Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a TST mindkét nemből katagén fázist indukáló hatással bír, a TGF- β 2 kifejeződésének mértékét önmagában azonban csak férfiaknál fokozta, nőknél ez a hatás elmaradt. Mindezek mellett a koffein fokozta az anagén fázis kialakulásában szerepet játszó IGF-1 fehérje szintű kifejeződését, férfiaknál ellensúlyozván ezzel a TST IGF-

I expresszióját csökkentő hatását, míg női donorokban önmagában alkalmazva a koffein szignifikáns IGF-1 emelkedést eredményezett (**25. ábra**).

Eddigi eredményeinket a hajciklus szabályozásában fontos reguláló faktorok termelésében kiemelt szerepet játszó primer ORS keratinocita sejt kultúrákon végzett vizsgálatainkkal is alátámasztottuk és hasonló eredményeket kaptunk: a koffein szignifikánsan csökkentette a TGF- β 2 expresszióját protein szinten és mindemellett fokozta az IGF-1 kifejeződését fehérje és gén szinten egyaránt ELISA és RT-qPCR technikákon alapuló vizsgálataink tanúsága szerint (**26-27. ábra**).

Eredményeink demonstrálják, hogy a koffein fokozza az *in situ* protein és gén szintű kifejeződését az IGF-1 szabályozó faktornak mind humán HF-kön, mind pedig ORS keratinocitákon. Ez jó összhangban áll azon eredményekkel, melyek szerint a hasnyálmirigyüktől részlegesen megfosztott diabéteszes patkányokban a hosszú távú koffein diéta fokozta az inzulin/IGF-1 jelátviteli folyamatok aktivitását és enyhítette az inzulin-rezisztenciát fokozva a glükóz metabolizmust (Park, Jang, és Hong 2007). Ez összefüggésben állhat azzal a ténnyel, hogy a HF szervkultúra tenyésztő médiumához adott inzulin a koffein hatását felerősítve fokozhatja az IGF1 felszabadulását és a hajnövekedés fokozódásához vezet. Irodalmi adatok alapján az öregedés során csökkent IGF-1 szint is hozzájárulhat a HF-k átmérőjének és sűrűségének csökkenéséhez (Zouboulis és Makrantonaki 2012), tehát a koffein, az IGF-1 expresszió fokozása révén késleltetheti az öregedést. Mindezek mellett a koffein fokozza a sejtek mitokondriális aktivitását is, melynek szintén fontos szerepe lehet a HF öregedést gátló és növekedést fokozó hatásában (Dragicevic et al., 2012). Nemrégiben kimutatták, hogy a koffein ellensúlyozza a HF-ben az UV károsodás okozta folyamatokat: csökkentette a TGF- β 2 kifejeződését, az apoptotizáló keratinociták számát, a DNS károsodást, a HF disztrófiát és citotoxicitást (Gherardini et al., 2019b) alátámasztva ezzel a koffein kiváló

antioxidáns tulajdonságait. Kimutatták azt is, hogy AGA-ban szenvedő férfi páciensek DP sejtei fokozott érzékenységgel reagáltak az oxidatív stresszre a nem kopaszodó társaikhoz képest (Bahta és mtsai. 2008). Mindezen ismeretek fényében úgy tűnik, hogy a koffein AGA-ban tapasztalt jótékony hatása több mechanizmus eredménye is lehet: az intrafollikuláris cAMP jelátvitel fokozott aktivitása mellett az IGF-1 termelés növekedése, és a TGF- β 2 valamint az oxidatív stressz csökkentése is stimulálhatja a HF-k növekedését. Eredményeink azt sugallják, hogy ezek a protektív hatások nőknél is klinikailag relevánsak lehetnek.

Elmondhatjuk tehát, hogy elsőként sikerült kimutatnunk, hogy a koffein képes befolyásolni a hajciklus szabályozásában központi szerepet játszó regulátor molekulák kifejeződését: bizonyosságot nyert, hogy a TST által indukált, katagén-induktor TGF- β 2 (Soma, Tsuji, és Hibino 2002) expresszióját a koffein kezelés szignifikánsan képes volt csökkenteni férfiaknál, míg női donoroknál a koffein jelentős mértékben redukálta a HF-k bazális TGF- β 2 expresszióját. Megvizsgáltuk az anagén fázis kialakításában szerepet játszó kulcs-molekula, az IGF-1 kifejeződésének változását is. Eredményeink szerint férfiaknál a koffein ebben az esetben is képes volt ellensúlyozni a TST gátló hatását és fokozta az IGF-1 expresszióját, emellett nőknél szintén emelte a bazális IGF-1 kifejeződését.

Összegezve eredményeinket elmondhatjuk, hogy az ORS keratinocitákon és mikrodisszektált HF szervkultúrákon végzett in vitro kísérleteink a koffein komplex szerepét bizonyítják a hajbiológiában. Mindezek felvetik a koffein potenciális terápiás szerként történő alkalmazását a haj- és szőrnövekedési rendellenességek kezelésében. Kísérleteink rávilágítanak a koffein hajnövekedést fokozó hatására a nemek közötti különbségek ellenére is és ez az első tanulmány, ahol női donorokból származó mikrodisszektált HF szervkultúrán végeztünk kísérleteket a koffein hatásaira vonatkozóan. Eredményeink szerint férfi donoroknál a leghatásosabb koncentrációnak a koffein 0,001%-ban történő alkalmazása bizonyult, mely

mege erősíti a korábbi, társzerzőink által publikált irodalmi adatokat (Fischer, Hipler, és Elsner 2007), míg női donorok esetén a koffein kezelésekre iránti fokozott érzékenységet tapasztaltunk, mely az irodalomban eddig nem került leírásra. A nemek közötti eltérő koffein-szenzitivitás háttérben álló folyamatok okának felderítése azonban egyelőre még nem tisztázott.

Feltételezett mechanizmus, avagy ahol a szálak összeérnek

A koffein a legtöbb biológiai hatását az adenozinerg tónus felfüggesztésével éri el az ADOR-ok gátlása révén. Felmerül tehát a kérdés: két, szerkezetükben nagymértékű analógiát mutató molekula, melyek egymással ellentétes molekuláris hatásokat válthatnak ki, hogyan befolyásolhatják mégis ugyanazon irányba a hajciklust? A kérdés megválaszolásához természetesen a mögöttes jelátviteli folyamatokat mélyebbrehatóan célzó kísérletes vizsgálatok szükségesek, így jelen feltevésünk hangsúlyozottan hipotetikus jellegű marad. Az adenzin A_{2B} receptoron keresztüli jelátviteli útvonalának potenciális állomása lehet az AC stimulációja, mely fokozott cAMP szintet eredményez. A koffein ezzel szemben (az ADOR-ok gátlása mellett) a cAMP lebontását is gátolhatja a PDE gátlásán keresztül, vagyis (az adenzinhez hasonlóan) fokozott cAMP szintet is eredményezhet (Boswell-Smith, Spina, és Page 2006).

A szőrnövekedésben tapasztalható nemi különbségekben szerepet játszhat a nemi hormonok eltérő hatása az intrafollikuláris másodlagos hírvivők szintjére. Irodalmi adatok szerint az ösztroen fokozza, a DHT pedig gátolja az AC működést – így előbbi növeli, míg utóbbi csökkenti a cAMP szintjét (Adachi és Kano 1970). Az AGA-ban jellemző emelkedett DHT szint és az erre genetikailag fokozott érzékenységgel reagáló HF-k a terminális haj fokozott vellus hajjá történő átalakulását, a későbbiek során pedig részleges vagy teljes kopaszodás kialakulását eredményezik (Kelly, Blanco, és Tosti 2016), melynek háttérben felmerülhet a DHT AC működést gátló és ezáltal cAMP szintet csökkentő szerepe. Koffeinnel végzett kísérleteink során a női donorok HF-i fokozott érzékenységet mutattak az alkaloid iránt.

Elképzelhető, hogy ebben az ösztrogének hatására fokozott AC aktivitás miatt nagyobb cAMP szint is szerepet játszik. Így a koffein PDE-t gátló hatása révén jelentősebb mértékben emelheti a cAMP szintet, mint a férfiak esetén, ahol az AC aktivitása kisebb.

Az emelkedett cAMP szint a különböző parakrin jelátviteli útvonalak működésének mediálása által szerepet játszhat az anagén fázis kialakítását stimuláló IGF-1 és SCF fokozott, valamint a katagén fázist indukáló TGF- β 2 és EGF csökkent mértékű kifejeződésében. A bemutatott eredményeink szerint ezen hajciklus szabályozó molekulák kifejeződésének mértéke jelentős változást mutatott az adenzin és koffein kezelése hatására. Feltételezhető, hogy az emelkedett cAMP szint mindemellett fokozza a HF környezetében a mikrocirkulációt és fokozott tápanyag és oxigén ellátást biztosít, mely nélkülözhetetlen a HF növekedése és fejlődése szempontjából. Habár ezen gondolatok teoretikus jellegűek a vélt hatásmechanizmust illetően, az irodalmi adatokkal jó összhangban elmondhatjuk, hogy egy mellékhatások nélküli, azonban rendkívül hatékonyan ígérkező koffein és/vagy adenzin alapú terápia alkalmazása megoldást nyújthat az AGA-ban szenvedőknek.

ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen kísérleteink során a szerteágazó fiziológiai funkciókkal rendelkező, lokálisan termelődő purin-származék adenzin, és a növényi eredetű, szintén széleskörű szisztémás hatásokat kifejteni képes, alkaloid vegyület, a koffein szőrnövekedésben betöltött szerepét vizsgáltuk.

Humán mikrodisszekált HF szervkultúrán végzett kísérleteink eredményei alapján megállapítottuk, hogy az adenzin jelentős mértékben fokozza a HF-k növekedését, a MK-ák proliferációját, és mindezek mellett anagén fázist megtartó hatással bír. Igazoltuk továbbá, hogy az adenzin képes kivédeni a TGF- β 2 katagén fázist-indukáló hatását. A lehetséges jelátviteli mechanizmusok után kutatva kimutattuk, hogy mind a négy ADOR altípus kifejeződik mind HF-kön, mind pedig izolált ORS keratinocitákon. ORS keratinocitákon végzett génexpressziós vizsgálataink eredménye szerint az adenzin fokozza az anagén fázist indukáló faktorok (IGF1R, SCF) és csökkenti a katagén-induktor TGF- β 2 és EGF kifejeződését. A látott hatások kifejlődéséért az ADOR mediálta útvonalak – legfőképpen az A_{2B} –tehetőek felelőssé.

Koffeinnel végzett kísérleteink során kimutattuk – női és férfi donoroknál egyaránt –, hogy a TST katagén indukáló hatását felfüggesztvén a koffein fokozza a HF-k növekedését, a proliferáló MK-ák számát, valamint anagén fázist fenntartó szereppel bír. ORS keratinocitákon végzett kísérleteink alátámasztották a koffein proliferációt fokozó és apoptózist csökkentő hatását. Kimutattuk, hogy a koffein a hajnövekedés szabályozásában szerepet játszó katagén-induktor TGF- β 2 szintjét csökkentette, míg az anagén fázis kialakításában szerepet játszó IGF-1 kifejeződését fokozta.

Eredményeink rávilágítanak az adenzin és koffein hajnövekedés szabályozásban betöltött kiemelkedő szerepére, hangsúlyozván ezzel potenciális terápiás alkalmazásuk lehetőségét.

SUMMARY

In our current experiments we investigated the effect of two substances with multiplex physiological roles: the locally produced purine-derivative adenosine, and the plant-derived alkaloid caffeine, to determine their role in hair growth.

Based on the results of experiments in human microdissected HF organocultures we determined that adenosine significantly increases HF growth, the proliferation of MKs and also supports the anagen phase. We also confirmed that adenosine was capable of abrogating the catagen-inducing effect of TGF- β 2. While investigating the signaling pathways downstream of adenosine application we showed that both HFs and isolated ORS keratinocytes express all four ADOR subtypes. Gene expression studies on ORS keratinocytes proved that adenosine increases the production of factors that induce anagen phase (IGFG1R, SCF) and, conversely, decreases the expression of catagen inducers TGF- β 2 and EGF. These effects were dependent on ADOR-mediated pathways, predominantly A_{2B}.

In our experiments with caffeine we showed that in both male and female donors caffeine increased HF growth, the number of proliferating MKs and supported the anagen phase by abrogating the catagen-inducing effect of TST. Further experiments on ORS keratinocytes supported these findings, since caffeine treatment of these cells increased their proliferation and decreased apoptosis. Gene expression analysis revealed that caffeine decreased the expression of catagen-inducing TGF- β 2 while increasing the expression of the anagen promoting factor IGF-1.

Our results highlight the importance of adenosine and caffeine in the regulation of hair growth, emphasising their potential therapeutic benefit.

IRODALOMJEGYZÉK

- Adachi, K., és M. Kano. 1970. „Adenyl Cyclase in Human Hair Follicles: Its Inhibition by Dihydrotestosterone”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 41 (4): 884–90. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(70\)90166-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(70)90166-x).
- Andl, T., K. Ahn, A. Kairo, E. Y. Chu, L. Wine-Lee, S. T. Reddy, N. J. Croft, és mtsai. 2004. „Epithelial Bmpr1a Regulates Differentiation and Proliferation in Postnatal Hair Follicles and Is Essential for Tooth Development”. *Development (Cambridge, England)* 131 (10): 2257–68. <https://doi.org/10.1242/dev.01125>.
- Arauz, J., M. Galicia- Moreno, P. Cortés-Reynosa, E. Pérez Salazar, és P. Muriel. 2013. „Coffee Attenuates Fibrosis by Decreasing the Expression of TGF- β and CTGF in a Murine Model of Liver Damage”. *Journal of Applied Toxicology: JAT* 33 (9): 970–79. <https://doi.org/10.1002/jat.2788>.
- Arauz, J., N. Zarco, J. Segovia, M. Shibayama, V. Tsutsumi, és P. Muriel. 2014. „Caffeine Prevents Experimental Liver Fibrosis by Blocking the Expression of TGF- β ”. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 26 (2): 164–73. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3283644e26>.
- Bahta, A. W., N. Farjo, B. Farjo, és M. P. Philpott. 2008. „Premature Senescence of Balding Dermal Papilla Cells in Vitro Is Associated with P16(INK4a) Expression”. *The Journal of Investigative Dermatology* 128 (5): 1088–94. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701147>.
- Bernard, B. A. 2012. „The Human Hair Follicle, a Bistable Organ?” *Experimental Dermatology* 21 (6): 401–3. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01457.x>.
- Bodó, E., T. Biro, A. Telek, G. Czifra, Z. Griger, B. I. Toth, A. Mescalchin, és mtsai. 2005. „A hot new twist to hair biology - Involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control”. *The American journal of pathology* 166 (május): 985–98.
- Borbíró, I., E. Lisztes, B. I. Tóth, G. Czifra, A. Oláh, A. G. Szöllosi, N. Szentandrassy, és mtsai. 2011. „Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid-3 Inhibits Human Hair Growth”. *The Journal of Investigative Dermatology* 131 (8): 1605–14. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.122>.
- Borea, P. A., S. Gessi, S. Merighi, és K. Varani. 2016. „Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does It Exert Its Protective Effects?” *Trends in Pharmacological Sciences* 37 (6): 419–34. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.02.006>.
- Borea, P. A., K. Varani, F. Vincenzi, P. G. Baraldi, M. A. Tabrizi, S. Merighi, és S. Gessi. 2015. „The A3 Adenosine Receptor: History and Perspectives”. *Pharmacological Reviews* 67 (1): 74–102. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008540>.
- Boswell-Smith, V., D. Spina, és C. P. Page. 2006. „Phosphodiesterase inhibitors”. *British Journal of Pharmacology* 147 (Suppl 1): S252–57. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706495>.
- Bouma, M. G., R. K. Stad, F. A. van den Wildenberg, és W. A. Buurman. 1994. „Differential Regulatory Effects of Adenosine on Cytokine Release by Activated Human Monocytes”. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 153 (9): 4159–68.
- Brandner, J. M., M. J. Behne, B. Huesing, és I. Moll. 2006. „Caffeine Improves Barrier Function in Male Skin”. *International Journal of Cosmetic Science* 28 (5): 343–47. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00346.x>.
- Breitkopf, T., G. Leung, M. Yu, E. Wang, és K. J. McElwee. 2013. „The Basic Science of Hair Biology: What Are the Causal Mechanisms for the Disordered Hair Follicle?” *Dermatologic Clinics* 31 (1): 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.det.2012.08.006>.
- Brownell, I., E. Guevara, C. B. Bai, C. A. Loomis, és A. L. Joyner. 2011. „Nerve-Derived Sonic Hedgehog Defines a Niche for Hair Follicle Stem Cells Capable of Becoming Epidermal Stem Cells”. *Cell Stem Cell* 8 (5): 552–65. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.02.021>.
- Buffoli, B., F. Rinaldi, M. Labanca, E. Sorbellini, A. Trink, E. Guanziroli, R. Rezzani, és L. F. Rodella. 2014. „The Human Hair: From Anatomy to Physiology”. *International Journal of Dermatology* 53 (3): 331–41. <https://doi.org/10.1111/ijd.12362>.

- Burlando, B. 2010. „Herbal Principles in Cosmetics: Properties and Mechanisms of Action”. CRC Press. 2010. június 23. <https://www.crcpress.com/Herbal-Principles-in-Cosmetics-Properties-and-Mechanisms-of-Action/Burlando-Verotta-Cornara-Bottini-Massa/p/book/9781439812136>.
- Burnstock, G. 2012. „Purinergic Signalling: Its Unpopular Beginning, Its Acceptance and Its Exciting Future”. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 34 (3): 218–25. <https://doi.org/10.1002/bies.201100130>.
- Burnstock, G., G. E. Knight, és A. V. H. Greig. 2012. „Purinergic Signaling in Healthy and Diseased Skin”. *The Journal of Investigative Dermatology* 132 (3 Pt 1): 526–46. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.344>.
- Bussoletti, C, F Mastropietro, M.V. Tolaini, és L. Celleno. 2010. „Use of a caffeine shampoo for the treatment of male androgenetic alopecia”. *Journal of Applied Cosmetology* 28 (október): 153–62.
- „Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug?” é. n. 2019. április 30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462044/>.
- Cappelletti, S., D. Piacentino, P. Daria, G. Sani, és M. Aromatario. 2015. „Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug?” *Current Neuropharmacology* 13 (1): 71–88. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666141210215655>.
- Chen, J. F., H. K. Eltzschig, és B. B. Fredholm. 2013. „Adenosine Receptors as Drug Targets--What Are the Challenges?” *Nature Reviews. Drug Discovery* 12 (4): 265–86. <https://doi.org/10.1038/nrd3955>.
- Cheng, C. C., K. Tsutsui, T. Taguchi, N. Sanzen, A. Nakagawa, K. Kakiguchi, S. Yonemura, és mtsai. 2018. „Hair Follicle Epidermal Stem Cells Define a Niche for Tactile Sensation”. *ELife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.38883>.
- Chesley, A., E. Hultman, és L. L. Spriet. 1995. „Effects of Epinephrine Infusion on Muscle Glycogenolysis during Intense Aerobic Exercise”. *The American Journal of Physiology* 268 (1 Pt 1): E127-134. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.268.1.E127>.
- Conney, A. H., P. Kramata, Y. R. Lou, és Y. P. Lu. 2008. „Effect of Caffeine on UVB-Induced Carcinogenesis, Apoptosis, and the Elimination of UVB-Induced Patches of P53 Mutant Epidermal Cells in SKH-1 Mice”. *Photochemistry and Photobiology* 84 (2): 330–38. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00263.x>.
- Cowan, K. N., S. Langlois, S. Penuela, B. J. Cowan, és D. W. Laird. 2012. „Pannexin1 and Pannexin3 Exhibit Distinct Localization Patterns in Human Skin Appendages and Are Regulated during Keratinocyte Differentiation and Carcinogenesis”. *Cell Communication & Adhesion* 19 (3–4): 45–53. <https://doi.org/10.3109/15419061.2012.712575>.
- Cunha, R. A. 2001. „Adenosine as a Neuromodulator and as a Homeostatic Regulator in the Nervous System: Different Roles, Different Sources and Different Receptors”. *Neurochemistry International* 38 (2): 107–25.
- Dhurat, R. P, és D. J. Deshpande. 2010. „Loose Anagen Hair Syndrome”. *International Journal of Trichology* 2 (2): 96–100. <https://doi.org/10.4103/0974-7753.77513>.
- Faas, M. M., T. Sáez, és P. de Vos. 2017. „Extracellular ATP and Adenosine: The Yin and Yang in Immune Responses?” *Molecular Aspects of Medicine* 55: 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.01.002>.
- Fernández, P., M. Perez-Aso, G. Smith, T. Wilder, S. Trzaska, L. Chiriboga, A. Franks, S. C. Robson, B. N. Cronstein, és E. S. L. Chan. 2013. „Extracellular Generation of Adenosine by the Ectonucleotidases CD39 and CD73 Promotes Dermal Fibrosis”. *The American Journal of Pathology* 183 (6): 1740–46. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.024>.
- Ferreira, J. M., és R. Paes-de-Carvalho. 2001. „Long-Term Activation of Adenosine A(2a) Receptors Blocks Glutamate Excitotoxicity in Cultures of Avian Retinal Neurons”. *Brain Research* 900 (2): 169–76. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02279-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02279-x).
- Fischer, T. W., U. C. Hipler, és P. Elsner. 2007. „Effect of Caffeine and Testosterone on the Proliferation of Human Hair Follicles in Vitro”. *International Journal of Dermatology* 46 (1): 27–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2007.03119.x>.
- Foitzik, K., G. Lindner, S. Mueller-Roeber, M. Maurer, N. Botchkareva, V. Botchkarev, B. Handjiski, és mtsai. 2000. „Control of Murine Hair Follicle Regression (Catagen) by TGF-Beta1 in Vivo”.

- FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (5): 752–60. <https://doi.org/10.1096/fasebj.14.5.752>.
- Fredholm, B. B., A. P. IJzerman, K. A. Jacobson, K. N. Klotz, és J. Linden. 2001. „International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors”. *Pharmacological Reviews* 53 (4): 527–52.
- Fredholm, B. B., A. P. IJzerman, K. A. Jacobson, J. Linden, és C. E. Müller. 2011. „International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—an Update”. *Pharmacological Reviews* 63 (1): 1–34. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003285>.
- Furtado, K. S., M. G. Prado, M. A. A. E Silva, M. C. Dias, D. P. Rivelli, M. A. M. Rodrigues, és L. F. Barbisan. 2012. „Coffee and Caffeine Protect against Liver Injury Induced by Thioacetamide in Male Wistar Rats”. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 111 (5): 339–47. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2012.00903.x>.
- Garattini, S. 1993. *Caffeine, Coffee, and Health*. New York: Raven Press. <http://books.google.com/books?id=MFBrAAAAMAAJ>.
- Gherardini, J., J. Wegner, J. Chéret, S. Ghatak, J. Lehmann, M. Alam, F. Jimenez, és mtsai. 2019. „Transepidermal UV Radiation of Scalp Skin Ex Vivo Induces Hair Follicle Damage That Is Alleviated by the Topical Treatment with Caffeine”. *International Journal of Cosmetic Science* 41 (2): 164–82. <https://doi.org/10.1111/ics.12521>.
- Gilhar, A., A. G. Schrum, A. Etzioni, H. Waldmann, és R. Paus. 2016. „Alopecia areata: Animal models illuminate autoimmune pathogenesis and novel immunotherapeutic strategies”. *Autoimmunity reviews* 15 (7): 726–35. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.03.008>.
- Golpour, M., H. Rabbani, D. Farzin, és F. Azizi. 2013. „Comparing the effectiveness of local solution of minoxidil and caffeine 2.5% with local solution of minoxidil 2.5% in treatment of androgenetic alopecia”. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 23: 29–36.
- Goren, A. és T. Naccarato. 2018. „Minoxidil in the Treatment of Androgenetic Alopecia”. *Dermatologic Therapy* 31 (5): e12686. <https://doi.org/10.1111/dth.12686>.
- Goren, A., J. Shapiro, J. Roberts, J. McCoy, N. Desai, Z. Zarrab, A. Pietrzak és T. Lotti. 2015. „Clinical Utility and Validity of Minoxidil Response Testing in Androgenetic Alopecia”. *Dermatologic Therapy* 28 (1): 13–16. <https://doi.org/10.1111/dth.12164>.
- Green, D. R. és J. C. Reed. 1998. „Mitochondria and Apoptosis”. *Science (New York, N.Y.)* 281 (5381): 1309–12. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309>.
- Gressner, O. A., B. Lahme, K. Rehbein, M. Siluschek, R. Weiskirchen és A. M. Gressner. 2008. „Pharmacological Application of Caffeine Inhibits TGF-Beta-Stimulated Connective Tissue Growth Factor Expression in Hepatocytes via PPARgamma and SMAD2/3-Dependent Pathways”. *Journal of Hepatology* 49 (5): 758–67. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.03.029>.
- Grgic, J., E. T. Trexler, B. Lazinica és Z. Pedisic. 2018. „Effects of Caffeine Intake on Muscle Strength and Power: A Systematic Review and Meta-Analysis”. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 15: 11. <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0216-0>.
- Gupta, M. és V. Mysore. 2016. „Classifications of Patterned Hair Loss: A Review”. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* 9 (1): 3–12. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.178536>.
- Hansen, L. A., N. Alexander, M. E. Hogan, J. P. Sundberg, A. Dlugosz, D. W. Threadgill, T. Magnuson és S. H. Yuspa. 1997. „Genetically Null Mice Reveal a Central Role for Epidermal Growth Factor Receptor in the Differentiation of the Hair Follicle and Normal Hair Development”. *The American Journal of Pathology* 150 (6): 1959–75.
- Haskó, Gy. és P. Pacher. 2008. „A2A Receptors in Inflammation and Injury: Lessons Learned from Transgenic Animals”. *Journal of Leukocyte Biology* 83 (3): 447–55. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607359>.
- Headington, J. T. 1987. „Hair Follicle Biology and Topical Minoxidil: Possible Mechanisms of Action”. *Dermatologica* 175 Suppl 2: 19–22.
- Heard, C. M., S. Johnson, G. Moss, és C. P. Thomas. 2006. „In Vitro Transdermal Delivery of Caffeine, Theobromine, Theophylline and Catechin from Extract of Guarana, Paullinia Cupana”. *International Journal of Pharmaceutics* 317 (1): 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.02.042>.

- Hébert, J. M., T. Rosenquist, J. Götz, és G. R. Martin. 1994. „FGF5 as a Regulator of the Hair Growth Cycle: Evidence from Targeted and Spontaneous Mutations”. *Cell* 78 (6): 1017–25. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90276-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90276-3).
- Herman, A., és A. P. Herman. 2013. „Caffeine’s Mechanisms of Action and Its Cosmetic Use”. *Skin Pharmacology and Physiology* 26 (1): 8–14. <https://doi.org/10.1159/000343174>.
- Higgins, C. A., G. E. Westgate és Colin A. B. Jahoda. 2009. „From Telogen to Exogen: Mechanisms Underlying Formation and Subsequent Loss of the Hair Club Fiber”. *The Journal of Investigative Dermatology* 129 (9): 2100–2108. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.66>.
- Huang, Z. L., W. M. Qu, N. Eguchi, J. F. Chen, M. A. Schwarzschild, B. B. Fredholm, Y. Urade és O. Hayaishi. 2005. „Adenosine A2A, but Not A1, Receptors Mediate the Arousal Effect of Caffeine”. *Nature Neuroscience* 8 (7): 858–59. <https://doi.org/10.1038/nn1491>.
- Hwang, K. A., Y. L. Hwang, M. H. Lee, N. R. Kim, S. S. Roh, Y. Lee, C. D. Kim, J. H. Lee és K. C. Choi. 2012. „Adenosine Stimulates Growth of Dermal Papilla and Lengthens the Anagen Phase by Increasing the Cysteine Level via Fibroblast Growth Factors 2 and 7 in an Organ Culture of Mouse Vibrissae Hair Follicles”. *International Journal of Molecular Medicine* 29 (2): 195–201. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.817>.
- Iino, M., R. Ehama, Y. Nakazawa, T. Iwabuchi, M. Ogo, M. Tajima és S. Arase. 2007. „Adenosine Stimulates Fibroblast Growth Factor-7 Gene Expression via Adenosine A2b Receptor Signaling in Dermal Papilla Cells”. *The Journal of Investigative Dermatology* 127 (6): 1318–25. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700728>.
- İslamoğlu, Z. G. K., és H. C. Altınyazar. 2019. „Effects of Isotretinoin on the Hair Cycle”. *Journal of Cosmetic Dermatology* 18 (2): 647–51. <https://doi.org/10.1111/jocd.12800>.
- Iwabuchi, T., R. Ideta, R. Ehama, H. Yamanishi, M. Iino, Y. Nakazawa, T. Kobayashi, M. Ohyama és J. Kishimoto. 2016. „Topical Adenosine Increases the Proportion of Thick Hair in Caucasian Men with Androgenetic Alopecia”. *The Journal of Dermatology* 43 (5): 567–70. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.13159>.
- Jacobson, K. A. és Z. G. Gao. 2006. „Adenosine Receptors as Therapeutic Targets”. *Nature Reviews. Drug Discovery* 5 (3): 247–64. <https://doi.org/10.1038/nrd1983>.
- Kárpáti S. 2019. „Bőrgyógyászat és venerológia”. 2019. <https://www.medicina-kiado.hu/kiadvanyaink/szak-es-tankonyvek/borgyogyaszat/borgyogyaszat-es-venerologia-2-javitott-kiadas/>.
- Keegan, A., L. M. Liao, és M. Boyle. 2003. „Hirsutism: A Psychological Analysis”. *Journal of Health Psychology* 8 (3): 327–45. <https://doi.org/10.1177/13591053030083004>.
- Kelly, Y., A. Blanco és A. Tosti. 2016. „Androgenetic Alopecia: An Update of Treatment Options”. *Drugs* 76 (14): 1349–64. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0629-5>.
- Keren, A., A. Shemer, Y. Ullmann, R. Paus és A. Gilhar. 2015. „The PDE4 Inhibitor, Apremilast, Suppresses Experimentally Induced Alopecia Areata in Human Skin in Vivo”. *Journal of Dermatological Science* 77 (1): 74–76. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.11.009>.
- Kerrigan, S. és T. Lindsey. 2005. „Fatal Caffeine Overdose: Two Case Reports”. *Forensic Science International* 153 (1): 67–69. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.04.016>.
- Kim, C., J. Shim, S. Han és I. Chang. 2002. „The Skin-Permeation-Enhancing Effect of Phosphatidylcholine: Caffeine as a Model Active Ingredient”. *Journal of Cosmetic Science* 53 (6): 363–74.
- King, A. E., M. A. Ackley, C. E. Cass, J. D. Young és S. A. Baldwin. 2006. „Nucleoside Transporters: From Scavengers to Novel Therapeutic Targets”. *Trends in Pharmacological Sciences* 27 (8): 416–25. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.06.004>.
- Kloepper, J. E., K. Sugawara, Y. Al-Nuaimi, E. Gáspár, N. van Beek és R. Paus. 2010. „Methods in Hair Research: How to Objectively Distinguish between Anagen and Catagen in Human Hair Follicle Organ Culture”. *Experimental Dermatology* 19 (3): 305–12. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00939.x>.
- Lademann, J., H. Richter, S. Schanzer, A. Klenk, W. Sterry és A. Patzelt. 2010. „Analysis of the Penetration of a Caffeine Containing Shampoo into the Hair Follicles by in Vivo Laser Scanning Microscopy”. *Laser Physics* 20 (2): 551–56. <https://doi.org/10.1134/S1054660X10030102>.

- Langan, E. A., M. P. Philpott, J. E. Kloeppe és R. Paus. 2015. „Human Hair Follicle Organ Culture: Theory, Application and Perspectives”. *Experimental Dermatology* 24 (12): 903–11. <https://doi.org/10.1111/exd.12836>.
- Lazarowski, E. R. 2012. „Vesicular and Conductive Mechanisms of Nucleotide Release”. *Purinergic Signalling* 8 (3): 359–73. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9304-9>.
- Lee, R. A. és M. J. Balick. 2006. „Rx: Caffeine”. *EXPLORE* 2 (1): 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.explore.2005.10.012>.
- Li, J. M, R. A. Fenton, H. B. Wheeler, C. C. Powell, B. D. Peyton, B. S. Cutler és J. G. Dobson. 1998. „Adenosine A2a Receptors Increase Arterial Endothelial Cell Nitric Oxide”. *The Journal of Surgical Research* 80 (2): 357–64.
- Li, M., A. Marubayashi, Y. Nakaya, K. Fukui és S. Arase. 2001. „Minoxidil-Induced Hair Growth Is Mediated by Adenosine in Cultured Dermal Papilla Cells: Possible Involvement of Sulfonylurea Receptor 2B as a Target of Minoxidil”. *The Journal of Investigative Dermatology* 117 (6): 1594–1600. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01570.x>.
- Liao, C. P., R. C. Booker, S. J. Morrison és L. Q. Le. 2017. „Identification of hair shaft progenitors that create a niche for hair pigmentation”. *Genes & Development* 31 (8): 744–56. <https://doi.org/10.1101/gad.298703.117>.
- Limat, A. és F. K. Noser. 1986. „Serial Cultivation of Single Keratinocytes from the Outer Root Sheath of Human Scalp Hair Follicles”. *The Journal of Investigative Dermatology* 87 (4): 485–88. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12455548>.
- Linden, J. 2005. „Adenosine in Tissue Protection and Tissue Regeneration”. *Molecular Pharmacology* 67 (5): 1385–87. <https://doi.org/10.1124/mol.105.011783>.
- Magerl, M., R. Paus, N. Farjo, S. Müller-Röver, E. M. J. Peters, K. Foitzik és D. J. Tobin. 2004. „Limitations of Human Occipital Scalp Hair Follicle Organ Culture for Studying the Effects of Minoxidil as a Hair Growth Enhancer”. *Experimental Dermatology* 13 (10): 635–42. <https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2004.00207.x>.
- Marchese, C., J. Rubin, D. Ron, A. Faggioni, M. R. Torrisi, A. Messina, L. Frati és S. A. Aaronson. 1990. „Human Keratinocyte Growth Factor Activity on Proliferation and Differentiation of Human Keratinocytes: Differentiation Response Distinguishes KGF from EGF Family”. *Journal of Cellular Physiology* 144 (2): 326–32. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041440219>.
- McNeil Products Ltd. 2018. „Regaine for Men Extra Strength - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (eMC)”. 2018. május 10. <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/16535>.
- Mendonça, A. és J. A. Ribeiro. 2001. „Adenosine and Synaptic Plasticity”. *Drug Development Research* 52 (1–2): 283–90. <https://doi.org/10.1002/ddr.1125>.
- Mikhaylov, D., A. Pavel, C. Yao, G. Kimmel, J. Nia, P. Hashim, A. S. Vekaria és mtsai. 2019. „A Randomized Placebo-Controlled Single-Center Pilot Study of the Safety and Efficacy of Apremilast in Subjects with Moderate-to-Severe Alopecia Areata”. *Archives of Dermatological Research* 311 (1): 29–36. <https://doi.org/10.1007/s00403-018-1876-y>.
- Nawrot, P., S. Jordan, J. Eastwood, J. Rotstein, A. Hugenholtz és M. Feeley. 2003. „Effects of Caffeine on Human Health”. *Food Additives and Contaminants* 20 (1): 1–30. <https://doi.org/10.1080/0265203021000007840>.
- Nehlig, A., J. L. Daval és G. Debry. 1992. „Caffeine and the Central Nervous System: Mechanisms of Action, Biochemical, Metabolic and Psychostimulant Effects”. *Brain Research. Brain Research Reviews* 17 (2): 139–70.
- Oh, J. W., J. Kloeppe, E. A. Langan, Y. Kim, J. Yeo, M. J. Kim, T. C. Hsi és mtsai. 2016. „A guide to studying human hair follicle cycling in vivo”. *The Journal of investigative dermatology* 136 (1): 34–44. <https://doi.org/10.1038/JID.2015.354>.
- Oláh, A., B. I. Tóth, I. Borbíró, K. Sugawara, A. G. Szöllősi, G. Czifra, B. Pál és mtsai. 2014. „Cannabidiol Exerts Sebostatic and Antiinflammatory Effects on Human Sebocytes”. *The Journal of Clinical Investigation* 124 (9): 3713–24. <https://doi.org/10.1172/JCI64628>.
- Otberg, N., A. Patzelt, U. Rasulev, T. Hagemester, M. Linscheid, R. Sinkgraven, W. Sterry és J. Lademann. 2008. „The Role of Hair Follicles in the Percutaneous Absorption of Caffeine”. *British Journal of Clinical Pharmacology* 65 (4): 488–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.03065.x>.

- Oura, H., M. Iino, Y. Nakazawa, M. Tajima, R. Ideta, Y. Nakaya, S. Arase és J. Kishimoto. 2008. „Adenosine Increases Anagen Hair Growth and Thick Hairs in Japanese Women with Female Pattern Hair Loss: A Pilot, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial”. *The Journal of Dermatology* 35 (12): 763–67. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2008.00564.x>.
- Panteleyev, A. A., C. A. Jahoda és A. M. Christiano. 2001. „Hair Follicle Predetermination”. *Journal of Cell Science* 114 (Pt 19): 3419–31.
- Pardo, M., L. Lopez-Cruz, O. Valverde, C. Ledent, Y. Baqi, C. E. Müller, J. D. Salamone és M. Correa. 2012. „Adenosine A2A Receptor Antagonism and Genetic Deletion Attenuate the Effects of Dopamine D2 Antagonism on Effort-Based Decision Making in Mice”. *Neuropharmacology* 62 (5–6): 2068–77. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.12.033>.
- Park, S., J. S. Jang és S. M. Hong. 2007. „Long-Term Consumption of Caffeine Improves Glucose Homeostasis by Enhancing Insulinotropic Action through Islet Insulin/Insulin-like Growth Factor 1 Signaling in Diabetic Rats”. *Metabolism: Clinical and Experimental* 56 (5): 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2006.12.004>.
- Paus, R. 1998. „Principles of Hair Cycle Control”. *The Journal of Dermatology* 25 (12): 793–802.
- Paus, R., P. Arck és S. Tiede. 2008. „(Neuro-)endocrinology of epithelial hair follicle stem cells”. *Molecular and cellular endocrinology* 288 (július): 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.02.023>.
- Paus, R. és G. Cotsarelis. 1999. „The Biology of Hair Follicles”. *The New England journal of medicine* 341 (szeptember): 491–97. <https://doi.org/10.1056/NEJM199908123410706>.
- Paus, R., N. Ito, M. Takigawa és T. Ito. 2003. „The Hair Follicle and Immune Privilege”. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings* 8 (2): 188–94. <https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2003.00807.x>.
- Paus, R., E. A. Langan, S. Vidali, Y. Ramot és B. Andersen. 2014. „Neuroendocrinology of the Hair Follicle: Principles and Clinical Perspectives”. *Trends in Molecular Medicine* 20 (10): 559–70. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.002>.
- Paus, R., B. J. Nickoloff és T. Ito. 2005. „A »hairy« Privilege”. *Trends in Immunology* 26 (1): 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.014>.
- Peleli, M. és M. Carlstrom. 2017. „Adenosine Signaling in Diabetes Mellitus and Associated Cardiovascular and Renal Complications”. *Molecular Aspects of Medicine* 55: 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.12.001>.
- Philpott, M. P., M. R. Green és T. Kealey. 1990. „Human Hair Growth in Vitro”. *Journal of Cell Science* 97 (Pt 3): 463–71.
- Philpott, M. P., D. Sanders, G. E. Westgate és T. Kealey. 1994. „Human Hair Growth in Vitro: A Model for the Study of Hair Follicle Biology”. *Journal of Dermatological Science* 7 Suppl (július): S55-72.
- Philpott, M. P. 2018. „Culture of the Human Pilosebaceous Unit, Hair Follicle and Sebaceous Gland”. *Experimental Dermatology* 27 (5): 571–77. <https://doi.org/10.1111/exd.13669>.
- Poltev, V., E. Rodriguez, T. Grokhlina, A. Teplukhin, A. Deriabina és E. Gonzalez. 2010. „Computational Study of Molecular Mechanisms of Caffeine Actions”. In .
- Ramot, Y., M. Alam, A. Oláh, T. Bíró, L. Ponce, J. Chéret, M. Bertolini és Ralf Paus. 2018. „Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ -Mediated Signaling Regulates Mitochondrial Energy Metabolism in Human Hair Follicle Epithelium”. *The Journal of Investigative Dermatology* 138 (7): 1656–59. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.01.033>.
- Randall, V. A. és N. V. Botchkareva. 2009. „Chapter 1 - The Biology of Hair Growth”. In *Cosmetics Applications of Laser & Light-Based Systems*, szerkesztette Gurpreet S. Ahluwalia, 3–35. Personal Care & Cosmetic Technology. Boston: William Andrew Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-1572-2.50006-3>.
- Reynolds, A. J. és C. A. Jahoda. 1996. „Hair Matrix Germinative Epidermal Cells Confer Follicle-Inducing Capabilities on Dermal Sheath and High Passage Papilla Cells”. *Development (Cambridge, England)* 122 (10): 3085–94.
- Reynolds, A. J., C. Lawrence, P. B. Cserhalmi-Friedman, A. M. Christiano és C. A. Jahoda. 1999. „Trans-Gender Induction of Hair Follicles”. *Nature* 402 (6757): 33–34. <https://doi.org/10.1038/46938>.

- Rosenbaum, D. M., S. G. F. Rasmussen és B. K. Kobilka. 2009. „The structure and function of G-protein-coupled receptors”. *Nature* 459 (7245): 356–63. <https://doi.org/10.1038/nature08144>.
- Ross, M. H., 2007. *Szövevény. Medicina Könyvkiadó Zrt.* https://www.libri.hu/konyv/michael_h_ross.szovetten.html.
- Salvatore, C. A., M. A. Jacobson, H. E. Taylor, J. Linden és R. G. Johnson. 1993. „Molecular Cloning and Characterization of the Human A3 Adenosine Receptor”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (21): 10365–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.10365>.
- Schmidt-Ullrich, R. és R. Paus. 2005. „Molecular Principles of Hair Follicle Induction and Morphogenesis”. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 27 (3): 247–61. <https://doi.org/10.1002/bies.20184>.
- Schneider, M. R., R. Schmidt-Ullrich és R. Paus. 2009. „The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan”. *Current Biology: CB* 19 (3): R132-142. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.005>.
- Scholzen, T. és J. Gerdes. 2000. „The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown”. *Journal of Cellular Physiology* 182 (3): 311–22. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9).
- Schulte, G. és B. B. Fredholm. 2003. „Signalling from Adenosine Receptors to Mitogen-Activated Protein Kinases”. *Cellular Signalling* 15 (9): 813–27.
- Sebastião, A. M. és J. A. Ribeiro. 2000. „Fine-Tuning Neuromodulation by Adenosine”. *Trends in Pharmacological Sciences* 21 (9): 341–46.
- Shakeel, F. és W. Ramadan. 2010. „Transdermal Delivery of Anticancer Drug Caffeine from Water-in-Oil Nanoemulsions”. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 75 (1): 356–62. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.010>.
- Sheikh A. A., A. Saifuddin. 2015. „A New Topical Formulation of Minoxidil and Finasteride Improves Hair Growth in Men with Androgenetic Alopecia”. *Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research* 06. <https://doi.org/10.4172/2155-9554.1000253>.
- Sheth, S., R. Brito, D. Mukherjea, L. P. Rybak és V. Ramkumar. 2014. „Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation”. *International Journal of Molecular Sciences* 15 (2): 2024–52. <https://doi.org/10.3390/ijms15022024>.
- Silva-Vilches, C., S. Ring, J. Schrader, B. E. Clausen, H. C. Probst, F. Melchior, H. Schild, A. Enk és K. Mahnke. 2019. „Production of Extracellular Adenosine by CD73+ Dendritic Cells Is Crucial for Induction of Tolerance in Contact Hypersensitivity Reactions”. *The Journal of Investigative Dermatology* 139 (3): 541–51. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.10.016>.
- Sisto, T., C. Bussoletti és L. Celleno. 2013. „Efficacy of a cosmetic caffeine shampoo in androgenetic alopecia management. II Note”. *Journal of Applied Cosmetology* 31: 57–66.
- Soma, T., Y. Tsuji és T. Hibino. 2002. „Involvement of Transforming Growth Factor-Beta2 in Catagen Induction during the Human Hair Cycle”. *The Journal of Investigative Dermatology* 118 (6): 993–97. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01746.x>.
- Stenn, K. S. és R. Paus. 2001. „Controls of Hair Follicle Cycling”. *Physiological Reviews* 81 (1): 449–94. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.449>.
- Stevens, J. és S. Khetarpal. 2018. „Platelet-rich plasma for androgenetic alopecia: A review of the literature and proposed treatment protocol”. *International Journal of Women's Dermatology* 5 (1): 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2018.08.004>.
- Suárez-Farinas, M., B. Ungar, S. Noda, A. Shroff, Y. Mansouri, J. Fuentes-Duculan, A. Czernik és mtsai. 2015. „Alopecia Areata Profiling Shows TH1, TH2, and IL-23 Cytokine Activation without Parallel TH17/TH22 Skewing”. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136 (5): 1277–87. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.06.032>.
- Sun, T. T., G. Cotsarelis és R. M. Lavker. 1991. „Hair Follicular Stem Cells: The Bulge-Activation Hypothesis”. *The Journal of Investigative Dermatology* 96 (5): 77S-78S. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12471959>.
- Szabó, I. L., E. Herczeg-Lisztes, G. Béke, K. F. Tóth, R. Paus, A. Oláh, és T. Bíró. 2019. „The Phytocannabinoid (-)-Cannabidiol (CBD) Operates as a Complex, Differential Modulator of Human Hair Growth: Anti-Inflammatory Submicromolar versus Hair Growth Inhibitory Micromolar Effects”. *The Journal of Investigative Dermatology*, július. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.07.690>.

- Szabó, I. L., E. Herczeg-Lisztes, A. Szegedi, B. Nemes, R. Paus, T. Bíró és A. G. Szöllősi. 2019. „TRPV4 Is Expressed in Human Hair Follicles and Inhibits Hair Growth In Vitro”. *The Journal of Investigative Dermatology* 139 (6): 1385–88. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.11.020>.
- Teichmann, A., H. Richter, F. Knorr, Ch Antoniou, W. Sterry és J. Lademann. 2007. „Investigation of the Penetration and Storage of a Shampoo Formulation Containing Caffeine into the Hair Follicles by in Vivo Laser Scanning Microscopy”. *Laser Physics Letters* 4 (6): 464. <https://doi.org/10.1002/lapl.200710007>.
- Telek, A., T. Bíró, E. Bodó, B. I. Tóth, I. Borbíró, G. Kunos és R. Paus. 2007. „Inhibition of Human Hair Follicle Growth by Endo- and Exocannabinoids”. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (13): 3534–41. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7689com>.
- Tóth, B. I., Sz. Benkő, A. G. Szöllősi, L. Kovács, E. Rajnavölgyi és T. Bíró. 2009. „Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Signaling Inhibits Differentiation and Activation of Human Dendritic Cells”. *FEBS Letters* 583 (10): 1619–24. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.031>.
- Tóth, K. F., D. Ádám, T. Bíró és A. Oláh. 2019. „Cannabinoid Signaling in the Skin: Therapeutic Potential of the »C(Ut)Annabinoid« System”. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (5). <https://doi.org/10.3390/molecules24050918>.
- Trauer, S., J. Lademann, F. Knorr, H. Richter, M. Liebsch, C. Rozycki, G. Balizs, R. Büttemeyer, M. Linscheid és A. Patzelt. 2010. „Development of an in Vitro Modified Skin Absorption Test for the Investigation of the Follicular Penetration Pathway of Caffeine”. *Skin Pharmacology and Physiology* 23 (6): 320–27. <https://doi.org/10.1159/000313514>.
- Trauer, S., A. Patzelt, N. Otberg, F. Knorr, C. Rozycki, G. Balizs, R. Büttemeyer, M. Linscheid, M. Liebsch és J. Lademann. 2009. „Permeation of Topically Applied Caffeine through Human Skin—a Comparison of in Vivo and in Vitro Data”. *British Journal of Clinical Pharmacology* 68 (2): 181–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03463.x>.
- Tsianakas, A., B. Hüsing és I. Moll. 2005. „An ex vivo model of male skin–caffeine coneracts testosterone effects”. *Arch Dermatol Res* 296: 450.
- Van der Graaf, P. H., E. A. Van Schaick, S. A. Visser, H. J. De Greef, A. P. Ijzerman és M. Danhof. 1999. „Mechanism-Based Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Antilipolytic Effects of Adenosine A(1) Receptor Agonists in Rats: Prediction of Tissue-Dependent Efficacy in Vivo”. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290 (2): 702–9.
- Watanabe, Y., T. Nagashima, N. Hanzawa, A. Ishino, Y. Nakazawa, M. Ogo, T. Iwabuchi és M. Tajima. 2015. „Topical Adenosine Increases Thick Hair Ratio in Japanese Men with Androgenetic Alopecia”. *International Journal of Cosmetic Science* 37 (6): 579–87. <https://doi.org/10.1111/ics.12235>.
- Weger, N. és T. Schlake. 2005. „Igf-I Signalling Controls the Hair Growth Cycle and the Differentiation of Hair Shafts”. *The Journal of Investigative Dermatology* 125 (5): 873–82. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23946.x>.
- Weinberg, B. A., B. A. Weinberg és B. K. Bealer. 2001. *The World of Caffeine: The Science and Culture of the World's Most Popular Drug*. Psychology Press.
- Wosicka, H. és K. Cal. 2010. „Targeting to the Hair Follicles: Current Status and Potential”. *Journal of Dermatological Science* 57 (2): 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.12.005>.
- Xing, L., Z. Dai, A. Jabbari, J. E. Cerise, C. A. Higgins, W. Gong, A. de Jong és mtsai. 2014. „Alopecia Areata Is Driven by Cytotoxic T Lymphocytes and Is Reversed by JAK Inhibition”. *Nature Medicine* 20 (9): 1043–49. <https://doi.org/10.1038/nm.3645>.
- Zhang, B. és Y. C. Hsu. 2017. „Emerging roles of transit-amplifying cells in tissue regeneration and cancer”. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 6 (5). <https://doi.org/10.1002/wdev.282>.
- Zimmermann, H. 2000. „Extracellular Metabolism of ATP and Other Nucleotides”. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 362 (4–5): 299–309. <https://doi.org/10.1007/s002100000309>.
- Zouboulis, C. C. és E. Makrantonaki. 2012. „Hormonal Therapy of Intrinsic Aging”. *Rejuvenation Research* 15 (3): 302–12. <https://doi.org/10.1089/rej.2011.1249>.

TÁRGYSZAVAK

Adenozin, ADOR, *androgén alopecia*, apoptózis, HF, IGF-1, koffein, ORS keratinocita, proliferáció, TGF- β 2.

KEY WORDS

Adenosine, ADOR, *androgenetic alopecia*, apoptosis, HF, IGF-1, caffeine, ORS keratinocyte, proliferation, TGF- β 2.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok **Dr. Csernoch László professzor úrnak**, az Élettani Intézet és doktori iskolánk vezetőjének, amiért lehetőséget és teret adott munkám elvégzése számára.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek **Prof. Dr. Bíró Tamásnak**, aki szakmai tanácsain túlmenően barátilag is irányt mutatott és mindvégig támogatott ezen végtelennek tűnő hosszú út során.

Köszönöm a kollaborációs partnereinknek, hogy segítségükkel és tudásukkal hozzájárultak munkám sikeréhez. Különös tekintettel **Prof. Dr. Ralf Paus-nak** és az általa vezetett munkacsoportnak, hogy lehetővé tették számomra a szórtüszőkkel való bánásmód elsajátításának csínját-bínját. Ezen túlmenően szeretném megköszönni **Tobias Fischernek** a közös munkát.

Mérhetetlenül hálás vagyok **Dr. Oláh Attilának**, **Dr. Szöllősi Attila Gábornak** és **Dr. Tóth István Balázsnak**; magas szintű szakmai tudásukra és baráti tanácsaikra mindig és mindenkor számíthattam.

Külön köszönettel tartozom mostani és egykori közvetlen kollégáimnak és barátaimnak; **Hollósi Erikának**, **Dr. Zákány Nórának**, **Dr. Szabó Imre Lőrincnek**, **Dr. Molnárné Dr. Vasas Nikolettnek** felbecsülhetetlen segítségükért és baráti szavaikért.

Köszönet illeti egykori TDK hallgatómat **Dr. Evie Green-t**, aki szorgalmával és precíz munkájával jelentős részben hozzájárult a kísérletes munka elkészültéhez.

Közvetlen kollégáimnak, **Dr. Czifra Gabriellának** és **Kiss Gyulánénak** köszönöm a sok segítséget, amelyet nap, mint nap nyújtottak, és köszönöm, hogy bármikor számíthattam rájuk.

Végezetül köszönöm az **Élettani Intézet valamennyi dolgozójának**, **PhD és TDK hallgatójának**, akik az évek során segítettek munkámat.

Legvégül, de közel sem utolsó sorban szeretném kifejezni hálámat a **Családom** irányába, amiért megmutatták honnan jövök, ki vagyok, és merre tartok. Külön köszönöm a férjemnek, **Dr. Herczeg Mihálynak** és gyermekemnek, **Herczeg Csengének** a végtelen nagy türelmet és odaadást amivel irántam viseltettek.

FÜGGELÉK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/330/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Herczeg-Lisztes Erika
Neptun kód: JVB24Q
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10035949

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Herczeg-Lisztes, E.**, Tóth, I. B., Bertolini, M., Szabó, I. L., Zákány, N., Oláh, A., Szöllősi, A. G., Paus, R., Bíró, T.: Adenosine promotes human hair growth and inhibits catagen transition in vitro: role of the outer root sheath keratinocytes.
J. Invest. Dermatol. "Accepted by Publisher", 2019.
IF: 6.29 (2018)
2. Fischer, T. W., **Herczeg-Lisztes, E.**, Funk, W., Zillikens, D., Bíró, T., Paus, R.: Differential effects of caffeine on hair shaft elongation, matrix and outer root sheath keratinocyte proliferation, and TGF- β 2-/IGF-1-mediated regulation of hair cycle in male and female human hair follicles in vitro.
Br. J. Dermatol. 171 (5), 1031-1043, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bjd.13114>
IF: 4.275





További közlemények

3. Szabó, I. L., **Herczeg-Lisztes, E.**, Béke, G., Tóth, K. F., Paus, R., Oláh, A., Bíró, T.: The phytocannabinoid (-)-cannabidiol (CBD) operates as a complex, differential modulator of human hair growth: anti-inflammatory submicromolar versus hair growth inhibitory micromolar effects.
J. Invest. Dermatol. [Epub ahead of print], 1-11, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2019.07.690>
IF: 6.29 (2018)
4. Szöllösi, A. G., Vasas, N., Angyal, Á., Kistamás, K., Nánási, P. P., Mihály, J., Béke, G., **Herczeg-Lisztes, E.**, Szegedi, A., Kawada, N., Yanagida, T., Mori, T., Kemény, L., Bíró, T.: Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes.
J. Invest. Dermatol. 138 (2), 365-374, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2017.07.852>
IF: 6.29
5. Szabó, I. L., **Herczeg-Lisztes, E.**, Szegedi, A., Nemes, B. Á., Paus, R., Bíró, T., Szöllösi, A. G.: TRPV4 Is Expressed in Human Hair Follicles and Inhibits Hair Growth In Vitro.
J. Invest. Dermatol. 139 (6), 1385-1388, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2018.11.020>
IF: 6.29
6. Ramot, Y., Mastrofrancesco, A., **Herczeg-Lisztes, E.**, Bíró, T., Picardo, M., Kloepper, J. E., Paus, R.: Advanced Inhibition of Undesired Human Hair Growth by PPAR γ Modulation.
J. Invest. Dermatol. 134 (4), 1128-1131, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.473>
IF: 7.216
7. Langan, E. A., **Herczeg-Lisztes, E.**, Bíró, T., Funk, W., Kloepper, J. E., Griffiths, C. E. M., Paus, R.: Dopamine is a novel, direct inducer of catagen in human scalp hair follicles in vitro.
Br. J. Dermatol. 168 (3), 520-525, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bjd.12113>
IF: 4.1
8. Langan, E. A., Vidali, S., Pigat, N., Funk, W., **Herczeg-Lisztes, E.**, Bíró, T., Goffin, V., Griffiths, C. E. M., Paus, R.: Tumour necrosis factor alpha, interferon gamma and substance P are novel modulators of extrapituitary prolactin expression in human skin.
PLoS One. 8 (4), e60819, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060819>
IF: 3.534





9. Borbíró, I., **Herczeg-Lisztes, E.**, Tóth, I. B., Czifra, G., Oláh, A., Szöllősi, A. G., Szentandrassy, N., Nánási, P. P., Paus, R., Kovács, L., Bíró, T.: Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth.
J. Invest. Dermatol. 131 (8), 1605-1614, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.122>
IF: 6.314
10. Ramot, Y., Zhang, G., Bíró, T., **Herczeg-Lisztes, E.**, Funk, W., Ingber, A., Langbein, L., Paus, R.: TSH is a novel neuroendocrine regulator of selected keratins in the human hair follicle.
J. Dermatol. Sci. 64 (1), 67-70, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.06.005>
IF: 3.718

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 54,317

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
10,565**

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

Debrecen, 2019.09.30.



FÜGGELÉK

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények