

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A tranziens receptor potenciál vanilloid ioncsatornák élettani és farmakológiai jelentőségének vizsgálata humán szőrtüszőn

Dr. Szabó Imre Lőrinc

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022.

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK	5
2. BEVEZETÉS.....	7
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
3.1. A szőrtüsző felépítése, élettana, életciklusa és különböző folyamatainak szabályozása	8
3.1.1. A bőr felépítése, élettani alapjai	8
3.1.2. A szőrtüsző embrionális fejlődése, morfogenezise	11
3.1.3. A szőrtüsző felépítése és változása a szőrtüsző életciklusa, a „hajciklus” során...14	
3.1.3.1. Az anagén fázis	16
3.1.4.2. Az anagén-katagén átmenet és a katagén fázis	19
3.1.4.3. A telogén fázis alatt játszódó folyamatok, átmenet az újabb, következő anagén fázisba.....	20
3.1.4. A hajciklus szabályozása	21
3.1.4.1. Hormonális szabályozás.....	21
3.1.4.2 A hajciklus és a szőrtüsző egyéb biológiai folyamatainak parakrin szabályozása, különös tekintettel az adenozinra	24
3.1.5. A szőrtüsző biológiájának immunológiai vonatkozásai.....	28
3.1.5.1. Gyulladás a szőrtüszőben, illetve a gyulladásban résztvevő faktorok egyéb jelentősége a szőrbiológiában	28
3.1.5.2. Immunprivilegium és jelentősége	30
3.1.5.3. Immunmechanizmusú patológiás állapotok a szőrtüszőben, alopecia areata	31
3.2. A tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatorna szupercsalád és az endokannabinoid rendszer általános jellemzése és a bőrben betöltött szerepük.....	32
3.2.1. A TRP csatornák.....	32
3.2.2. A TRPV4 általános jellemzése	33
3.2.2.1. A TRPV4 szerepe a bőrben	37
3.2.3. Az endokannabinoid rendszer	38
3.2.3.1 Az endokannabinoid rendszer szerepe a bőr élettani működésében	39
3.2.4. A növényi eredetű kannabinoid vegyületek (fitokannabinoidok) és ezek lehetséges alkalmazása a bőrgyógyászatban	41
4. CÉLKITŰZÉS.....	47

4.1.	A TRPV4 funkcionális expressziójának vizsgálata szórtüszőn	47
4.2.	A CBD hatásainak, illetve a hatást közvetítő receptorok vizsgálata szórtüszőn	47
5.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	48
5.1.	A kísérletek során a különböző kezelésekre felhasznált ágensek	48
5.2.	A humán szórtüsző szervkultúra	48
5.3.	Primer humán ORSK-k izolálása és tenyésztése	49
5.4.	A TRPV4 ioncsatorna immunfluoreszcens jelölése humán szórtüszőn és primer humán ORSK tenyészetben	50
5.5.	A szórtüsző elongáció vizsgálata	52
5.6.	Hajciklus hisztomorfometriai analízise szórtüszők gyorsfagyasztott metszetein	52
5.7.	A szórtüszők mátrix keratinocitáinak proliferáció/apoptózis-vizsgálata - Ki-67/TUNEL kettős jelölés	53
5.8.	Valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)	55
5.9.	Fluoreszcens Ca^{2+} -mérés	56
5.9.1.	Mikrofluorimetriás intracelluláris Ca^{2+} -mérés	56
5.9.2.	Hőstimulussal kiváltott Ca^{2+} -beáramlás mérése	58
5.10.	Sejtproliferáció vizsgálata – CyQUANT-assay	59
5.11.	Életképesség vizsgálata – MTT-assay	59
5.12.	Apoptózis vizsgálata – DilC-assay	60
5.13.	Nekrózis vizsgálata – SYTOX-assay	60
5.14.	Statisztikai analízis	61
5.15.	A kísérletes munka kivitelezése	61
6.	EREDMÉNYEK	62
6.1.	A TRPV4 funkcionális vizsgálata szórtüszőn	62
6.1.1.	A TRPV4 ioncsatorna kifejeződése és eloszlása a szórtüsző kompartmentjeiben	62
6.1.2.	A TRPV4 aktiváció gátolta az <i>ex vivo</i> szórnövekedést	62
6.1.3.	A TRPV4 aktiváció a szórtüszőn katagén fázist indukált <i>ex vivo</i> körülmények között	64
6.1.4.	A TRPV4 aktiváció hatására a szórtüsző mátrix keratinocitáinak proliferációs, illetve apoptotikus folyamatai a katagénre jellemző irányba változtak	66
6.1.5.	A TRPV4 működés vizsgálata az ORSK-k Ca^{2+} -homeosztázisára	68

6.1.6. A TRPV4 részt vesz az ORSK-k hőstimulusra adott Ca ²⁺ -beáramlásának közvetítésében <i>in vitro</i>	69
6.1.7. A TRPV4 aktiváció nem befolyásolta az ORSK-k életképességét, ugyanakkor apoptózist indukált <i>in vitro</i>	70
6.2. A CBD hatásai a szőrtüsző biológiai folyamataira	72
6.2.1. A CBD alacsony koncentrációban tendenciózusan fokozta, magas koncentrációban szignifikánsan gátolta a szőrnövekedést <i>ex vivo</i>	72
6.2.2. A CBD magas koncentrációban <i>ex vivo</i> katagen fázist indukált	73
6.2.3. A CBD magas koncentrációban fokozta a mátrix keratinociták apoptózisát, és gátolta a proliferációt	74
6.2.4. A CBD magas koncentrációban csökkentette az ORSK-k életképességét és proliferációs potenciálját.....	75
6.2.5. A CBD kombinált módon, apoptózist és nekrozist kiváltva gátolta az ORSK-k életképességét magas koncentrációban	77
6.2.6. A CBD alkalmazása magas koncentrációban döntően TRPV4 mediált Ca ²⁺ -beáramláshoz vezetett az ORSK-kon.....	78
6.2.7. A CBD alacsony koncentrációban gátolta a szőrtüszők által termelt, indukált gyulladásos citokinek mRNS szintű kifejeződését, amelynek hátterében adenosin receptor aktiváció állt	79
7. MEGBESZÉLÉS.....	81
7.1. A TRPV4 szerepe a hajciklus szabályozásában.....	81
7.2. A CBD hatásai a szőrtüsző biológiai folyamataira	85
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	89
9. SUMMARY	90
10. HIVATKOZÁSJEGYZÉK.....	91
11. TÁRGYSZAVAK.....	99
12. KEY WORDS	100
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	101
14. FÜGGELÉK – SAJÁT KÖZELMÉNYEK JEGYZÉKE	102

1. Rövidítések

2-AG – 2 arachydonoil-glicerol (eCB)

5-AR - 5- α -reduktáz

5-HT - szerotonin

7-TM - 7-transzmembrán

ACTH – adrenokortikotróp hormon

AEA – anandamid, N-arachidonoilethanolamin (eCB)

AnkR – ankyrin repeat (ankyrin ismétlődés)

APM – musculus arrector pili (szőrszálfejtő izom)

ARD – ankyrin repeat domén

ATP – adenzin trifoszfát

BMP – bone morphogenic protein (csont morfogén fehérje)

Ca²⁺ - kalcium

cAMP – ciklikus adenzin-monofoszfát

CB1/2 – kannabinoid receptor 1/2

CBD – (-)-cannabidiol

CD – cluster of differentiation (differenciációs klaszter)

CGS – CGS15943 (pán-adenozin receptor antagonist)

CH – club hair (bunkó alakú szőrszál)

CRH – kortikotróp hormon

DAMP – danger associated molecular pattern (veszélyhez asszociált molekuláris mintázat)

DMAPP - dimetil-allil-pirofoszfát

DC – dermális kondenzátum

DHT - dihidrotesztoszteron

DP – dermális papilla

DRG – dorsal root ganglion (hátsógyöki ganglion)

DSper - spermium depolarizáló csatornája

eCB - endokannabinoid

EB - epidermolysis bullosa

ECS – endokannabinoid rendszer

EDTA - etilén-diamin-tetra-acetát

EGF - epidermális növekedési faktor

ER – ösztrogén receptor

FasL – Fas ligand

FBS - embrionális borjúsérum

FGF - fibroblaszt növekedési faktor

FK - fitokannabinoid

FLUO-4-AM – FLUO-4-acetoxi-metilészter

GPR - G-protein kapcsolt receptor

GSK – GSK10167690A (TRPV4 aktivátor)

HC06 - HC067047 (TRPV4 antagonist).

HDF – humán dermális fibroblaszt

HGF – hepatocita növekedési faktor

HS – hajszál

IGF – inzulinszerű növekedési faktor

IFN - interferon

IL - interleukin

IRS – inner root sheath (belső gyökérhüvely)

JAK - Janus arcú-kináz

KSzB – kötőszövetes burok

KO – knock-out (kiütött)

LPS – lipo-poliszacharid

MHC - major hisztokompatibilitási komplex
MK – mátrix keratinocita
MMP9 – mátrix metallo-proteináz 9
nAChR - nikotinos acetilkolin receptor
NF- κ B – nukleáris faktor κ B
NLRP3 - Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing 3 (nukleotid-kötő oligomerizációs domén, leucin-gazdag ismétlődés és pirin domént tartalmazó 3)
NO - nitrogén-monoxid
NRF2 - nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (nukleáris faktor erythroid-2-szerű faktor 2)
OCT - optimal cutting temperature
ORS – outer root sheath (belső gyökérhüvely)
ORSK – ORS keratinocita
OTRPC4 - ozmoszenzitív tranziens receptor potenciál csatorna 4, TRPV4 régi neve
PBS – foszfát-puffer oldat
PDGF - vérlemezke eredetű növekedési faktor
PKA - proteinkináz-A
poly(I:C) - polyinozin-polycitidyl sav
PPAR γ – peroxiszóma proliferátor aktivált receptor- γ
PSU – pilosebaceous unit (pilosebáceus egység)

RTq-PCR – valós idejű kvantitatív polymeráz láncreakció
SEM – standard error of mean
SG – sebaceous gland (faggyúmirigy)
SHH – sonic hedgehog
SZ95 - immortalizált humán faggyúmirigy sejt vonal
TGF – transforming growth factor
(transzformáló növekedési faktor)
THC – (-)-trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
TLR - toll-like receptor
TM - transzmembrán
TNF – tumor nekrozis faktor
TRP – tranziens receptor potenciál
TRPA – TRP ankyrin alcsalád
TRPC – TRP kanonikus alcsalád
TRPM – TRP melastatin alcsalád
TRPML . TRP mucolypin alcsalád
TRPP – TRP polycystin alcsalád
TRPV – TRP vanilloid alcsalád
TSH – thyreoid stimuláló hormon
UV – ultraibolya (ultra violet)
VRL2 - vanilloid receptor like-2
VR-OAC - vanilloid receptor-related osmotically activated channel (vanilloid receptor-szerű ozmotikusan-aktivált csatorna, TRPV4 régi neve)

2. Bevezetés

A szervezet külső szigetelő rétegeként szolgáló bőrben lévő megannyi specializálódott bőrfüggelék egyikeként a szőrtüszőnek fontos szerep jut a bőr barrier-feladataiban, illetve hormonális, pszichoszociális és szenzoros funkcióiban. A szőrtüsző egyedi életeciklusa a repetitív módon ismétlődő, proliferatív (szőrszálképző) és regresszív fázisok váltakozásából álló hajciklus. A hajciklus szabályozása rendkívül komplex folyamat, amelyben számos szisztémás hormonnak és parakrin mediátornak is szerepe van.

Kutatócsoportunk a bőr és az endokannabinoid rendszer (ECS), valamint az ezzel szorosan összekapcsolódó tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatorna szupercsalád tagjainak összefüggéseit kutatja. Emellett az ECS *Cannabis sativa* növény által termelt, úgynevezett fitokannabinoidokkal történő farmakológiai manipulálásának a bőrre kifejtett hatásait is vizsgáljuk. Korábbi eredményeink szerint a hajciklus szabályozásában szerepet játszik az ECS, ugyanis mind a TRP vanilloid 1 (TRPV1) és a TRPV3 ioncsatornák aktivációja, valamint a metabotróp CB1 kannabinoid receptor aktivációja is (regresszív) katagén fázist indukál. Ezek alapján feltételezzük, hogy a hajcikluson egy pro-katagén ECS-tónus van jelen. Értekezésemben egy másik TRP ioncsatorna, a TRPV4 expresszióját és hajciklusban játszott szerepét vizsgáltam humán szőrtüszőn. Szintén munkacsoportunk korábbi eredményei alapján ismert, hogy egy nem-pszichoaktív fitokannabinoid, a kannabidiol (CBD) a faggyúmirigyen komplex anti-acne hatásokat fejt ki, így ígéretes ágens lehet az acne terápiájában is. Tekintve, hogy a szőrtüsző a faggyúmiriggyel való strukturális-funkcionális kapcsolatai miatt hozzájárul az acne kialakulásához, fontos a CBD hatásainak vizsgálatát kiterjeszteni a szőrtüszőre is. Ezért tanulmányoztuk a CBD hajciklusra, valamint a szőrtüsző gyulladáshoz *in vitro* modelljében kifejtett hatását. Emellett vizsgáltuk, hogy aktiválja-e a CBD a szőrtüszőn jelenlévő potenciális receptorait, a TRPV4-et és az adenosin receptorokat.

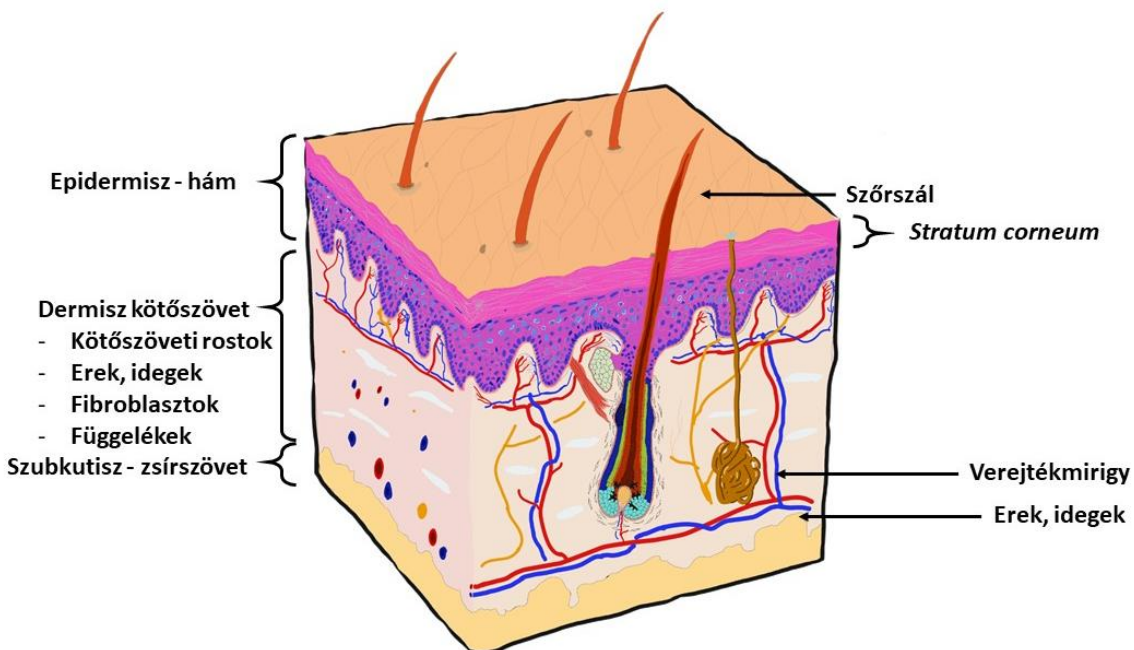
3. Irodalmi áttekintés

3.1. A szőrtüsző felépítése, élettana, életciklusa és különböző folyamatainak szabályozása

3.1.1. A bőr felépítése, élettani alapjai

A kültakaró, mint a szervezet legkülső rétege barrierként funkcionálva védi a szervezet egészét a külső, potenciálisan káros hatásoktól. Ennek a védelemnek számos aspektusa van. A bőr a triviális mechanikai hatások mellett kémiai ágensektől, hő- és fénysugárzástól, és a fertőző mikrobáktól is védelmet biztosít. Emellett megakadályozza a szervezet folyadék- és ionvesztését is. Ezekhez a funkciókhoz az evolúció során való fokozatos adaptáció révén specializált sejtfeleségek alakultak ki, illetve ezek a sejtek esetenként szorosabban együttműködő egységeket, „mini-szerveket” alkotnak a bőrön belül. Ilyen úgynevezett bőrfüggelék pl. a szőrtüsző és a különböző mirigyek is. A bőrön belül további rétegeket lehet elkülöníteni, melyek közül a legkülsőt, az epidermiszt döntően a keratinociták (hámsejtek) építik fel (1. ábra). Az epidermisz maga is további rétegekre osztható. Belső határán, a dermisszel határos bazális membránon elhelyezkedő stratum basale (bazális réteg) keratinocitái intenzíven osztódnak, és az így keletkezett utódsejtek az epidermiszen belül fokozatosan ki/felfelé haladnak. Eközben a keratinociták differenciálódnak, amely során a sejtek fokozatosan alkalmassá válnak a fizikai barrier funkció ellátására, sejten belüli fehérjevázuk szilárdsága fokozódik, miközben intercelluláris kapcsolataik erősek maradnak. Ennek a molekuláris háttere a citoskeletonot alkotó bázikus és savas jellegű keratin-fehérjék fokozatos és szigorú program szerint zajló lecserélődése a differenciálódás során [1]. Az epidermális hámsejtek terminális differenciálódásának tekinthető állomás a sejtek apoptózisa. Ekkorra bizonyos sejtalkotóik – főleg a keratin-hálózat és sejtmembrán – már az epidermisz (és az egész bőr) külső rétegét alkotva egy hidrofób, magas szakítószilárdságú réteget hoznak létre, a stratum corneumot. Az epidermisz hagyományos szövettani elnevezése elszarusodó többrétegű laphám, amely tömören jellemzi is ezt a szövetet. A bazális keratinociták által alkotott stratum basale és a külső stratum

corneum között még – belülről kifelé haladva, a sejtek differenciációs folyamatát tükrözve – elkülönítünk stratum spinosum és stratum granulosum rétegeket is [2]. Az epidermisz domináns sejtalkotói, a keratinociták mellett egyéb sejtek is találhatóak a hámrétegben. A melanociták a napfény-expozíció hatására fokozott ütemben melanint termelnek, és az azt tartalmazó úgynevezett lamelláris testeket a keratinocitáknak adják át. A pigment abszorbeálja az UV-sugarakat és véd az egyébként káros napsugárzástól. Az epidermális keratinociták mellett a szőrtüszőben is vannak hasonló eredetű és működésű hámsejtek. Az epidermiszben erek már nincsenek, idegvégződések



1. ábra

A bőr és az azt alkotó rétegek és struktúrák sematikus rajza

A bőr legkülső (felső) rétege a hámréteg (epidermisz), amelyet főleg a keratinociták alkotnak, és jellegzetes rétegeket alakítanak ki a hámon belül. Ez utóbbiban nem, csak a mélyebb dermisz kötőszövetében vannak erek, illetve a bőrfüggelékek is. Részletes leírás a szövegben. Saját ábra. A szőrtüsző részletesebb strukturális ismertetése a 3. ábrán.

még előfordulnak. Az epidermiszben immunsejtek, pl. Langerhans-sejtek is jelen vannak, szerepük a mikrobák érzékelésében és feldolgozásában, végül az immunválasz elindításában kiemelten fontos.

Az epidermisz alatt található kötőszövetes réteg a dermisz, melynek fő sejtjes összetevői a dermális fibroblasztok. Ezek a sejtek a kötőszöveti rostokat képzik, amelyek a közvetlenül epidermisz alatti részen, a hám papillák alatt hozzák létre a papilláris dermiszt, ettől a test belsőbb szövetei felé pedig a retikuláris dermiszt (1. ábra). A dermiszben erek és idegek is futnak.

A bőr, tekintettel arra, hogy barrier szövetként kiemelten ki van téve külső ágensek, köztük mikrobák megjelenésének, nem meglepő módon igen jól fejlett immunológiai funkciókkal és számos immunsejttel rendelkezik [3]. A bőr immunrendszerét alkotó sejtek egy része rezidens sejteknek tekinthető, mások ingáznak a bőr és a szekunder immunszövetek között. Vannak, amelyek érzékelik a patogén mikrobákat (pl. az említett Langerhans-sejt), az effektor sejtek pedig aktívan részt vesznek az eliminációjukban [3]. Részben az immunrendszer markáns jelenlétének tudható be, hogy viszonylag sok és súlyos bőrbetegség immunológiai háttérrel rendelkezik.

A szőrtüsző, más néven hajfollikulus a szabad szemmel is látható szőrszálak folytatásaként helyezkedik el a bőrben, főként a dermiszben. A szőrtüsző a szőrszál képzéséért felelős komplex, többféle eredetű és működésű sejtek összességéből létrejött, jellegzetes, repetitív életciklussal jellemezhető „miniorgánum” [4]. A szőrtüsző elsődleges feladata a szőrszál képzésével a bőr (főleg mechanikai és termális) barrier funkcióinak segítése. Az elmúlt évtizedekben keletkezett számos új kutatási eredménynek hála a szőrtüsző pontos felépítéséről (pl. különböző őssejt populációk) és működéséről bővült ismereteinknek további, korábban ismeretlen funkciók szabályozásában is sikerült azonosítani a szőrtüsző szerepét [4]. Ilyen új funkció például, hogy bár némileg különbözőek a szőrtüszőben található keratinociták, mégis képesek a bőr epidermális keratinocitáit pótolni a bőrsérülések utáni szöveti regeneráció során [5]. Ehhez hasonlóan pl. UV károsodás után az epidermisz Langerhans sejtjei is a szőrtüsző rezervoárból pótlódnak [6].

A szőrtüszőkre jellemző egy különleges, repetitív életciklus (másnéven hajciklus), amely során a szőrtüsző képes a különböző fázisok közötti váltással „megújulni”, és egy új szőrszálat képezni.

Ennek során a szőrtüsző részben a morfogenezise, vagyis az embrionális fejlődés mozzanatait ismétli meg [7].

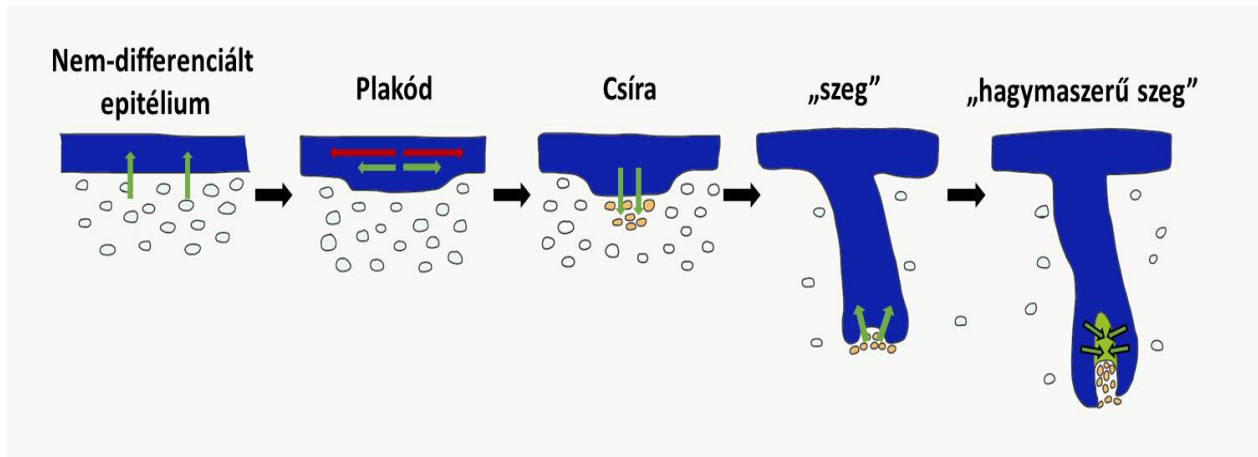
3.1.2. A szőrtüsző embrionális fejlődése, morfogenezise

A bőr, mint a szervezet legkülső rétege az egyedfejlődés során nagyrészt a fejlődő embrió vagy magzat legkülső rétegéből, az ektodermából fejlődik ki (2. ábra). A szőrtüsző anatómiailag a bőr két külső rétegében, az ektoderma „egyenésági” származékának tekinthető epidermiszben és a részben mezodermális dermisz kötőszövetében helyezkedik el [8]. Különböző kompartmentjei így érthető módon részben ektodermális eredetűek, pl. a különböző epiteliális sejtek, úgymint a külső, illetve belső gyökérhüvelyt alkotó keratinociták, illetve a magáért a szőrszál képzéséért felelős mátrix keratinociták. A szőrtüsző életciklusában különösen fontos szabályozó „dermális papilla” (DP) ugyanakkor mezenhimális eredetű (3. ábra), míg a szőrtüszőben is megtalálható pigmentképző melanociták crista neuralis eredetűek [9].

A szőrtüsző kialakulásáról származó ismereteink (illetve annak részletei) főleg egérkísérleteken alapulnak, ahol lehetőség van egy-egy gén ki- vagy bekapcsolására, akár egy adott sejtre specifikusan. Az állatok adott időben való leölése után pedig tanulmányozni lehet a szőrtüsző fejlődésének különböző fázisait és ezek változását. Fontos azonban hozzátenni, hogy ezeket az eredményeket nem szabad egyszerűen extrapolálni az emberi szőrtüsző kialakulására, hiszen pl. az egér bőre többféle szőrtípust tartalmaz, amelyek fejlődése is némileg különbözik a humán szőrtüszőtől [10].

A szőrtüsző morfogenezis első mozzanata, amikor a mezenhimális sejtek alulról (a fejlődő szervezet belső része felől) stimulálják a felettük elhelyezkedő ektodermális sejteket, amelynek hatására ezen nem differenciált epiteliális sejtek proliferációja révén az adott mezenhimális sejtekkel szomszédos ektoderma megvastagszik, és kialakul a későbbi szőrtüsző helyén lévő

„plakód” [11]. A plakódot alkotó sejtek a szomszédos – leendő „interfollikuláris” – sejtekben gátolják azokat a szignálokat (2. ábra), amelyek a plakód, illetve később a szőrtüsző irányú



2. ábra

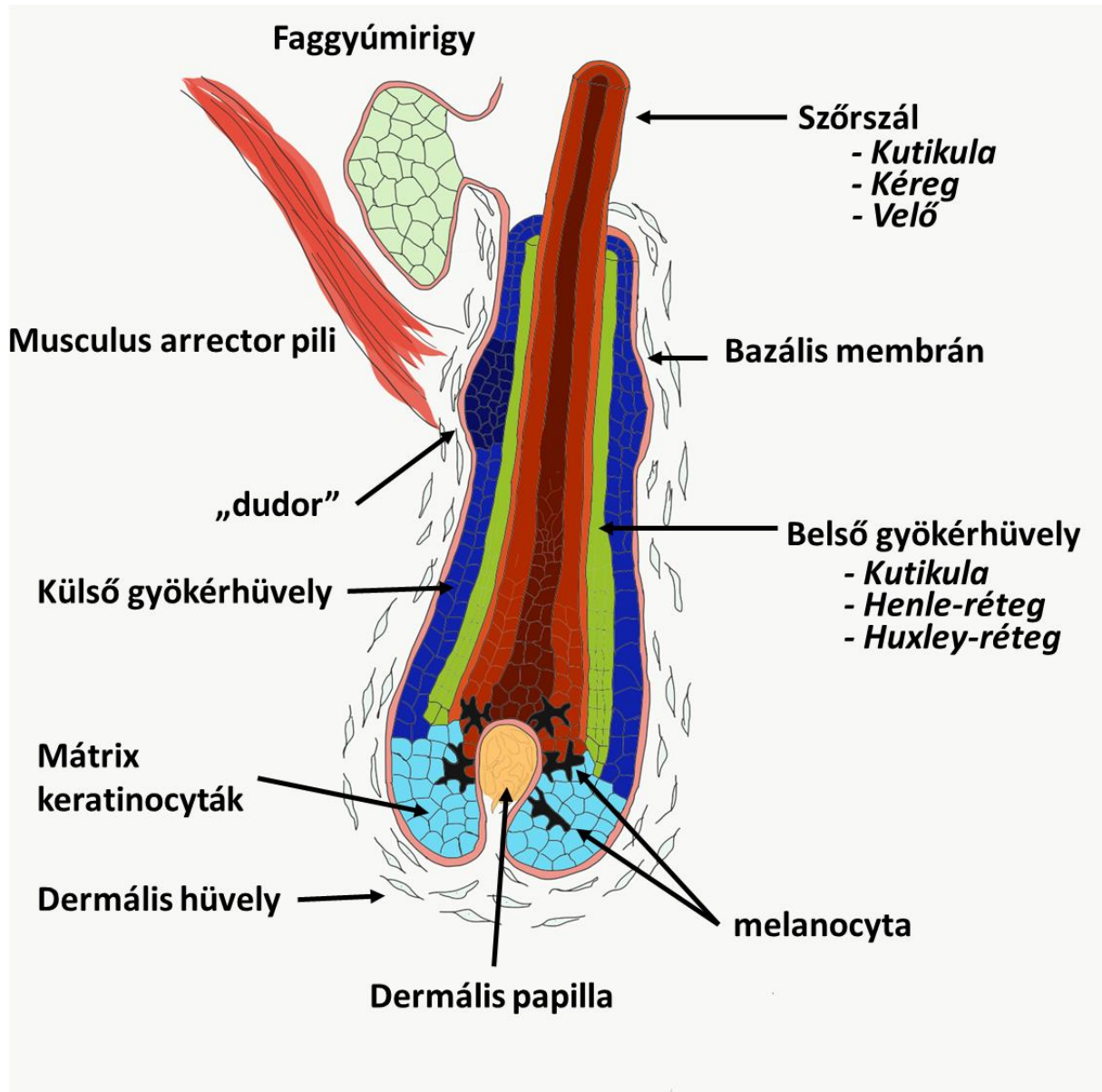
A szőrtüsző morfogenezisének sematikus ábrázolása

A kék szín az ektodermából származó epitéliumot reprezentálja, alatta a mezenhimális eredetű, fibroblaszt elődök találhatóak. A különböző kompartmentekben kialakuló struktúrák serkentő (zöld nyíl) és gátló (vörös nyíl) szignálokat közvetítenek a szomszédos sejtekre, amellyel további, a későbbi szőrtüsző kialakulásában fontos kompartmentek és struktúrák (DP, IRS, stb.) alakulnak ki, a folyamat részletes leírása a szövegben. Saját ábra.

differentiálódást segítenék elő.

Ezenkívül a plakód az alatta elhelyezkedő mezenhimális sejtekre is hat, és ezekből a későbbi dermális papillát felépítő fibroblasztokból létrejön a „mezenhimális kondenzátum”. A kondenzátum fibroblasztjai és a plakód eredetű keratinociták ebben a fázisban a „haj-csírát” alkotják. Ennek kialakulásában hatalmas jelentősége van a sonic hedgehog (SHH) molekulának, illetve a jelátviteli útvonalának, ugyanis *Shh* knock-out egerekkel végzett kísérletekben bár a plakód és a dermális kondenzátum kialakult, igazi DP (illetve később érett szőrtüsző) már nem [12]. A szabályozás komplexitására utal, hogy a fehérje hiánya mellett a fokozott expresszió is szőrfejlődési abnormalitásokhoz vezet egérben [13]. Fontos, hogy a *post partum*, kifejlett szőrtüsző hajciklusok alatti változásai során az újonnan képződő szőrtüszőben is van egy átmeneti struktúra, amit „szekunder hajcsírának” nevezünk, melyben hasonló jelenség játszódik le, mint a hajcsírában a szőrtüsző kialakulásakor [7].

Az így létrejövő DP-fibroblasztok a felettük elhelyezkedő epiteliális sejtekre olyan hatást fejtenek ki, hogy azok proliferációja és specializációja révén elkezdődik a már későbbi szőrtüszőre jellemző orientáció, vagyis a mélyebb rétegbe benyúló „szeg” (2. ábra) fázis [11]. Ezután a további differenciálódás következtében egyre több réteg alakul ki az epiteliális kompartmentekben, elkülönül a belső-, majd a külső gyökérhüvely (inner/outer root sheath után IRS és ORS) rétege („hagymaszerű-szeg”) is, és megindul a szőrszál képzése. Jelen ismereteink alapján a különböző,



3. ábra

Az anagén szőrtüsző sematikus ábrázolása (hosszmetszet)

Az anagen-VI fázisú szőrtüsző felépítése a jellegzetes rétegek és az azokat alkotó sejtfeleségek ábrázolásával. Saját ábra.

kifejlett szőrtüszőre jellemző rétegek (pl. a későbbi IRS, 5. ábra) már a morfogenezis során külön mátrix progenitor sejtekből erednek [14], vagyis nem a fejlődő szőrszálon belül különülnek el.

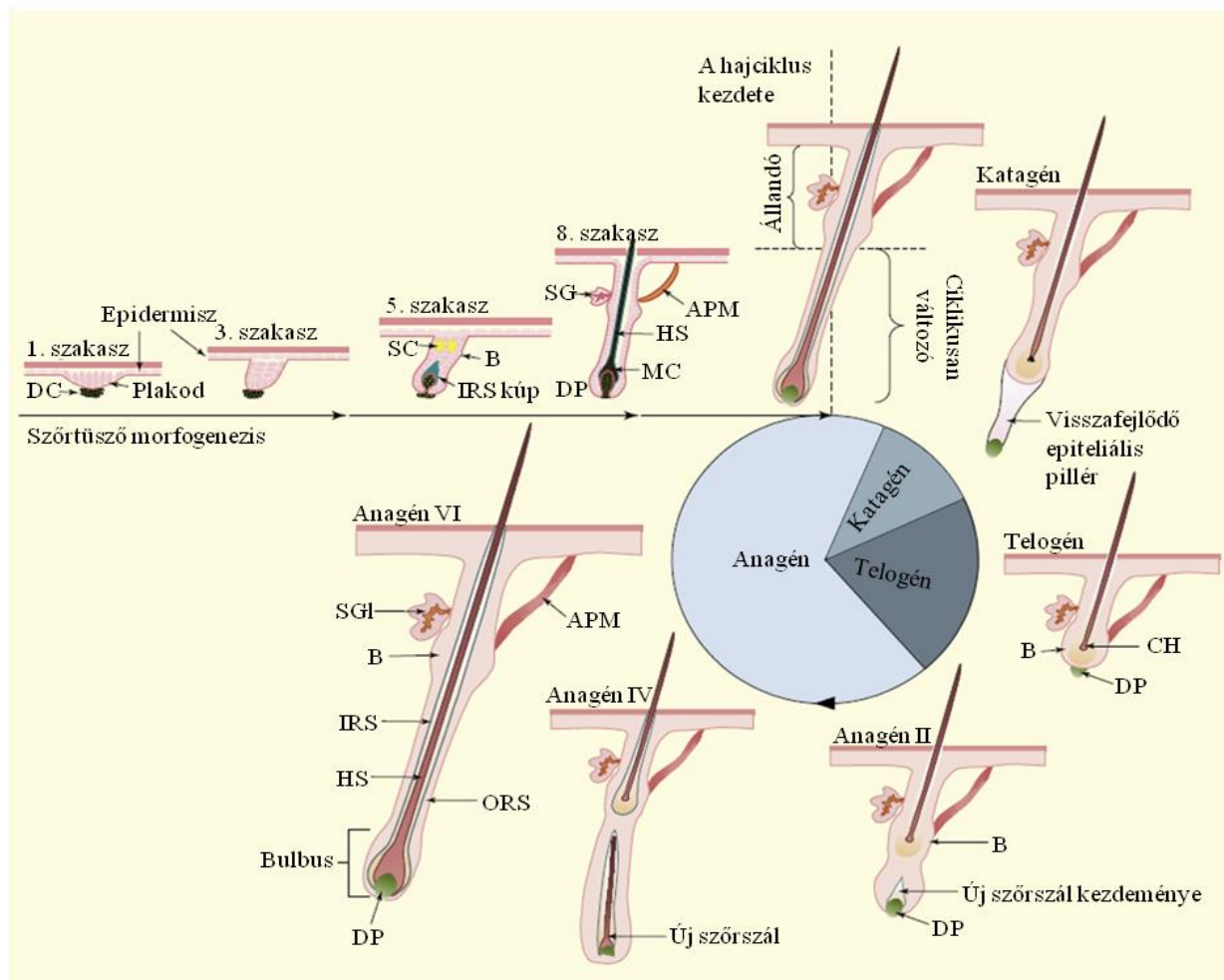
A bazális membránon „belül” alakul ki az ektodermális eredetű faggyúmirigy is, mely szintén az epiteliális sejtekből különül el, és a későbbi szőrtüsző infundibulumába nyílik, ide szekretálva produktumát, a faggyút. A faggyúmirigy és a szőrtüsző az úgynevezett „pilosebáceus egységet” (PSU, pilosebaceous unit) alkotja, mely funkcionálisan és strukturálisan is valódi egységet képez. Az embrionális fejlődés során körülbelül 5 millió szőrtüsző keletkezik testszerte, és ezek után újak már nem képződnek, bár a meglévők mérete, a képződő szőrszál maximális hossza változhat [15].

3.1.3. A szőrtüsző felépítése és változása a szőrtüsző életciklusa, a „hajciklus” során

A szőrtüsző morfológiailag és szerkezetileg (a központi szőrszál körüli koncentrikus rétegek elhelyezkedése miatt) is egy hagymához hasonlít (3. ábra), amely azonban a szőrtüsző sajátos életciklusa során némileg változik [4]. A hajciklus repetitivitása miatt elkerülhetetlen, hogy regressziót követően az addig képzett szőrszál elveszzen, de ugyanez adja meg a lehetőségét annak, hogy egy szőrszál elvesztése után a hajciklus újra indulásával új szőrszál képződjön.

Több elmélet is létezik arra, miért is alakult ki a hajciklus: 1.) lehetőséget biztosít adaptációra adott hőmérséklethez 2.) periodikus vedléssel „megtisztítják bőrüket” egyes állatok 3.) szőrzet hosszának szabályozása test-régióként 4.) megszabadulás a nem-megfelelő, vagy malignusan-transzformált szőrtüszőtől (ami előfordulhat a gyorsan osztódó szövetekben) [16]. A hajciklust három fázisra bontjuk, melyek közül a klasszikus elképzelés szerint az egyik egy aktív „anagén” fázis, mely a szőrszál képződésének, majd növekedésének fázisa; ezután a regresszív folyamatokkal jellemezhető „katagén” fázis jön, amelyet egy nyugalmi „telogén” fázis követ. Ez a beosztás talán egy adott szőrszál szempontjából még elfogadható is lehetne, azonban a közelmúltig felhalmozott kutatási eredmények, illetve a szőrtüsző egészét tekintve túlságosan leegyszerűsítő elképzelés. Ugyanis például a nyugalminak gondolt telogén fázisban is – a korábbi szőrszál

passzív, ideiglenes megmaradása mellett – a DP vándorlása és az epiteliális őssejtek (4-5. ábra) élénk osztódással jellemezhető folyamatai zajlanak [15]. Emellett a szőrszál kihullása is tulajdonképpen egy aktív folyamat, melyet „exogén fázisnak” is neveznek [4], azonban ez már nem a szőrtüszőre vonatkozik (amely ilyenkor már általában anagén fázisban van), hanem magára a szőrszállra.



4. ábra

A szőrtüsző morfogenezise és a hajciklus

A morfogenezis során kialakuló szőrtüsző a későbbi élet során folyamatosan a hajciklus fázisaiban van illetve azok közötti egyirányú (anagén → katagén → telogén → stb.) átmenetek szerint változik. B – bulge (dudor), DC – dermális kondenzátum, MC – melanocita, a többi rövidítés jegyzéke az értekezés rövidítés listájában, illetve a szövegben található. Schneider és mtsai (2009), munkája alapján [5].

Az egyedfejlődés során a létrejött szőrtüszők anagén fázisba jutnak, amely az aktív, szőrszálat termelő állapot. Ezután azonban a kialakult epiteliális kompartmentben a sejtek apoptózisa révén megszűnik a szőrszál képzés. A DP fokozatosan kikerül a mátrix keratinociták öleléséből, és eltávolodik a korábbi szőrszáltól, amely formája ekkor egy bunkóra hasonlít (4. ábra) és rögzül a környező sejtekhez. A fázisok cikluson belüli aránya, vagyis általában az anagén hossz változékonysága szabja meg egy adott testtáj szőrzetének lehetséges hosszát (pl. haj vs. szemöldök) [16]. Emberben – számos más emlős szőrzetével ellentétben – a szőrtüszők hajciklusa egymáshoz képest nem szinkronizált, egymáshoz képest függetlenül zajlik. Az is fontos, hogy az egymás után ismétlődő ciklusban a szőrtüsző és a pilosebáceus egység egyéb, felszínesen elhelyezkedő részei (kb. a dudor felső része, isthmus, faggyúmirigy) nem vesznek részt, mint ahogy a szőrtüszőhöz asszociált struktúrák (musculus arrector pili) sem; ezek változatlanok maradnak a szőrtüsző ciklusa alatt [8, 17].

3.1.3.1. Az anagén fázis

Anagén fázisban a mátrix keratinociták a bulbusban folyamatos osztódás és disztális vándorlás közbeni differenciálódás során létrehozzák a follikulus és a szőrszál részeit, rétegeit. Ez az aktív, szőrszálat szintetizáló fázis, és bár egy ehhez hasonló morfológiájú szőrtüszőbe torkollik a morfogenezis is, tulajdonképpen az első hajciklus katagénnel kezdődik, még *in utero* [17]. A későbbiekben spontán anagén indukció az előző telogén fázis egy adott időpontjában kezdődik, és ez pontosan viszonylag nehezen tanulmányozható. Ennek ellenére az egyik ismert – experimentálisan is kihasznált – mód anagén fázis indukcióra a traumatikus epiláció [16]. Ennek során ugyanakkor nem elég csupán a szőrszál eltávolítása, hanem hangsúlyos a trauma minősége is. Nem ismert tökéletesen, hogy pontosan milyen mechanizmusok, valamint szignalizáció szükséges a fázis beindításához, ám számos parakrin mediátorról, hormonról, neurotranszmitterről

és növekedési faktorról derült ki, hogy képes erre [16]. Az anagén I. fázisban még nincs meg a különböző epiteliális rétegek cilindrikus elkülönülése, ez csak az anagén III. fázis idejére alakul ki. Bár az anagén fázis kialakulása (telogénből) a hajciklus alatt nehezen tanulmányozható, maga az anagén fázis vizsgálható legjobban *in vitro* vagy *ex vivo*. Ennek egyik oka, hogy az anagén fázisú szőrtüsző (pl. emberből származó teljes szőrtüsző) *ex vivo* kultúra fenntartható kb. két hétig is, miközben a jellegzetes morfológiája mellett megtartja a szőrszál-képző képességet is. Eközben mérhető módon növekszik a szőrszál hossza [18], és vizsgálható a hozzáadott anyagok katagén indukáló vagy anagént fenntartó hatása is. Ezért jól ismerjük az anagén szőrtüsző strukturális és funkcionális jellegzetességeit. Az alsó, dermiszben lévő bulbus lényegében a mátrix keratinociták (MK) régiója, amelyek intenzíven osztódnak, és létrehozzák a szőrszálat, illetve a többi epiteliális réteget körülötte (inner/outer root sheath után IRS és ORS). A MK-knak az úgynevezett Auber-vonal alatti régiójában a legintenzívebb az osztódásuk (Anyagok, módszerek, 12. ábra). Az Auber-vonal a DP legszélesebb kiterjedésében húzott sík meghosszabbítása. A Ki-67 proliferációs markerrel jelölt MK-k anagén szőrtüsző esetén intenzíven festődnek ebben a régióban, amely a fokozott osztódásukra utal (Eredmények, 16. és 23. ábrák). Ezek azok a speciálisan módosult keratinociták, amelyek differenciálódása során jellegzetes keratin-mintázat alakul ki, és végül a szőrszálat alkotó trichocitákká válnak [19]. Csakúgy, mint az ORS és IRS rétegei, magát a szőrszálat felépítő trichociták is jellegzetes, úgynevezett „kemény-keratin” típusokat expresszálnak, melyek specifikusak a szőrszálra, és felelnek annak mechanikai jellegzetességéért [20]. A korábban említett, az epidermális hámsejtekre jellemző keratinok sejt-differenciációs program szerint váltakozó expressziója és fokozatos lecserélődése rájuk is jellemző; igaz, esetükben nem elszarusodás a végleges cél és állapot, hanem a szőrszál létrehozása [20].

A szőrszálnak három rétege van (medulla, kéreg, kutikula), melyek némileg eltérnek tulajdonságaikban, illetve az őket felépítő keratinok tekintetében [19, 20]. Emberben a medulla

testtájfüggő módon, nem minden szőrszálban fordul elő. Amíg a külső kortikális sejtek a kompresszió következtében orsó alakúakká válva inkább vertikálisan orientálódnak, addig a medulla trichocitái horizontálisan rendeződnek, és egymástól elkülönülve fokozatosan kis üregeket hoznak létre, melyek valószínűleg a hőszigetelésben játszanak szerepet [20]. Közvetlenül a szőrszál körül az IRS található, melynek szintén három rétegét lehet szövettanilag elkülöníteni. Kissé zavaró módon a legbelső IRS réteget szintén kutikulának hívják, csakúgy, mint a szőrszál külső, szomszédos rétegét (3. ábra). Az IRS keratinocitái orientálják a szőrszálat, és a réteg kifejlődésében kritikus jelentőséggel bír a GATA3 molekula, hiszen e transzkripció faktor hiányában nincs IRS és normális szőrzet fejlődés [21]. Az IRS és az ORS között egy vékony, mindkettő szomszédos rétegektől strukturálisan is különböző réteg, a „társ-réteg” különíthető el, amelynek nem teljesen ismert a jelentősége, de felmerül, hogy a szomszédos IRS és ORS nutritív ellátásában, támogatásában van szerepe [22].

Az ORS rétege a MK felől, amelyből differenciálódik, fokozatosan vastagszik a felszín felé, eközben egyrétegűből többretegűvé, majd folyamatossá válik az epidermisz bazális rétegével. Anatómiailag különíthető része a musculus arrector pili (szőrszál-feszítő izom) csatlakozásánál található „dudor” régió (3. ábra), amelyben őssejtek találhatóak. Ezeknek az őssejteknek szerepe van a hajciklus során a telogén végi regeneráció során bizonyos epiteliális sejtek újra képződésében. Az ORS (amely tehát folyamatos az epidermisszel, azonban a dermisz mélységébe terjed) fontossá válhat a mélyebb sérülések után az epidermisz regenerációjában [5]. Rágcsálókön végzett kísérletekből származó *in vivo* eredmények alapján ismert, hogy az anagén fázisban lévő szőrtüszőkkel borított bőr sebgyógyulása gyorsabb, mint a katagén szőrtüszőeket tartalmazó bőr [23]. Az ORS-keratinociták (ORSK-k) tehát, habár pótolhatják az epidermális keratinocitákat, de „normális” körülmények között az intakt szőrtüszőben nem megy végbe az azokra jellemző keratinizáció, mégpedig az IRS keratinocitákkal való kontaktus miatt [24].

A bulbuson belül, annak központi részében, a MK-k által közrefogva található a dermális papilla (DP, 3. ábra), a mezenhimális eredetű DP-fibroblasztok területe. A DP közvetlenül nem vesz részt a szőrszál termelésben, és nem érinti a hajciklus során az epiteliális sejtek katagén fázis alatti apoptózisa, tehát fennmarad a katagén szőrtüszőben is. A DP kulcsfontosságú szignalizáció forrása a szőrtüsző fázisai közötti váltások alatt (a szőrtüsző karmesterének nevezik, találó hasonlattal). A DP-sejtek kiemelt szerepére utal, hogy mind *in vitro* bőrmmodellben, mind *in vivo* képesek szőrnövekedést indukálni, ha bőrbe implantálják [25].

3.1.4.2. Az anagén-katagén átmenet és a katagén fázis

A katagén fázist involúciós folyamatok jellemzik, a regresszió a DP és a szőrszál között lévő epiteliális struktúrákat érinti, mely során a mátrix keratinociták és egyéb epiteliális sejtek apoptotizálnak [15]. A DP-t az apoptotikus folyamatok nem érintik; a DP felett keletkező „epiteliális nyél” kialakulása segít azonosítani (4. ábra) a fázist. A DP a katagén fázis alatt fokozatosan mozog a felszín irányába, és megközelíti a dudor („bulge”) régiót, ahol az epiteliális őssejtek vannak. Ha ez elmarad, akkor az életciklus teljesen véget ér, és a szőrtüszőben nem képződik új szőrszál.

Nem igazán ismert részleteiben, hogy mi vezet a katagén fázis beindulásához, ám talán érdekesebb kérdés, hogy miért kell véget érnie az azt megelőző anagénnek. Azt már viszonylag régóta tudjuk, hogy a korai katagén fázisban megváltozik az apoptózissal klasszikusan összefüggésbe hozott markerek és szignalizációs elemek (pl. Fas-ligand, c-myc) expressziója, és ezt megelőzi néhány humorális faktor vagy receptorának (pl. transzformáló-növekedési-faktor [TGF, transforming growth factor] TGF- β) expressziója a kései anagénben [26]. A TGF altípusok közül a TGF- β 1 és -2 a katagén beindításában játszik szerepet, és apoptózist indukál keratinocitákban [27]; árnyaltabb összefüggésre utal ugyanakkor, hogy a TGF-szignalizáció blokádjá az anagénbe lépést is késlelteti, illetve különböző epiteliális őssejtek eltérően reagálnak rá [28]. Pontosan a regresszió során, az

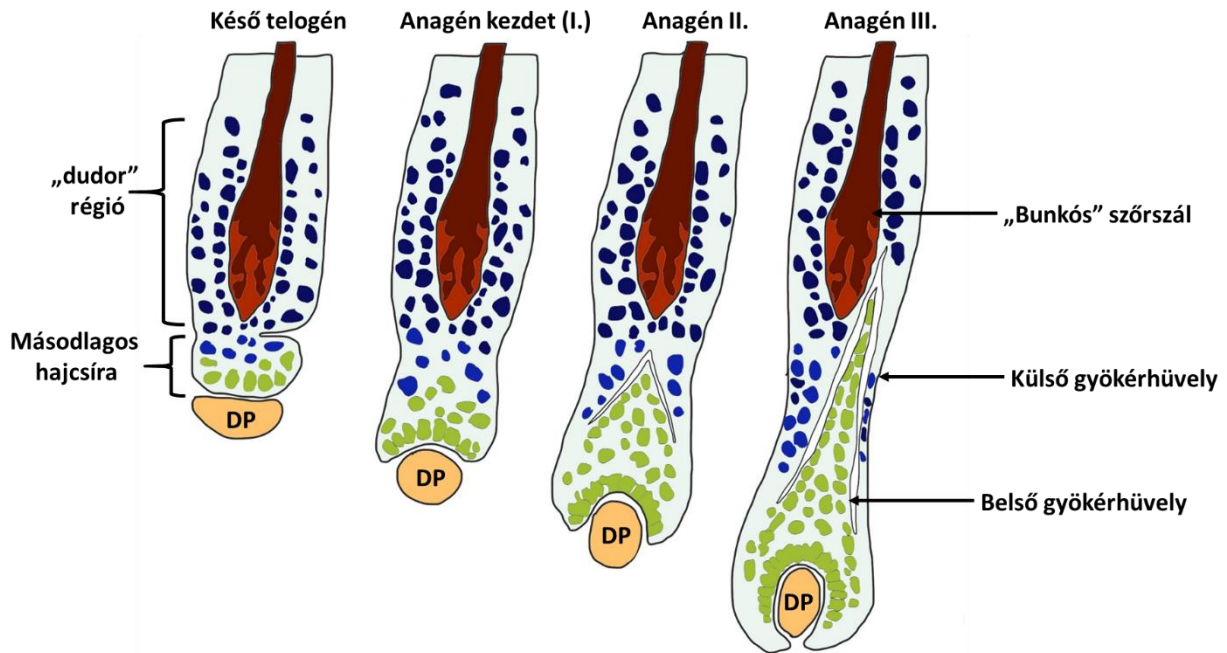
apoptotizáló keratinociták után kialakuló epiteliális nyél az, ahol a TGF- β 2 és a TGF-receptor-II ko-expresszálódik [27]. Ez a jelenség jól összekapcsolja a szőrtüsző hajciklus során bekövetkező strukturális változásait az apoptotikus folyamatokkal és az azokat szabályozó faktorokkal.

3.1.4.3. A telogén fázis alatt játszódó folyamatok, átmenet az újabb, következő anagén fázisba

A katagén fázis során kialakult epiteliális nyél, majd annak zsugorodása miatt a telogén fázisban a szőrtüsző egésze csak a dermiszben helyezkedik el, nem ér le a zsírszövetig, és a DP nagyon kis méretűre kompaktálódik [17]. A telogén fázisban a szőrtüsző sejtjei proliferáció és biokémiai aktivitás szempontjából nyugalomban vannak, amely a következő anagén fázis kezdetéig nem változik. Minimális proliferáció a másodlagos hajcsírában figyelhető meg; kis, osztódó sejtcsoportok itt lehetnek. Ennek a fázisnak a fenntartásában is azonosítottak parakrin faktorokat, hormonokat. A telogén fázis alatti „nyugalom” fenntartásában szerepet játszik a bone morphogenic protein (BMP)-szignalizációs útvonal [8]. Ebben az útvonalban szerepet játszik több BMP-altípus, melyek szintje jellegzetesen a hajciklussal szinkron módon változik. Döntően már az anagén fázis végén emelkedik, majd a telogén fázis alatt tetőzik, és a következő anagén fázis kezdetéig magas marad expressziójuk [8]. A BMP negatív szignálját ellensúlyozza főleg a Wnt (Wingless-related integration site) család több tagja [29], de számos egyéb jelátviteli útvonalat is azonosítottak már a telogén fázis fenntartásában vagy limitálásában [16]. Bizonyos esetekben az is bekövetkezhet, hogy nem egy következő anagén fázisba lép a szőrtüsző, hanem kilép a hajciklus repetitivitásából, és miniaturizálódik [30]. Ezt bizonyos hormonok is képesek előidézni jellegzetes lokalizációjú területeken (pl. tesztoszteron) [31].

A telogén fázist követő újabb anagén fázis kialakulása alkalmával a szőrtüsző részben a morfogenezisét ismétli meg, a DP sejtjei és az epiteliális külső gyökérhüvely egy speciális része, a dudor (3. és 5. ábra) területén található őssejtek között hasonló szignalizáció zajlik le, mint a dermális kondenzátum és a nem-differenciált epiteliális sejtek között.

A hajciklus során váltakozó, egészséges lefolyás esetén tárgyalt fázisok mellett ismerünk patológiás körülmények között megjelenő, jellegzetes, úgynevezett disztrófiás fázisokat is. Ezek általában valamilyen hirtelen károsító hatás (leggyakrabban rákellenes kemoterápia) esetén alakulnak ki. A disztrófiás anagén fázis enyhébb, míg a disztrófiás katagén fázis súlyosabb károsodás esetén következik be; ilyenkor anagén vagy katagén fázisú szőrtüszőre emlékeztető, de súlyosan károsult és nem funkcionális szőrtüsző alakul ki [32].



5. ábra

A telogen-anagén átmenet

A telogént követő átmenet során a DP hatására újra kialakulnak az anagén szőrtüszőre jellemző rétegek. Részletesen a szövegben olvasható módon. Saját ábra.

3.1.4. A hajciklus szabályozása

3.1.4.1. Hormonális szabályozás

A szőrtüsző és a hormonok viszonyának legalább két aspektusa van. Egyrészt a DP vaszkularizált, ide, valamint diffúzióval más szőrtüsző kompartmentekbe eljuthatnak vérben keringő szisztémás hormonok, amelyeknek receptorai expresszálódnak, így hatással vannak a szőrtüsző biológiai folyamataira, főként a hajciklusra. Másrészt a szőrtüsző képes több hormon szintetizálására is, amelyek komplex hatásokat fejtenek ki. A szőrtüsző hormonális szabályozása különösen fontos,

hiszen számos endokrin kórkép vagy állapot velejárója is lehet a csökkent vagy éppen fokozott szőrnövekedés.

Adott esetben nem is csak egy hormon receptorát expresszálja a szőrtüsző, hanem az adott hormon szekrécióját serkentő hipofízis- vagy akár hipotalamikus hormon(ok) receptorait is. Az esszenciális pajzsmirigy-hormon kalorigén hatása érdekes módon csak transzkripciós szinten érvényesül, azonban a tengelyben fölötte álló, alapvetően hipotalamikus tireotróp- és hipofízeális tireoidea-stimuláló hormon (TSH) fehérje szinten is fokozza a cél-proteinek (mitokondriális citokróm-C oxidáz 1-alegység, mitokondriális transzkripciós faktor A-alegység) kifejeződését [33]. Emberi szőrtüszők kezelése TSH-val nem eredményez mérhető módon pajzsmirigyhormon-szekréciót [34].

Ennél is érdekesebb a kortikoszteroid-tengely jelenléte, ugyanis a szőrtüsző egyaránt célpontja a hormonoknak és termelni is képes azokat [35]. Ezek közül a CRH és ACTH mellett a kortizol talán a legjelentősebb; a szőrtüsző, mint perifériás célszerv viselkedik, mivel extraadrenális hormontermelő [36]. Amellett, hogy a kortizol hormonnak hatása van a szőrnövekedésre, az is külön jelentőséget ad, hogy a bőrgyógyászatban gyakran alkalmazott glükokortikoid hatású külsőleges szerek szőrtüszőkre kifejtett mellékhatásával is számolni kell, különösen tartós használat mellett gyakori a fokozott szőrnövekedés. Ennek tükrében érdekes, de a tengely hormonjai közül a CRH-nak van *in vitro* gátló hatása a szőrnövekedésre pro-katagén hatás mellett, míg az ACTH és kortizol nem mutat szignifikáns hatást [36].

A növekedési hormon túlzott vagy csökkent termelésével járó régóta ismert hipo/hipertrichosis ellenére csak a közelmúltban sikerült *ex vivo* igazolni humán szőrtüszőkön a növekedési hormon katagén-indukáló hatását [37]. A prolaktin is katagén fázis felé tereli a hajciklust, de csak magas dózisban, és a feltételezett hiperprolaktinémiás állapotok és a hajhullás közötti összefüggés egyelőre nem bizonyított [38, 39].

A nemi hormonok különböző módon hatnak a szőrnövekedésre, hatásuk főleg a másodlagos nemi jellegek megjelenésekor van az az adott nemre jellegzetes szőrzet kialakulásában [40]. Az ösztrogén hatás fő közvetítőjeként ismert 17- β -ösztradiolt korai kutatások rágcsálókban *in vivo* a telogén-anagén átmenetben azonosították [41], később inkább katagén-indukáló, illetve anagén fázisba való átlépést gátló hatását igazolták *in vivo* [42]. Ezt a hatást – egérben – a két ismert receptor közül az ösztrogén-receptor (ER)- α közvetíti, az ER- β pedig, úgy tűnik, hogy féken tartja a másik receptor hatásait. Az ösztrogén-indukált szőrnövekedés-gátlás hátterében BMP-4 szint emelkedését írtak le, ez vezet katagén indukcióhoz és telogén prolongációhoz [43]. Emberben úgy tűnik, hogy az androgénnel karöltve szabályozza a fanszőrzet növekedését, valamint fontos, hogy a szőrtüsző rendelkezik a szteroid szintézishez szükséges enzim-apparátussal, illetve az androgénekből is képes ösztrogéneket előállítani [40]. Különböző nemű emberekből, de azonos bőrterületről (fronto-temporális régió) származó szőrtüszők ellentétesen reagálnak ösztrogén kezelésre, amely a receptor eltérő expressziós mintázatából fakadhat [44].

Az androgének szerepe a férfiakban triviális a másodlagos nemi jellegek, az arc- és szeméremszőrzet kialakításában és az androgén-alopécia, másnéven férfias-mintázatú hajhullás állapotának létrehozásában. Az androgének vérszint-emelkedése serdülőkorban bizonyos lokalizációjú szőrtüszőkre ellentétesen hat (másokat pedig egyáltalán nem érint), ezt a jelenséget szokás androgén-paradoxonnak is nevezni [45]. A hétköznapi megfigyelést is igazolja *in vitro* eredmény, miszerint az androgén-receptor aktiváció fokozza a DP-keratinocita ko-kultúrákban a proliferációt, ha a szakáll területéről származnak a sejtek, míg gátolja azt, ha a sejtek egy kopaszodó régióból származnak [46]. Az androgén hatást *in vivo* nem is a vérben magasan a legnagyobb mennyiségben keringő tesztoszteron, hanem a belőle intracellulárisan az 5- α -reduktáz (5-AR) enzim által átalakított aktív dihidrotesztoszteron (DHT) közvetíti, mely kötődik a nukleáris androgén-receptorhoz [47]. A DP a klasszikusan androgén célszervekhez hasonlóan egyrészt

rendelkezik az androgén receptorral, másrészt az 5-AR enzimmel is. A jelenlegi elképzelés szerint a hirtelen megemelkedő androgén szint indítja meg a szőrtüszők miniaturizálódását, amely makroszkóposan a haj ritkulásához, az androgén alopeciához vezet.

3.1.4.2 A hajciklus és a szőrtüsző egyéb biológiai folyamatainak parakrin szabályozása, különös tekintettel az adenozinra

A humán szőrtüszők egymással nem szinkronizáltan váltanak a hajciklus fázisai között, ebből a szempontból minden szőrtüsző „külön életet él” [4]. A különböző szőrtüszően belüli kompartmentek közötti kommunikációnak így döntő szerepe van a fő biológiai folyamatok, azon belül is elsőként a hajciklus szabályozásában.

A hajciklus szabályozásában számtalan parakrin mediátort írtak le, főleg citokineket és növekedési faktorokat [48]. Megjegyzendő, hogy ezeknek a neve sokszor csak történelmi jelentőségű, néha kissé félrevezető, mert az első leírt hatására utal, és nem feltétlenül lehet következtetni az általános vagy a szőrtüszőre kifejtett hatásaira. Vannak, amelyeknek a morfogenezis során is szerep jut, vannak ugyanakkor, amelyeknek nem ismerjük ilyen hatásait [8, 16].

Mivel régóta ismert, hogy a hajciklus kritikus fázisváltásai közül a katagén fázisban apoptotikus folyamatok mennek végbe, korán vizsgálták a pro-apoptotikus hatású faktorokat, mint potenciális katagén-indukáló hatású ágenseket. Mára ismert, hogy a növekedési faktorok közül az egyik legismertebb és kiterjedten tanulmányozott, szőrtüszőre hatással bíró pro-katagén faktor a TGF-családba tartozó TGF- β 1-3 izotípusa. A 3 TGF- β izotípus 70-80%-os homológiát mutat, és ugyanazokat a receptorokat aktiválja [49]. Viszonylag régi vizsgálatok alapján a TGF- β expresszió (ekkor még nem különítették el az altípusokat) közvetlenül a katagén fázis előtt emelkedik [26]. A TGF- β 2 az egyik legalapvetőbb parakrin mediátor, ami képes katagén fázist indukálni emberi szőrtüszőkben. Jelentőségét fokozza, hogy számos egyéb – parakrin vagy szisztémás – faktor is a TGF- β szintéziséen keresztül képes ezt a hatást kiváltani. Jó példa erre a jelenségre a dihidrotesztoszteron is [50], de *in vitro* eredmények szerint a D3-vitamin is fokozza a DP sejtek

TGF- β szintézisét [51]. Ismert anagén-indukáló faktor is (pl. IGF-1), amely részben a TGF- β szintézis csökkentésén keresztül fejt ki hatását [52]. A TGF- β 2 jellegzetesen az anagén-katagén átmenet során akkumulálódik a szőrtüszőben, és *in vitro* gátolja a szőrnövekedést, ami egybe cseng az előző hatással. Ismert, hogy míg a dermális fibroblasztok nem, addig a DP fibroblasztjai képesek a TGF- β 2 szintézisre [51]. A TGF- β 1 is a DP-ben termelődik, de indukálható módon, pl. androgén hatásra, és egyébként a hajciklusban szintén a katagén fázist megelőzően emelkedik meg az expressziója [53, 54]. Tehát mind a TGF- β 1, mind a TGF- β 2 szintje is androgén hatásra fokozódik, és e hatás mögött szerepet játszik a reaktív oxigén-gyökök termelődése is [55]. A TGF- β 3 hajciklus szabályozásában betöltött szerepéről egyelőre nincs pontos információ, és KO-egérben sincs hatás a szőr-fenotípusra [49], bár emberi szőrtüszőben kimutatták a keratinizálódó MK-sejtekben [27].

Az összes TGF- β típus egyaránt a két receptor altípus (TGF- β receptor-I-II) heterodimeréhez kötődik. A TGF- β receptor expresszió a regrediáló, katagén fázisú szőrtüszőben megjelenő epiteliális nyélben magas, ami arra utal, hogy ez az egyik fontos célpontja a TGF- β hatásnak [27]. A TGF- β receptor-II-t expresszáló sejtek apoptotizálnak, amely alapján a katagén fázist okozó hatás sejtszinten is tetten érhető a szőrtüszőben [27].

Az epidermális növekedési faktor (EGF) receptora (EGFR) anagén fázisú szőrtüszőkben az ORS-ben mutatható ki főleg, de a katagén, majd telogén fázisú szőrtüszőben megjelenő átmeneti struktúrák (epiteliális nyél) is nagy mennyiségben expresszálják [56]. Az EGFR eloszlása egybe cseng azzal, hogy *in vitro* az EGF kezelés a humán szőrtüszőkben katagén átmenetet okoz [57]. EGFR-gátló célzott terápia egyre szélesebb körű használata során hamar kiderült, hogy gyakran szőrtüszőket érintő mellékhatások (acneiform kiütések, megváltozott haj-fenotípus) jelennek meg, ami igazolta az EGF szőrtüsző-biológiában betöltött szerepét [58].

A fibroblaszt növekedési faktor (FGF) családba több parakrin mediátor is tartozik, amelyeknek hatása van a szőrnövekedésre. Az FGF-5 gátolja a szőrnövekedést a DP-sejteken keresztül és

katagén fázist indukál [59]. Árnyalja a képet, hogy az *FGF5* génről két funkcionális fehérje termék képződhet (alternatív „splicing” révén), amik közül a rövidebb FGF-5s (FGF5-short) némileg antagonizálja az FGF-5 hatását egérben [60]. Emberben még nem vizsgálták az FGF-5s hatását a szőrnövekedésre; az FGF-5 jelentőségét az a klinikai tény adja, hogy a génjében bekövetkezett mutáció kórosan hosszú szempilla szőrszálképzéssel, trichomegáliával jár homozigóta egyedekben [61]. Az FGF-18 és FGF-22 expresszióját kutya és rágcsáló szőrtüsző IRS rétegében mutatták ki [62, 63]. Emellett az FGF-18 a telogén dudor régióban is aktív, és KO-egerekben nagyon lecsökken a telogén hossza; ez arra utal, hogy a telogén fázis fenntartásában lehet fontos szerepe [64]. Egerekben az FGF-1,2 és FGF-10 is fokozza a szőrnövekedést *in vivo* [65]. Az FGF-9-et pedig $\gamma\delta$ -T sejtek is termelik sebgyógyulás során [66], ami pedig szőrtüsző neogenezissel jár.

A FGF családba tartozó keratinocita növekedési faktor (KGF) neve is a keratinocitákra kifejtett, proliferációt fokozó hatásból eredeztethető. Nem meglepő módon a szőrtüszőre is hasonló hatást fejt ki, fokozza a szőrtüsző sejteinek proliferációját [67]. A hepatocita növekedési faktor (HGF) inaktív formája is termelődik a DP sejteiben, és a szőrtüszőben a HGF-aktivátor szerin-proteináz enzim hatására alakul át az aktív formává, ami fokozza a szőrnövekedést [68]. Az anagén fázis fenntartásában fontos az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1), receptora, az IGFR1; főként a MK és ORS régiókban expresszálódik anagén szőrtüszőben, és mennyisége katagén átmenet során csökken [69]. Antiapoptotikus hatása mellett más, pro-anagén faktorok (vérlemezke eredetű növekedési faktor, PDGF) szintjét is emeli és így *in vitro* is fokozza a szőrnövekedést [70].

Az adenzin némileg különbözik az eddig tárgyalt parakrin faktoroktól, ugyanis ezek nagy részétől eltérően nem szekretált polipeptid, hanem az anyagcsere-folyamatok során keletkező purin nukleotid. Metabolikus szerepe mellett szignalizációs feladattal bír, saját membrán-receptorai vannak, és ubikviter hatásai szinte minden szervrendszerben megnyilvánulnak. Az adenzin hatásai között is kiemelkedik általánosnak tűnő anti-inflammatorikus hatása, amely akár

farmakológiailag is kihasználható. Az adenzin kezelés egérben *ex vivo* a szőrtüszőben expresszáldó adenzin-receptorok (A_1 , A_{2a} és A_{2b} , A_3) közül az A_{2b} -n aktiválásán keresztül több (fent tárgyalt) növekedési faktor expressziójára is hatással van az, melyek közül az FGF-7 szint fokozása tűnik kiemelkedőnek [71]. Az adenzin indirekt módon fokozza a szőrnövekedést, emberben is *ex vivo* eredmények alapján, és ez a hatás részben a DP sejteken keresztül valósul meg [72]. Munkacsoportunk eredményei szerint az ORSK-k is hozzájárulnak az adenzin hatásának közvetítéséhez a hajciklus szabályozó faktorok (pl. TGF- β 2, IGF1R, EGF) kifejeződésének anagén irányba történő eltolásával [73].

Mindegyik adenzin receptor G-fehérjéhez kapcsolt 7-transzmembrán (7-TM) receptor, és az adenilát cikláz fehérje működését pozitív/negatív irányba befolyásolja. Az A_1 és A_3 csökkenti a működését, a többi fokozza, így a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szintre is ugyanilyen hatással vannak, ami végső soron a proteinkináz-A (PKA) enzimaktivitás fokozásához vagy csökkenéséhez és célfehérje-foszforyláció szintjének változásához vezet. Érdekes, hogy pont a cAMP-szintet és PKA-jelátviteli útvonalat serkentő A_{2b} receptort sikerült összefüggésbe hozni az adenzin hajciklusra kifejtett pozitív hatásaival, mert korai kutatási eredmények, pl. az IL-1 β ellentétes hatása mögött is a cAMP szint fokozását mutatták ki [74], és a PKA-szignál emelkedése is hasonló hatású [75]. Ez a látszólagos ellentét a szőrtüsző-biológia és az azt célzó kutatások komplexitására utal. Ez a „mini-orgánium” megannyi féle sejtből épül fel, és az egész szerv-kultúrát célzó kísérletek során nem lehet egyértelmű hatást rendelni egy jelátviteli útvonalhoz. Előfordulhat, hogy a DP-sejtekben az adenzin fokozza az anagén faktorok szintézisét, így a szőrtüsző egészén is hasonló hatásokat okoz, azonban az adott jelátviteli útvonal bekapcsolása minden szőrtüszőt alkotó sejtben – pl. a MK vagy ORSK sejteken való dominanciával – ellentétes hatásokat vált ki. A klinikumban, sikeresen alkalmazott szőrnövekedést fokozó szer, a minoxidil

hatásának háttérében is részben az adenzin felszabadítás áll. Részben erre alapozva adenzin tartalmú kozmetikai termékek elérhetőek, amelyek klinikai validálása még várat magára [76].

3.1.5. A szőrtüsző biológiájának immunológiai vonatkozásai

A bőr immunológiai jelentősége szintén barrier funkciójából fakad; jelentős számú rezidens immunsejt található benne, melyek száma bizonyos körülmények esetén sokszorosára nőhet. A bőr immunrendszerének, a sok és sokféle funkciójú immunsejt jelenlétének a kórokozók elleni immunitás kialakítása és fenntartása a célja; ugyanakkor pont ez ad lehetőséget szenitizáció, autoimmun és auto-inflammatórikus folyamatok, betegségek kialakulására, amelyek a szőrtüszőt is érinthetik [77]. Tekintettel arra, hogy a szőrtüsző tulajdonképpen egy nyílás a bőrbarrieren belül, gyakran és könnyen indulnak be gyulladásoos folyamatok a pilosebáceus egység mikroöryezetében, mivel a patogének ellen erélyes immunválaszra van szükség. Érdekes, és (a többi, ilyen szempontból hasonló szövethez, szervhez képest) kevésbé ismert tény, hogy a szőrtüsző immunprivilegiummal rendelkező szerv (lásd „3.1.5.2. Immunprivilegium és jelentősége” alfejezet), és ennek elvesztése haj- és szőrhiányos állapottal járhat [78].

3.1.5.1. Gyulladás a szőrtüszőben, illetve a gyulladásban résztvevő faktorok egyéb jelentősége a szőrbiológiában

A veleszületett immunrendszer elemei jelen vannak a szőrtüszőben, nyugalomban is előfordulnak immunkompetens sejtek, pl. Langerhans sejtek [6]. Az epidermiszhez képest a disztális ORS-ben (vagyis a bőrfelszínhez közel) magasabb a CD8+ és CD4+ sejtek mennyisége, amely nem meglepő annak az egyszerű ténynek a tükrében, hogy a szőrtüsző ezen része behatolási kapu lehet a kórokozóknak [77]. A gyulladás évezredek óta ismert jellegzetes tünetei (calor, dolor, tumor, rubor és functio laesa) a szőrtüszőben is gyakran tetten érhetőek, elég, ha a prototípikus akut szőrtüsző-gyulladásra (folliculitisre) gondolunk. A gyulladás során létrejövő immunválasz célja a behatoló mikróbák eliminációja, melyben számos immun(kompetens)-sejt és az általuk termelt mediátor szerepet játszik [79]. Az immunválasz első szintje a behatolók érzékelése. A mikróbákra – de az

eukariótákra általában nem – jellemző molekuláris mintázatokat (pl. virális duplaszálú RNS-t vagy bakteriális lipopoliszacharidot) felismerő receptorok (pathogen associated molecular pattern, PAMP), az úgynevezett „toll-like receptorok” (TLR) a bőrben bőségesen jelen vannak [80]. A rágcsáló szőrtüszőkben az ORS rétegben jelen lévő TLR-ken keresztül antimikrobiális hatású fehérjék expressziója fokozódik [81], illetve a keratinocitákban lévő TLR3 fokozza a pro-inflammatórikus hatású citokinek, pl. interleukin-6 (IL-6) expresszióját. A TLR3 ligandja, a duplaszálú RNS egy másik típusú PAMP-receptort, az NLRP3-t is képes aktiválni, mely szintén kifejeződik az ORSK-kon. Az NLRP3 a NF- κ B (nukleáris faktor- κ B) szignalizáción keresztül hozzájárul a pro-inflammatórikus szignál beindításához, elsőként az IL-1 β szintézishez, majd kaszkádszerűen a TNF- α és az IL-6 expresszió fokozódásához [82]. A duplaszálú RNS-hez hasonló molekulák a szöveti sérülés során is felszabadulnak, és ezek a TLR3 aktiválásával hozzájárulnak a regenerációhoz, sebgyógyuláshoz, amely általában együtt jár a szőrtüsző neogenezissel; a TLR3 aktiváció ugyanis a szőrtüsző morfogenezisében ismert útvonalakat is bekapcsolja [83]. Az NF- κ B transzkripciós faktor szőrtüsző biológiájában betöltött fontos szerepét az is jól érzékelteti, hogy a rágcsálókban a különböző szőrtípusok esetében eltérően, ciklus-függő módon változik az expresszió szintje; ez a telogén-anagén átmenetben tűnik jelentősnek [84]. *In vitro* eredmények alapján az NF- κ B az emberi hajciklusban is fontos szereplő, szükséges az anagén fázis fenntartásához [85].

A lokálisan felszabaduló citokinek nem csak a pro-inflammatórikus hatásukat fejtik ki (pl. a gyulladásban résztvevő leukocitákat vonzzák a szőrtüsző környékére), hanem magára a szőrtüszőre is hatással vannak. Az IL-1 α és IL-1 β , valamint a TNF α is gátolja a humán szőrtüsző növekedését *in vitro*, és disztrófiás anagén fázis kialakulását eredményezik [86]. Az IL-1 β -ről az is ismert, hogy a szőrnövekedést gátló hatása a cAMP-szint fokozásán keresztül valósul meg [74]. Ezek mellett az egyébként főleg antivirális védekezésben érintett interferon- γ (IFN- γ) is gátolja az *ex vivo*

szőrnövekedést, és katagén átmenetet indukál [48, 87]. Az IFN- γ azonban nem csak a veleszületett, hanem az adaptív immunrendszernek is fontos szereplője, és a krónikus kórképek kialakulásában is fontos szereppel bírhat a szőrbiológiában. A vélhetően DP-fibroblasztok által termelt IFN- β *in vitro* gátolja az ORS-keratinociták növekedését [88]; érdekes módon azonban megfigyelték, hogy melanoma kimetszés utáni injekciós kezelések során *in vivo* szőrnövekedést képes kiváltani az injekciók területén [89]. A TNF α negatív hatást vált ki az *in vitro* szőrnövekedésre, ám, mivel gyakran alkalmazott terápiás célpont, a klinikumból is rendelhetünk hozzá releváns *in vivo* szőrbiológiai hatásokat. A TNF α -gátló kezelések sokszorosán dokumentált mellékhatása a kopaszodás, azonban ebben az esetben nem direkt a hajciklus zavara, mintsem az autoimmun – később részletezett – mechanizmusú alopecia areata kialakulása állhat a háttérben [90].

3.1.5.2. Immunprivilegium és jelentősége

Az emberi szervezeten belül létezik néhány, más szempontból egymástól teljesen független szövet, illetve szerv (pl. here, központi idegrendszer, placenta), amelyek közös tulajdonsága az immunprivilegizált státusz. Ez többszintű, és különböző faktorok összjátékaként jön létre, úgymint az adott parenchimális sejtek rendkívül alacsony mértékű saját antigén prezentációja, lokálisan immun-suppresszív hatású faktorok termelődése (pl. TGF- β 1, IL-10), a nyirokelvezetés hiánya az adott területről, illetve az autoreaktív sejtek apoptózisát kiváltó ingerek jelenléte (pl. Fas-Fas-ligand interakció) [79]. Végző soron az immunrendszer nem képes az ilyen, immun-privilegizált szervek sejtjei ellen hatékony, celluláris immunválasz kifejtésére. Ezek közül a faktorok közül a szőrtüszőt, pontosabban az anagén szőrtüsző bulbusát jellemzi az egyik legfontosabb, vagyis az antigén prezentáció hiánya, mégpedig a major hisztokompatibilitási komplex (MHC-I) molekulák alacsony expressziója miatt [78]. Az ORS-rétegben dúsan expresszálandó FAS-ligand szintén hozzájárul az immunprivilegium fenntartásához a megjelenő immunsejtek apoptózisának kiváltásával [77]. Bár egyelőre nem teljesen ismert, hogy miért alakult ki a szőrtüsző speciális,

immunpriviligizált státusza és az ezzel együtt járó tolerancia kialakulásának hiánya, a (klinikai) jelentőségét annak elvesztése adja. A szőrtüszőben indukálható az MHC-I molekulák expressziója, és ebben az esetben kialakuló sejtes immunválasz a szőrtüsző destrukciójához, a hajszál elvesztéséhez vezet; ezt az állapotot az alopecia areatának nevezzük [91].

3.1.5.3. Immunmechanizmusú patológiás állapotok a szőrtüszőben, alopecia areata

Mint az előbbi alfejezetekben ismertettem, a szőrtüsző – mint a bőr általában – dúsan átszött immunsejtekkel. Nem meglepetés, hogy túlzott, inadekvát vagy patológiás irányú (autoreaktív) immunválasz ilyen környezetben kialakulhat, és károsíthatja a szőrtüszőt vagy annak szűkebb környezetét. Ez lehet egyszerű gyulladás (pl. egy banális folliculitis), amely általában a szőrszál elvesztésével jár (functio laesa), kiterjedhet a teljes pilosebáceus egységre (pl. a serdülőkorban valamilyen szinten már-már nem is patológiás acne), de megjelenhet speciális lokalizációban is (pl. hidradenitis suppurativa). A foltos vagy akár teljes szőrzet- és hajhiánnyal járó, immunológiai alapokon kialakuló, szőrtüszőt érintő patológiás állapot az alopecia areata. Ebben a betegségben a korábban említett immunprivilegium összeomlása az első lépés. Ennek a mechanizmusa a saját antigéneket minden sejten prezentálni képes, egyébként a szőrtüszőben nem expresszálódó MHC-I molekulák megjelenése [92]. Több parakrin mediátorról ismert, hogy képes ezt a hatást kiváltani; ezek közül az IFN- γ a legpotensebb, de fontos, hogy az akut gyulladásban is szerepet játszó TNF- α és IL-1 is képes erre, ami arra utal, hogy gyulladásos állapotok idézhetik elő az alopecia areata kezdeti szakaszát [92]. Ezután a feltároló autoantigének ellen kialakuló, citotoxikus T-limfociták által mediált sejtes immunválasz elpusztítja a szőrtüszőt, ahogyan azt Angela Christiano és munkacsoportja rendkívül elegáns kísérletsorozatát tartalmazó közleményében leírta [91]. Nem csupán azonosították a CD8+ citotoxikus T-sejtek alcsoportját, amely az IFN- γ forrása, hanem egérmodelljükben ezt ki tudták védeni a T-sejteket stimuláló IL-2 és IL-15R β gátlásával. Továbbá, az azonosított citokinek receptorainak jelátviteli útvonalában kiemelten fontos Janus arcú-kináz

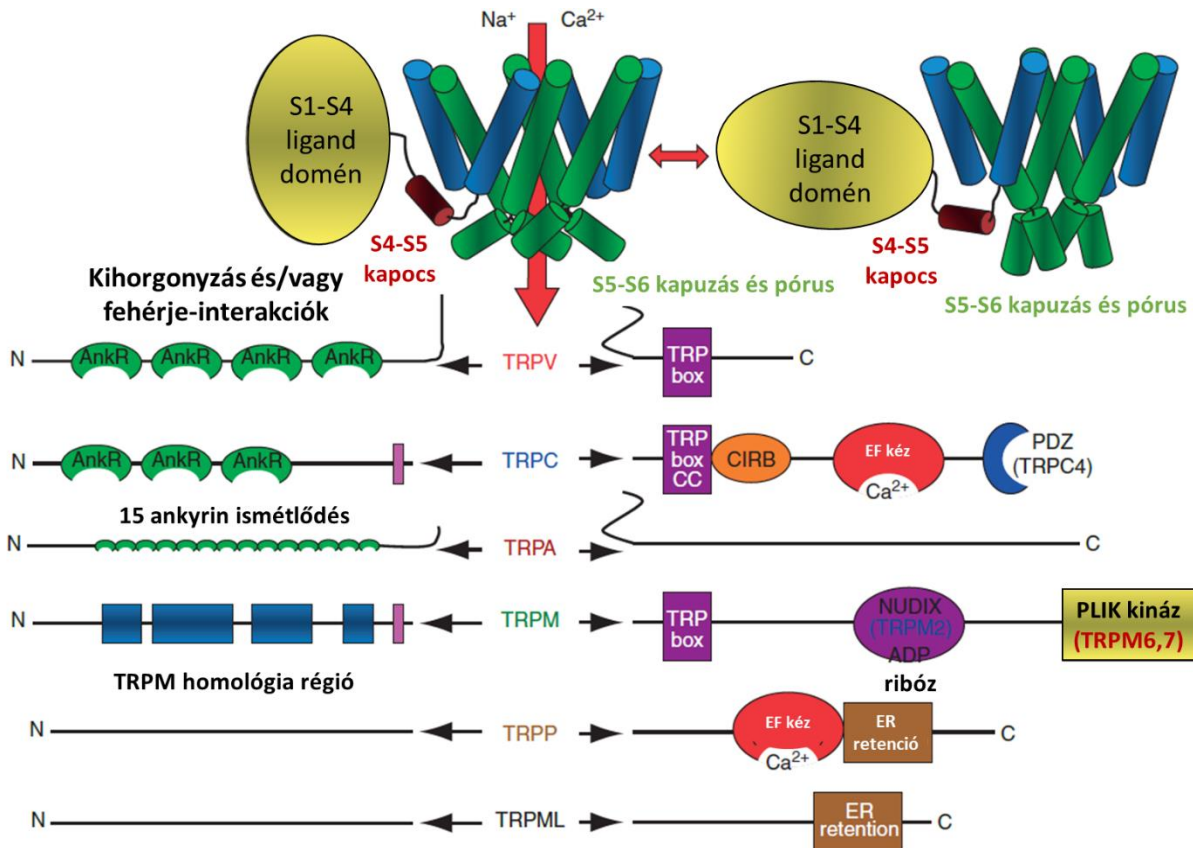
(JAK) 1-3 gátlásával ki tudták védeni az alopecia areata kialakulását egér modellben, és mint effektív terápiás modalitást vetették be humán betegekből.

3.2. A tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatorna szupercsalád és az endokannabinoid rendszer általános jellemzése és a bőrben betöltött szerepük

3.2.1. A TRP csatornák

A tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatornák szupercsaládja egy, az evolúció során jól konzervált kationcsatornákat magába foglaló csoport [93]. A TRP csatornák közös tulajdonsága 6 TM régió és változó számú ankyrin-domén megléte. Minden fajban meglévő összes típusát figyelembe véve eddig kb. 50 különböző TRP csatornát írtak le; az emlősök TRP csatornái közé jelenlegi ismereteink szerint 28 családtag tartozik [94]. Ezeket nem ligandumok alapján soroljuk csoportokba, hanem az egymáshoz való strukturális hasonlóság alapján (6. ábra). Ráadásul több TRP csatornának nem ismerjük klasszikus értelemben vett ligandját, sőt, a TRP-ekre kifejezetten jellemző, hogy sokféle modalitás (pl. fény, ozmolaritás, pH, hő, mechanikai változás) képes aktiválni. Nevét is erről kapta: a *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) retináján fény hatására Ca^{2+} -tranzienseket mértek, melyet az akkor leírt TRP csatorna közvetített [95]. A TRP családba tartozó csatornafehérjéket fent említett csoportosítása alapján megkülönböztetjük a vanilloid (TRPV), melastatin (TRPM), kanonikus (canonical – TRPC), polycystin (TRPP), mucolypin (TRPML) és ankyrin (TRPA) alsaládokat. Érdekes módon az előbb ismertetett alsóportokon átívelő tulajdonság a bizonyos TRP csatornákra jellemző hő-stimulussal való aktiválhatóság. Ezek a hőérzékeny TRP csatornák, másnéven „thermo-TRP”-csatornák, amelyek ráadásul kiemelten fontosnak tűnnek a bőr élettani funkcióinak szabályozásában. A különböző thermo-TRP csatornák közül a TRPA1 és TRPM7 hideg, a TRPV3 és TRPV4 meleg, a TRPV1 és TRPV2 a forró hőmérsékleti stimulussal aktiválható. A TRP-receptorok közül leginkább a prototípikus TRPV1 tulajdonságait ismerjük, hiszen a fájdalom érzékelésben kiemelkedő fontosságú A δ és C rostokon expresszálódik, hátsógyöki ganglion (DRG, dorsal root ganglion) sejtekből sikerült klónozni, és ez

az a csatorna, amelyik a csípős paprika hatóanyaga, a kapszaicin hatásait is közvetíti. Nem véletlen, hogy ehhez az érzés-féleséghez a forróságot társítjuk, hiszen ezek a receptorok – és így az ezeket kifejező neuronok is – a forró (>42 °C) hőmérséklettel is aktiválhatóak.



6. ábra

Tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák általános felépítése

Az N-terminális régióban változó számban fordulnak elő Ankr-k, de nem minden TRP családban vannak jelen. A működő tetramer TRP csatornában a 4 alegység S5-S6 szegmentumai alkotják a pórust, az ionmozgást a piros nyíl mutatja ezen keresztül. Az S4 – S5 kapcsoló továbbítja a konformációváltozást a feszültségérzékelő S1 – S4 domén (arany ellipszis) felől az S6 kapuig (zöld, alsó). Az N- és C-terminális polipeptidláncok fő doménjei alcsaládonként változnak. A TRP box többé-kevésbé konzervált. **AnkR**, ankyrin ismétlés; **CIRC**: feltételezett kalmodulin és inozitol, 1,4,5-trifoszfát receptor kötő domén; **EF kéz**, Ca²⁺-kötő domén; **NUDIX**, ADP ribóz /NAD kötő domén; **PLIK**, szerin / treonin-kináz; **PDZ**, a scaffold-fehérjéhez kötődő domén. Clapham: *Transient Receptor Potential (TRP) Channels* [95] alapján.

3.2.2. A TRPV4 általános jellemzése

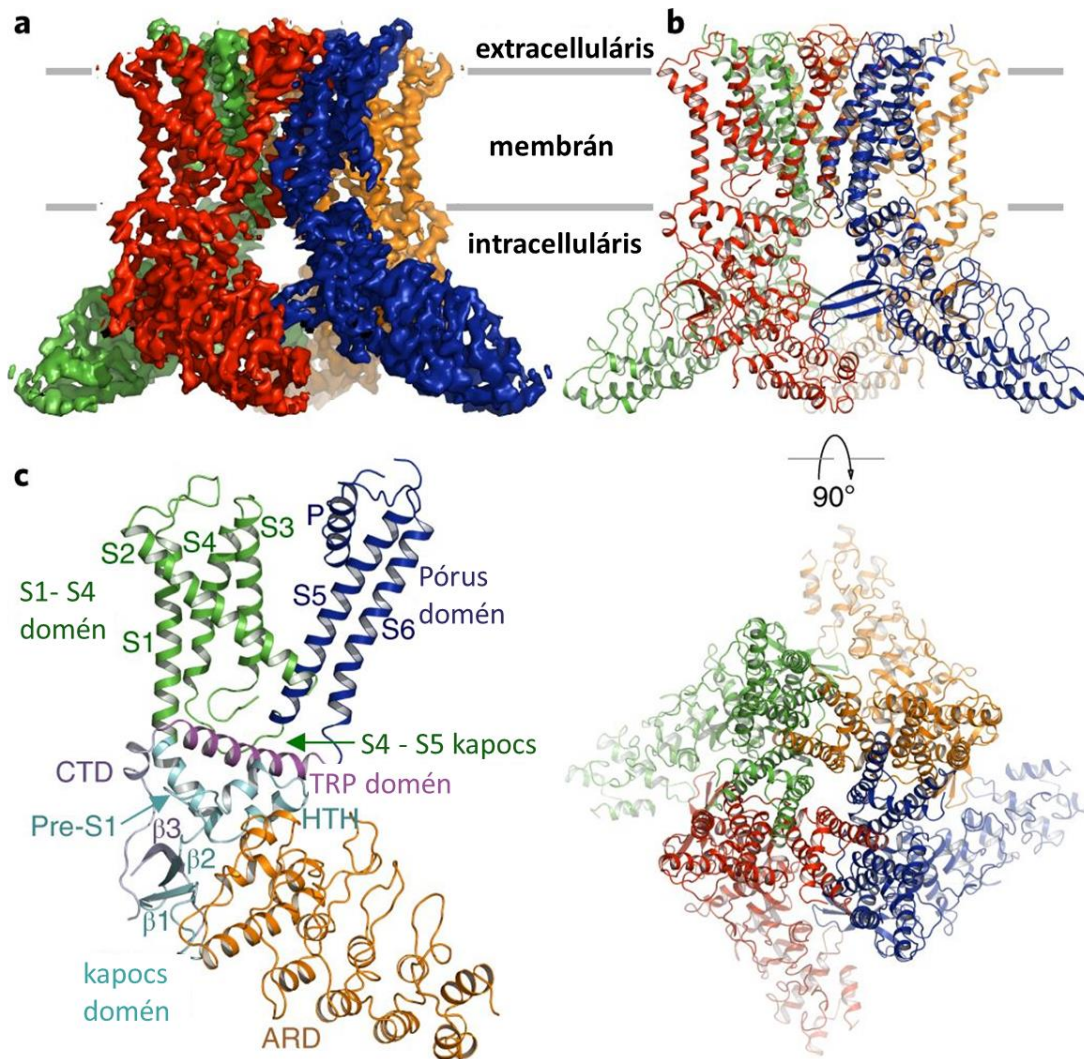
A TRPV4 ioncsatorna korábbi elnevezései utalnak felfedezésének időpontjából (2000) eredő kronológiai tényekre (VRL2, vanilloid receptor like-2) vagy az aktiválhatóságával és

funkcionalitásával kapcsolatos korai kutatási eredményekre, pl. OTRPC4 (ozmoszenzitív tranziens receptor potenciál csatorna 4) és VR-OAC (vanilloid receptor-related osmotically activated channel). Sőt, a közelmúltban sikerült azonosítani, hogy a korábban csak „DSper”-ként (a „spermium depolarizáló csatornája”-ként) elnevezett kation csatorna is a TRPV4 [96].

A TRPV4 ioncsatorna is egy non-szelektív Ca^{2+} -csatorna, strukturálisan négy, egyenként 6 TM-doménnel rendelkező alegységből felépülő tetramer-fehérje [97]. White és munkatársai közelmúltban megjelent irodalmi áttekintésében dolgozta fel a TRPV4-ről felhalmozott ismereteinket, ezért a TRPV4 általános jellemzésénél – és ahol külön nem hivatkozok más cikkekre – főként erre a műre utalok értekezésemben [98]. Általában homotetramer formában fordul elő, de leírtak más TRP-receptor csatorna alegységekkel (pl. TRPC1, TRPP2) képzett heterotetramer fehérjét is. A N-terminális közelében lévő TRP-domén szükséges a tetramer-képzéshez. A hat transzmembrán (S1-S6) régió előtt és után lévő C- és N-terminális is intracellulárisan helyezkedik el, az ionok áteresztését lehetővé tévő pórusképző domén a két utolsó (S5-S6) TM régióból épül fel (6-7. ábrák). A TRPV4 csatorna kb. 40 más fehérjével kerülhet interakcióba, így olyan alapvető intracelluláris szabályozó molekulák kötőhelyei is megtalálhatóak rajta, mint pl. az ATP, kalmodulin és a foszfatidil-inozitol-biszfoszfát.

A TRPV4 csatorna többféle különböző modalitással is aktiválható, melyek közül az ozmolaritásváltozás volt az első azonosított ingerféléység. Emellett mechanikai deformáció is képes nyitni a TRPV4-et, és ennek a nyomásérzékelésben van jelentősége; ráadásul ez a két mechanizmus össze is függ, az ozmolaritás csökkenése szenzitizálja a TRPV4-et mechanikai ingerekre. Annak ellenére, hogy a hipotóniás extracelluláris tér jól ismert módon fokozza a TRPV4 aktivitást, bizonyos körülmények között a fokozott ozmolaritás is aktiválhatja a TRPV4-et [98]; ezen utóbbi mechanizmusa még nem ismert részleteiben.

A thermo-TRP csatornák közé tartozó TRPV4-et a 25 °C feletti hőmérséklet aktiválja, bár ez nem egy éles határ, amely alatt nem, felett pedig kinyit az ioncsatorna. Az összefüggés fokozatos, minél magasabb a (határ feletti) hőmérséklet, annál nagyobb Ca^{2+} -beáramláshoz vezet.



7. ábra

A TRPV4 szerkezete

*Tetramer formában (a,b,d), illetve egy monomer cryo-elektron mikroszkópos mérések alapján szerkesztett sematikus kép (c). Deng és mtsai [98] alapján. Részletes leírás a szövegben. **ARD**, ankyrin ismétlés domén (ankyrin repeat domain), **CTD**: citoszolikus C-terminális domén, **HTH**: helix-turn-helix domén.*

Ráadásul a küszöbhőmérséklet változhat attól függően, hogy milyen sejten, milyen egyéb TRP receptorok kifejeződésével együtt expresszálódik a TRPV4 ioncsatorna. Emellett a hőérzékenységet befolyásolhatják egyéb körülmények is (aktivált jelátviteli útvonalak, más

ingerrel szenzitizáció), így végsősoron a küszöbhőmérséklet akár testhőmérséklet közeli érték is lehet [99]. A tartós aktivációs hőmérséklet feletti állapot pedig csatorna-deszenzitizációhoz vezet, ami esetén a TRPV4 csatorna inaktív állapotba kerül. Azonban, ha ez a tartós inaktivált állapot tovább fennáll, akklimatizálódhat is a TRPV4, vagyis a folyamatos hőstimulus végső soron akár folytonos aktivitáshoz is vezethet. Az aktiváló hőmérsékleti tartomány szenzitizálja a TRPV4 csatornákat más ingerféleségek irányában is. A TRPV4 hőingerrel való aktivációja tehát több tényezőtől függ, és bár izolált humán keratinocitákban nem vizsgálták ezt *in vitro*, egér keratinocitákban a TRPV4 aktivációs küszöb-hőmérséklet kb. 32 °C [99].

Egyre inkább hozzák összefüggésbe a TRPV4 funkciót a gyulladás kialakulásával, többek között azért, mert a farmakológiai vagy genetikai gátlása mellett az LPS által kiváltott gyulladásos citokin termelés elmarad vagy csökkent mértékű [100].

Alacsony pH és különböző savak is képesek aktiválni a TRPV4-t, de nem teljesen ismert ennek mechanizmusa. A savas pH gyakran kíséri a gyulladásos folyamatokat, amihez az ödéma révén mechanikai deformáció is társul, mindkettő képes aktiválni a TRPV4-et. Emiatt, valamint többféle modell és faj vizsgálatával szerzett eredmények alapján a TRPV4-et fontosnak tartjuk a gyulladásos folyamatok kialakulásában [98].

Endogén ligandumok közül a prototípikus kannabinoid, az anandamid (n-arachydonoil-etanolamin) és metabolitja, az arachinoid-sav indirekt módon képes aktiválni a TRPV4-et (egy Cyp450-epoxigenáz enzim mediált módon képződő metabolit révén). Emellett a szintén endogén, a mevalonát anyagcsere-útvonalban szerepet játszó dimetil-allil-pirofoszfát (DMAPP) is aktiválja a csatornát mikromoláris tartományba eső félmaximális dózisban, bár kérdéses, hogy hatása a biológiailag releváns koncentráció-tartomány esetén, *in vivo* is megnyilvánul-e [98].

A TRPV4 aktivációja Ca^{2+} -beáramlással jár; a szignalizációban ugyanakkor fontos, hogy a Ca^{2+} -szenzitív K^+ -csatornával gyakori kolokalizáció miatt sokszor – az ingerlékeny sejteken különösen

fontos módon – hiperpolarizációhoz vezet. Emellett a nitrogén-monoxid (NO) termelést is serkenti, az illékony NO pedig a szomszédos sejtekben szintén képes akár a Ca^{2+} -szignállal ellentétes hatást kiváltani. Ennek megfelelően a bőrön kívül a TRPV4 szerepe fontosnak tűnik a vérkeringés komplex szabályozásában, a tüdőben, az urogenitális rendszerben [98, 101].

3.2.2.1. A TRPV4 szerepe a bőrben

A TRPV4 az epidermális barrier felépítésében fontos szerepet játszhat, főként *in vitro* eredmények alapján. A keratinocitákban a sejtkapcsolatokat kialakító zonula adherensben az E-cadherin és β -catenin partnereként fejeződik ki, és a TRPV4 aktiváció – vélhetően a beáramló Ca^{2+} miatt – kedvez a sejt-sejt kapcsolatok kialakulásának [102, 103]. Nem meglepő tehát, hogy a TRPV4 hiányában csökken a barrier funkció. A TRPV4 emellett a zonula occludens típusú sejt-sejt kapcsolatok kialakításához is hozzájárul [104], ami szintén fokozza a barrier-funkciót, a bőr paracelluláris folyadék- és ionvesztését limitálva. A hőmérséklet emelése a károsodott barrier helyreállítását serkenti *in vivo* egérben és emberben is, mely hatást vélhetően a TRPV4 mediálja [105]. Ezt a megfigyelést támasztja alá kémiai agonistával mért eredmény, kiemelendő, hogy a szintén termo-TRP csatorna TRPV1 aktivációja és a magasabb hőmérséklet ezzel ellentétes hatású. A TRPV4-nek szerepe van a bőr ereinek vazodilatációjában, amely a hőszabályozásban játszhat szerepet, ugyanis a kémiai aktivációval kiváltott ér-konduktancia növekedés mértéke a hőstresszéhez mérhető [106].

A függelékek és a TRPV4 viszonyáról kevesebb ismeretünk van, közülük a faggyúmirigyben igazolt a TRPV4 expresszió, aktivációjának hatására a sejtek proliferációja csökken [107]. Az *in vivo* alkalmazott TRPV4 aktivátornak ugyanakkor nem volt hatása a verejtékezésre [106]. A szőrtüszőben nem vizsgálták a TRPV4 kifejeződését, illetve az aktiváció hatását, de annyi ismerettel mindenesetre rendelkezünk egér bőrön végzett kísérletek eredményeiből, hogy a TRPV4

leginkább az ORS rétegben fejeződik ki, valamint a DP-ben nem tudták igazolni az mRNS-szintű kifejeződését [108].

3.2.3. Az endokannabinoid rendszer

Endokannabinoid rendszernek (ECS) nevezzük szűkebb értelemben az endogén, vagyis a szervezet által termelt kannabinoid vegyületeket, az azok szintéziséhez és degradációjához szükséges enzim-apparátust és az endokannabinoidokra (eCB) érzékeny sejt felszíni receptorokat. Tágabb értelemben hozzá sorolunk még olyan, egyébként más rendszerekbe jobban illeszkedő receptorokat vagy enzimeket is, amelyeken keresztül szintén képesek eCB-k hatást kifejteni (8. ábra). Az ECS nevét a *Cannabis sativa*-ról kapta, ugyanis az évezredek óta ismert növény pszichoaktív

Ligandok	Endocannabinoidok (eCB) és társult molekulák			Egyéb modulatorok N-arachidonoyl amino savak, Pregnenolon, Lipoxin A4	Phytocannabinoidok "Klasszikus" THC, THCV, CBD, CBN, CBG, CBGV, CBC, CBDV "Nem-klasszikus" e.g. β -caryophyllene, (-)-cis-PET
	"Klasszikus" ligandok Anandamide 2-Arachidonoylglycerol	Peptid ligandok Pepkánok	"ECS-társult" molekulák Palmitoylethanolamin Oleoylethanolamid		
Receptorok	"Klasszikus" CB ₁ , CB ₂	Ionotróp TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1, TRPM8	"Novel" (?) GPR3, -6, -12, -18, -55, -92, -119	Magreceptor PPAR α , PPAR γ PPAR δ	"Nem-cannabinoid" célpontok 5-HT _{1A} , GlyR, A _{2A} , α_2 R, 5-HT ₃ , μ R, δ R, A ₃
	Szintézis DAGL α , DAGL β , NAPE-PLD, PTPN22			Lebontás MAGL, FAAH1, -2, ABHD6, ABHD12, NAAA, COX ₂ , LOX	
Transzporterek	Extracelluláris eCB transzporterek	eCB membrán transzporter(ek)?		Intracelluláris eCB transzporterek	

8. ábra

Az ECS-t alkotó ligandok, receptorok, enzimek és transzporterek

Az ECS tagjai rendszerezve. A leírás, illetve a rövidítések a szövegben, illetve a rövidítések fejezetben. Tóth és mtsai (2019) alapján [113].

hatóanyaga a ECS-hez tartozó sejt felszíni receptorokon hatva fejt ki hatásait [109]. Két, a klasszikus értelemben vett ECS-hez köthető receptor a kannabinoid-receptor-1 és -2 (CB1 és CB2). Mindkettő a metabotróp, azon belül a 7-transzmembrán régióval (7TM) rendelkező, Gs-fehérjéhez kötött receptorok közé tartozik. Ennek megfelelően aktiváció esetén a sejten belül emelkedik a cAMP szint, amely hatására, csakúgy, mint ahogy az adenzin receptorok jelátvitelénél említettük, a PKA-függő fehérje foszforilációs jelátviteli út vonal aktiválódik. Az adenzin-receptor aktiváció

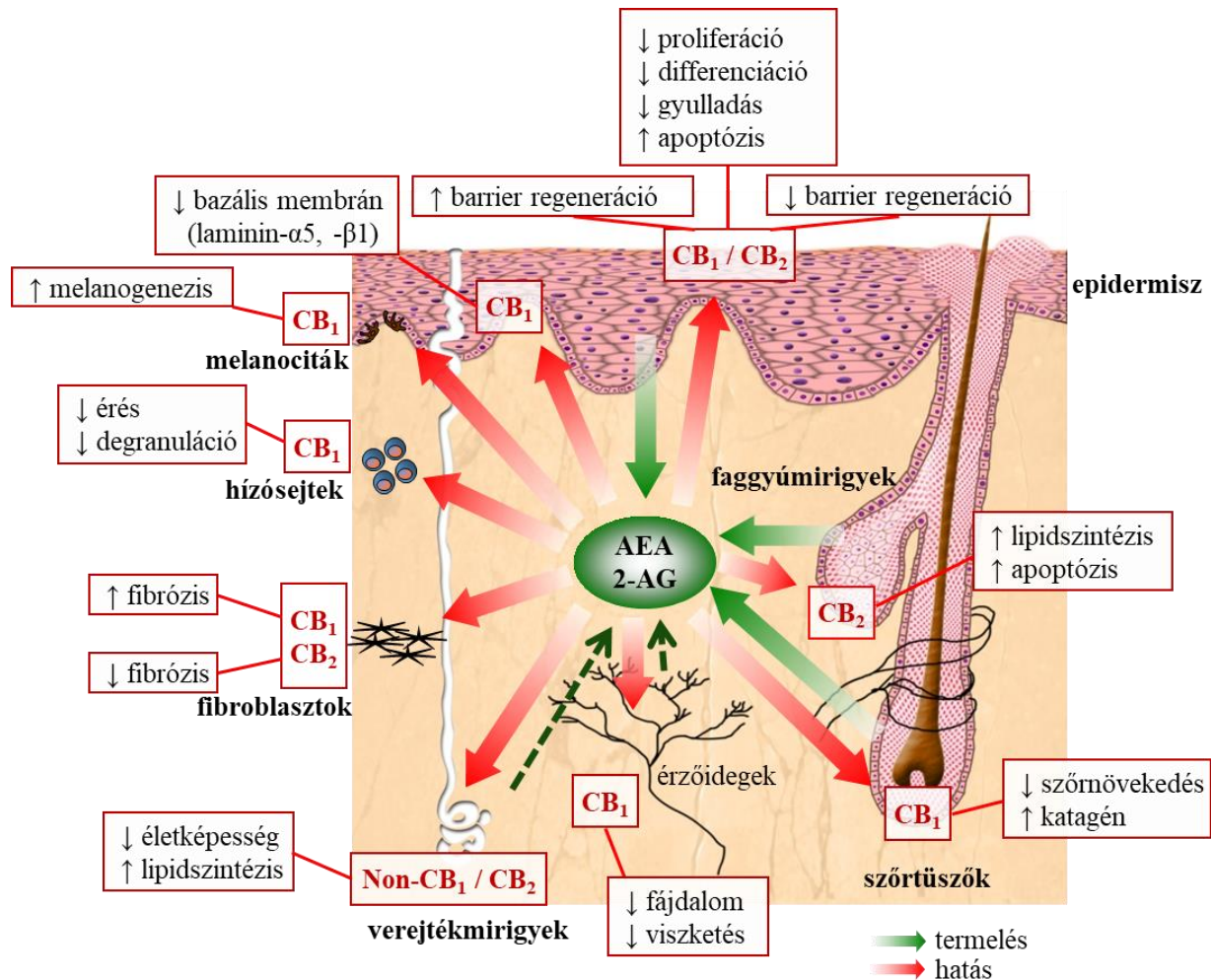
során aktív jelátviteli mechanizmussal szignalizálnak a „novel”-ECS receptorok is (7. ábra). Emellett bizonyos eCB-ok képesek több TRP-csatornát is aktiválni, emiatt a TRP-receptorokat is az ECS-hez soroljuk. Végül pedig, az említett TRPV4 mellett a CB1 és CB2 is aktiválható bizonyos UV-fénytartományba eső fényimpulzussal, bár az ilyen, nem klasszikus ligand-kötés révén aktiváló modalitásokat nem soroljuk az ECS-hez. A TRP és ECS egymáshoz való viszonyának megítélése jelenleg sem teljesen egységes. Vannak kutatók, akik a TRP csatornákat nevezik „ionotróp kannabinoid-receptornak”, mások az eCB-kat nevezik „endovanilloidoknak”. Ennek a nemhivatalos, kissé elfogult nevezéktannak bár vannak hátulütői, jól jelzi, hogy a majdnem párhuzamosan felfedezett ECS és TRP-család nagyon szorosan összefügg.

3.2.3.1 Az endokannabinoid rendszer szerepe a bőr élettani működésében

Az ECS a bőrben majd minden fontos funkcióban szerepet játszik [110, 111], amelynek összefoglalása az 10. ábrán látható. A közelmúltban minden részletre kiterjedően Tóth és munkatársai foglalták össze a bőr és az ECS kapcsolatáról származó eddig összegyűlt ismereteinket [112]. Az ECS-nek fontos feladata van többek között az epidermális barrier egyensúlyának beállításában, a melanogenezisben és az immunfolyamatokban. A bőrfüggelékek közül a faggyúmirigyen kifejeződő CB2 lipidszintézist fokozó hatásokat közvetít, valamint a perifériás idegeken a fájdalom- és viszketésérzékelésben is szerepet játszik.

A szőrtüsző kiemelt jelentőségét adja, hogy képes endokannabinoid vegyületek termelésére is (9-10. ábra). A szőrtüsző főleg anandamidot, de kisebb mértékben 2-AG-t is felszabadít [113], melyek a szőrtüszőn kifejeződő CB1 receptor aktivációja révén katagén indukcióhoz vezetnek *in vitro* (a CB2 receptor nem fejeződik ki a szőrtüszőn). Emellett a forró hőmérséklettel és (a csípős paprikák hatását kiváltó) kapszaicinnal aktiválható prototípus TRP receptor, a TRPV1 is kifejeződik a szőrtüszőn [114]. Egérkísérletek alapján katagén szőrtüszőben megnő a TRPV1 expressziója, valamint a TRPV1-KO egérben a katagén fázis késleltetve jelenik meg [114]. A TRPV1 aktiváció

humán szőrtüszőn is katagén fázist indukál *ex vivo* [115]. Ennek látszólag ellentmond, hogy régóta alkalmazunk a klinikai gyakorlatban kapszaicin tartalmú externákat külsőleges alkalmazásra alopecia kezelésére. Az *in vitro* és *ex vivo* vizsgálatok mindig limitációkkal is rendelkeznek, pl. az



9. ábra

Az endokannabinoid rendszer ligandjai és receptorai a bőrben, illetve a szabályozott funkciók

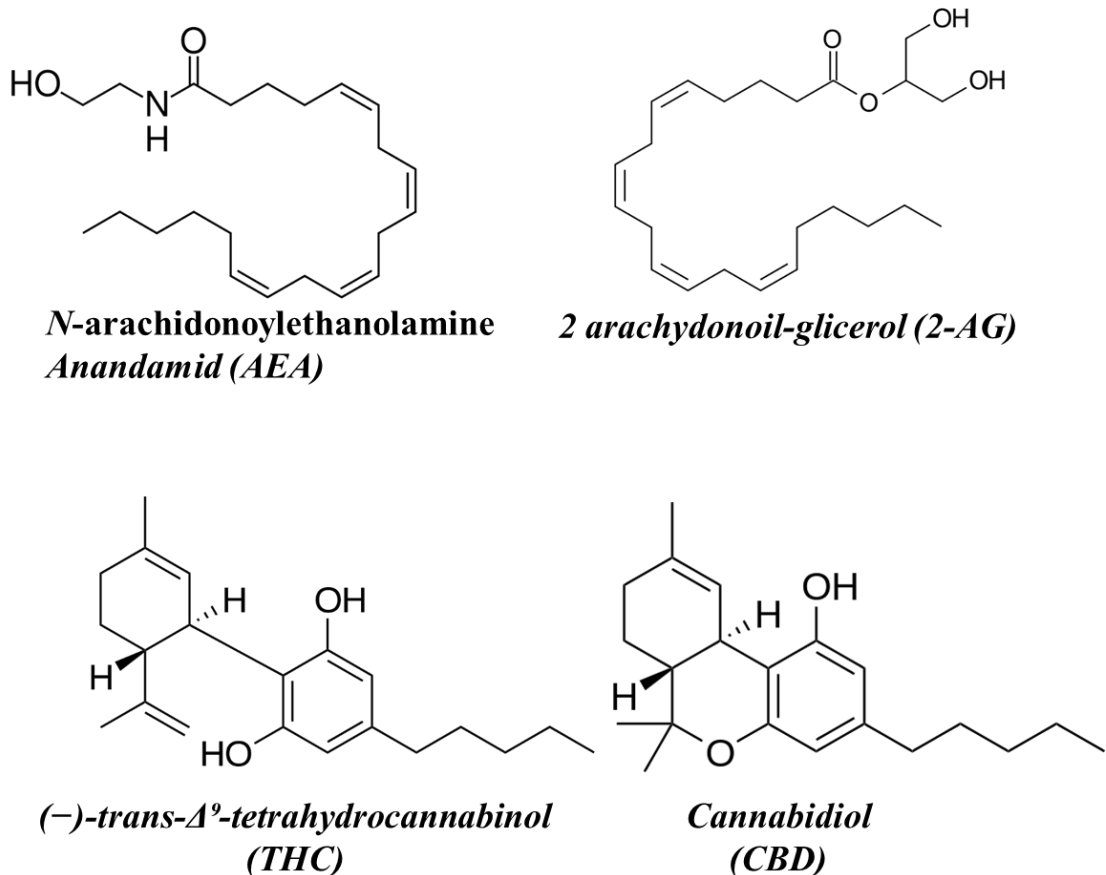
A bőrben az epidermisz mellett a szőrtüsző, faggyúmirigy termel eCB-kat (AEA, 2AG), de hatásait majd minden bőrben játszódo folyamatra kifejti. Részletesen a szövegben olvasható módon. A rövidítések a szöveg illetve a "Rövidítések" fejezetben találhatóak szerint. Bíró és munkatársai. (2009), valamint Maccarrone és munkatársaitai. (2015) alapján [111, 112].

intakt humán szőrtüszők nem rendelkeznek beidegzéssel és erekkel, amely az alkalmazott hatásokat módosíthatja. Ezt megerősíti kutatási eredmény, miszerint a kapszaicin egérben és alopeciás emberekben is fokozza az IGF-I szintet *in vivo* [116], amely az anagén fázis fenntartásában fontos. A TRPV3 is gátló hatást fejt ki az *ex vivo* szőrnövekedésre és katagén fázist

indukál [117]. Ezek alapján – amelyből legtöbb munkacsoportunk eredményein alapul – úgy gondoljuk, hogy a szőrtüsző hajciklusán egyfajta pro-katagén (TRP)-ECS-tónus érvényesül. Bőrben betöltött szerepének fontosságára utal, hogy a TRPV3 génjében bekövetkező funkciónyeréssel járó mutációt sikerült igazolni egy ritka, de igen súlyos genodermatózis, az Olmsted-szindróma hátterében [118]. Az ilyen betegekben a konstitutívan aktív TRPV3 funkció súlyos alopeciás bőrállapot kialakulásához vezet (amelyhez társuló egyéb bőrtünet az akár amputációhoz vezető súlyos tenyéri-talpi keratoderma, testnyílások körüli psoriasiform/ekcematiform plakkok). Izgalmas kérdés a bőrben kifejeződő termo-TRP csatornák funkciója és fiziológiás szerepe. A keratinocitákon lévő TRPV3 hőstimulusra reagálva ATP-felszabadulással válaszol, ami szenzoros idegvégződéseken lévő receptorához kötődik *in vitro* [119]. A TRPV3 működése fokozott az atópiás dermatitiszes betegek keratinocitáiban, és a viszketés kialakulásában is szerepet játszik [120]. Az epidermális keratinocitákban a TRPV3 aktivációja csökkenti az életképességet és gátolja a proliferációt *in vitro*, emellett gyulladáscitokinek szintézisét váltja ki [121]. Érdekesség, és a hőérzékenység fontosságát hangsúlyozza, hogy a gyapjas mamutok extrém hideghez való adaptációja a TRPV3 génjében bekövetkezett mutációnak és megváltozott hő-szenzitivitásnak köszönhetően alakult ki [122]. A TRPV3 funkcionálisan aktív a PSU szőrtüsző melletti másik tagján, a faggyúmirigysejteken is [123]. A kevésbé differenciált sebocitákon fejeződik ki magasabb szinten mind *in vitro*, mind *in vivo*, és gátolja a lipidszintézist, magas koncentrációjú agonista alkalmazása esetén apoptózist indukál, valamint fokozza gyulladáscitokinek szintézisét

3.2.4. A növényi eredetű kannabinoid vegyületek (fitokannabinoidok) és ezek lehetséges alkalmazása a bőrgyógyászatban

A *Cannabis sativa* növényt az emberiség évezredek óta használja; igaz, az erről szóló feljegyzések nem felelnek meg a mai tudományosság által támasztott követelményeknek. Ehhez képest



10. ábra

Az legfontosabb endokannabinoidok (eCB) és fitokannabinoidok (FK) kémiai szerkezete

A FK-k (THC és CBD, lent) és eCB-k (AEA és 2AG, fent) szerkezetileg egymáshoz nem feltétlenül hasonlítanak, de lipidtermészetük közös tulajdonság.

viszonylag későn, csak a XIX. században kezdték vizsgálni a hatásait tudományos alapossággal.

Az első növényi eredetű, vagyis fitokannabinoidokat (FK) az 1940-es években izolálták, míg a pszichés hatásokért felelős aktív hatóanyag, a (-)-*trans*- Δ^9 -tetrahydrocannabinolnak (THC) a szerkezetét (9. ábra) pedig 1964-ben sikerült azonosítani [109]. Mai ismereteink szerint a növényben azonosítható több ezer molekula közül kb. 120-150-et tekintünk FK-nak, ami képes hatást kifejteni az ECS-en keresztül [124]. Ezek döntően a THC és néhány egyéb és kevésbé fontos FK szintézise és degradációja során keletkeznek, vagy melléktermékek, illetve ide tartoznak mindezen molekulák izomerjei is. Ezek közül természetesen a pszichoaktív THC-ről vannak a legbővebbek ismereteink; ez felel a marihuána eredetű kábítószer hatásaiért (pl. eufória, tér-idő

érzékelés változása, fokozott étvágy, vazodilatáció). A központi idegrendszeri hatást közvetítő receptort, amelyet CB1-nek neveztek el, csak még később, 1988-ban fedezték fel.

Míg a THC alkalmazását limitálja fent említett pszichoaktív volta, addig több egyéb FK is ígéretesnek tűnik klinikai alkalmazásra. Ezek közül a kutatások középpontjában a (-)-cannabidiol (cannabidiol, CBD) áll (10. ábra), ami bőségesen fordul elő a növényben. Bár eleinte úgy tűnt, hogy a CBD minden pszichoaktív hatástól mentes, a máig összegyűlt tudományos eredmények alapján az álláspont némileg megváltozott. Az ismert, hogy jól tolerált molekula, klinikai vizsgálatokban 1280 mg/nap dózisban sem okozott mellékhatást, bár kevés betegen vizsgálták ilyen magas dózisban [125]. A farmakokinetikájára jellemző, hogy a féléletideje függ a fogyasztás módjától és gyakoriságától, egyénekenként változó egyszeri intravénás alkalmazás esetén 24 óra, krónikus orális alkalmazás esetén 2-5 nap között van [126]. Korábban úgy tűnt, hogy a CBD antagonist/inverz agonistaként viselkedik a CB1 receptorokon, és ezen is alapult az az elképzelés, hogy előnyös THC-val kombinációban alkalmazni. Olyan adatok is rendelkezésre állnak, miszerint a CBD nem is kötődik a CB receptorokhoz, illetve magasabb dózisban az eCB-ok hatását potenciózza az azokat lebontó enzim gátlása révén [127]. Bár még mindig nem támasztott alá egyértelműen, hogy miből fakadnak az eltérések; nincs egyetértés abban sem, hogy pontosan mi a CBD viszonya a CB-receptorokhoz, mára egyre inkább más receptorokhoz rendelik a CBD-re jellemző sokrétű farmakológiai hatásokat. A CBD célpontjai közé tartozik a glicin-receptor, a GPR18 és a GPR55 „árva receptorok”, a szerotonin-receptorok (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}), a nikotinos acetilkolin receptor (nAChR α -7), a μ - és δ -opioid receptorok, a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor- γ (PPAR γ), valamint számos ioncsatorna (TRPA1, TRPV1-4, TRPM8, valamint feszültség függő anion- és kalciumcsatornák) és sok enzim is [128].

Kezdetben az említett THC-val (kb. 1:1 arányú) kombinációban (Sativex[®]), majd önmagában alkalmazva neuropszichiátriai kórképekben kezdték kutatni hatásosságát, ami az egyedi receptor-

affinitás mintázat és az ehhez társuló biztonságosnak tűnő mellékhatásprofil miatt tűnt ígéretesnek. A Sativex® oronazális nyálkahártya-spray első indikációs köre a sclerosis multiplex tüneteinek (spazmus, fájdalom) csökkentése, amelyben effektívnek bizonyult [129]. Az eredeti elképzelés szerint a CBD kivédheti a THC nemkívánt mellékhatásait (pl. dependencia), azonban újabb, állatmodelleken alapuló kutatási eredmények szerint akár önmagában is hatásos lehet, és a hatását az adenosin receptor (A_{2A}) mediálja [130]. Intenzív kutatás folyik lehetséges alkalmazására terápia-rezisztens szkizofréniában [131, 132], valamint hatásosnak tűnik a gyermekkori, súlyos epilepsziában, Lennox-Gastaut- és Dravet-szindrómákban is, amelyek esetén már Európai Unió jóváhagyással is rendelkezik a szisztémás felhasználású, belsőleges CBD-tartalmú oldat (Epidiolex®) [133]. Ezek mellett a CBD-hoz általánosságban anti-inflammatórikus hatást társítunk, az elmúlt évek kiterjedt kutatási eredményei szerint [134]. Ezek alapján a CBD több – *in vitro* és állat – modellben képes volt csökkenteni az LPS által indukált gyulladási citokin termelést, valamint az effektor immunsejtek működését; így hatásos lehet gyulladási bőrbetegségekben, légzőrendszeri és idegrendszeri immun-betegségekben [134-136].

A CBD alkalmazása a bőrgyógyászatban szintén ígéretesnek tűnik, hiszen az ECS az ismertett módon nagyon magas szinten reprezentált a bőrben, fontos funkciókat lát el, illetve az ECS-től független CBD-célpontok is kifejeződnek itt. Ráadásul a helyi kezelés tovább szűkíti a lehetséges szisztémás mellékhatások megjelenésének lehetőségét. A helyi kezelés tervezésénél figyelembe kell venni, hogy a lipofil kannabinoidok változó módon, de képesek penetrálni a stratum corneumon, bár a CBD a THC-hoz képest kevésbé lipofil [137]. Emellett a formuláció nagymértékben befolyásolja az oldékonyságot és penetranciát. Az eddigi ellentmondásos *in vivo* eredményei alapján nem egyértelmű, hogy a helyileg alkalmazott CBD kezelés mellett transzdermális felszívódással és ezáltal távoli, szisztémás hatásokkal is kell-e számolni [137]. Az epidermális keratinocitákon az UVA és UVB okozta oxidatív stresszt képes a CBD kivédeni,

komplex hatása úgy nyilvánul meg, hogy miközben aktiválja az antioxidáns hatású enzimek kifejeződését serkentő „nukleáris faktor erythroid-2-szerű faktor 2” (NRF2)-t, gátolja az ezzel párhuzamosan pro-inflammatorikus hatású NF-kB-t [138]. A bőrgyógyászatban az ily módon citoprotektív, antioxidáns és anti-inflammatorikus hatású molekulák lehetséges alkalmazásának kutatását is nagy érdeklődés övezi [139]. A NRF2 indukció hátterében a BACH1 transzkripció faktor gátlását azonosították, és ugyanebben a tanulmányban (bár a direkt mechanizmus tisztázása nélkül) beszámolnak arról, hogy a CBD fokozza sebgyógyulásban is érintett keratinok (keratin 16 és 17) expresszióját egerek bőrében *in vivo* [140]. Ezekkel némileg összecseng a CBD fibroblasztokon kifejtett citoprotektív hatása, illetve, hogy az UVA/B sugárzás hatását a bőrben képes antioxidáns és anti-inflammatorikus irányba befolyásolni [141]. A CBD jelenleg helyi és belsőleg alkalmazása is elérhető, de helyi kezelésben nem az egészségügyi hatóságok által szabályozott módon [142]. Ennek ellenére a szakirodalomban is számoltak már be betegek által önkéntesen helyileg alkalmazott CBD-tartalmú externák hatásosságáról. Az epidermális barrier veleszületett zavarában, a bizonyos keratinok génjének mutációja miatt kialakuló fragilitással, sérülékenységgel járó epidermolysis bullosában (EB) szenvedő 3 beteg is pozitívan értékelte a CBD hatását, mindhárman gyorsabb sebgyógyulásról, kevesebb hólyag képződéséről számoltak be [143]. Bár az önértékelésen alapuló eredmények értékelését fenttartásokkal kell fogadni, az egyik beteg teljesen elhagyta a fájdalmai miatt addig szükséges (opioid) fájdalomcsillapítót, ami, ha nem is objektivizálja a hatásosságot, mégis jelzi a CBD klinikailag is megnyilvánuló előnyeit [143]. A CBD a sebgyógyulás késleltetésével összefüggésbe hozott mátrix metalloproteináz-9 (MMP9) gátlásával hozzájárulhat a fokozott sebgyógyuláshoz, amit *in vitro* eredmények igazolnak [135, 141]. Szisztémásan alkalmazott CBD és THC esettanulmányok alapján szintén hatásosnak tűnik az EB-s fájdalom és viszketés mérséklésében [144]. A CBD képes más típusú, azonban hasonlóan

működő epiteliális szövetek (bél, endotél) barrier funkcióját is javítani releváns klinikai károsodást imitáló kísérleti körülmények modellezése során [145, 146].

Az epidermális keratinociták mellett a bőrfüggelékek is potenciális CBD célpontok lehetnek. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a CBD csökkenti a kórosan fokozott faggyútermelést *in vitro* immortalizált humán faggyúmirigy (SZ95) sejtvonalon [107]. Ezen hatás hátterében TRPV4 és A_{2A}-receptor aktiváció állt, valamint ezáltal markáns anti-inflammatórikus hatás is társult hozzá. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a CBD hatásos lehet a kóros faggyútermeléssel járó gyakori állapotokban, pl. acne-ben [147]. Az acne-t célzó klinikai vizsgálat (NCT03573518) I. fázisa sikeresen lezajlott [148], jelenleg a II. fázis eredményeit övezi kiemelt figyelem. Mivel a faggyúmirigy a szőrtüszővel egy funkcionális és strukturális egységet alkot (pilosebáceus egység), érdemes vizsgálni a CBD izoláltan szőrtüszőre kifejtett hatásait is.

A faggyúmirigy eredetű sejtek mellett epidermális keratinociták tenyészetében is vizsgálták a CBD potenciális antiinflammatorikus hatását, amelyet más területeken már több esetben igazoltak. A mindennapi klinikumban gyakori allergiás kontakt dermatitisz *in vitro* modelljében, a TLR3 aktivátor polyinozin-polycitidyl sav [poly-(I:C)] kezelt keratinocitákban a CBD csökkentette a proinflammatorikus citokin-szekrúciót [136].

4. Célkitűzés

4.1. A TRPV4 funkcionális expressziójának vizsgálata szórtüszőn

Kifejeződik-e a TRPV4 a szórtüszőn, és ha igen, pontosan milyen kompartmenteken?

Milyen celluláris hatásokat vált ki a TRPV4 aktiváció az azt expresszáló sejteken?

Milyen hatása van a TRPV4 aktivációnak a hajciklusra?

4.2. A CBD hatásainak, illetve a hatást közvetítő receptorok vizsgálata szórtüszőn

Milyen hatást fejt ki a CBD alkalmazása a hajciklusra?

Milyen receptorok közvetítésével valósul meg a CBD hatása?

Megnyilvánul-e a CBD ismert gyulladásgátló hatása is a szórtüszőn?

5. Anyagok és módszerek

5.1. A kísérletek során a különböző kezelésekre felhasznált ágensek

A későbbiekben ismertetett sejt-, illetve szervkultúrákat vizsgálataink során a szakirodalom alapján megfelelően specifikus hatású receptor agonistákkal, illetve antagonistákkal kezeltük. A TRPV4 aktiválásához a szintetikus GSK1016790A-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., Amerikai Egyesült Államok) alkalmaztuk, amely a humán TRPV4 ioncsatorna specifikus agonistája [101]. A TRPV4 gátlására HC067047 (Tocris, Bristol, Egyesült Királyság) TRPV4-antagonistát használtunk. A CBD-t szintén a Tocris-tól szereztük be. A TLR3 receptor aktiválására a természetes kettős szálú (virális) RNS szintetikus megfelelőjét, a poly-(I:C)-t (Sigma-Aldrich) használtuk, míg az adenosin receptorok gátlására a mindegyik típusú adenosin receptort gátolni képes, „pán-antagonistaként” ismert CGS-15943-t (Tocris, Bristol, Egyesült Királyság) alkalmaztuk.

Ezeket a kezeléseket megfelelő oldószerben, a kísérletekhez szükséges koncentrációhoz képest 1000-szeres töménységben, a gyártó utasítása alapján $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on vagy $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, és csak a kísérleteket közvetlenül megelőzően hígítottuk a szükséges koncentrációra. Az oldószer a GSK1016790A, a HC067047 és a CGS15943 esetében dimetil-szulfoxid (DMSO) volt, a CBD-t etanolban, a poly-(I:C)-t szűrt desztillált vízben oldottuk. A kísérletek során az adott kezelőanyag oldószerének 1000-szeresére hígított, egyebekben megfelelő térfogatú és összetételű médiummal kezelt sejteket, illetve szervkultúrát használtunk.

5.2. A humán szőrtüsző szervkultúra

A sebészeti beavatkozások szükséges „melléktermékeként” kimetszett szőrtüszőket tartalmazó teljes vastagságú bőr (11. ábra) epidermiszének eltávolítása után lehetséges intakt, kötőszövetes-hüvelybe ágyazott, teljes szőrtüszőket nyerni a dermiszből. A mintákat a Helsinki kritériumoknak megfelelően, a helyi etikai bizottság jóváhagyásával (etikai engedélyszám: DE OEC RKEB/IKEB 3724-2012) nyertük egészséges bőrű emberek hajas fejbőrének halánték- vagy tarkórégiójából. A

preparáló mikroszkóp alatt végzett mintavétel és szőrtüsző-izolálás során csak morfológiailag anagén VI. fázisban lévő szőrtüszőket válogattunk a későbbi vizsgálatokra. A kísérleteink során a szőrtüszőket 24-lyukú tenyésztőlemezekben, speciális médiumban tartottuk 37 °C-on, 5% CO₂-parciális nyomásra szupplementált levegő-elegyben. A médium alapja William's E médium (Invitrogen, Paisley, Egyesült Királyság), amelyet kiegészítettünk 2 mL L-glutaminnal (Invitrogen), 10 ng/ml hidrokortizonnal, 10 mg/ml inzulinnal és antibiotikumokkal (mind a Sigma-Aldrich-től). Az elongációs kísérleteket az említett módon, a génexpresszió vizsgálatát 24 órás kezelés után végeztük el.

5.3. Primer humán ORSK-k izolálása és tenyésztése

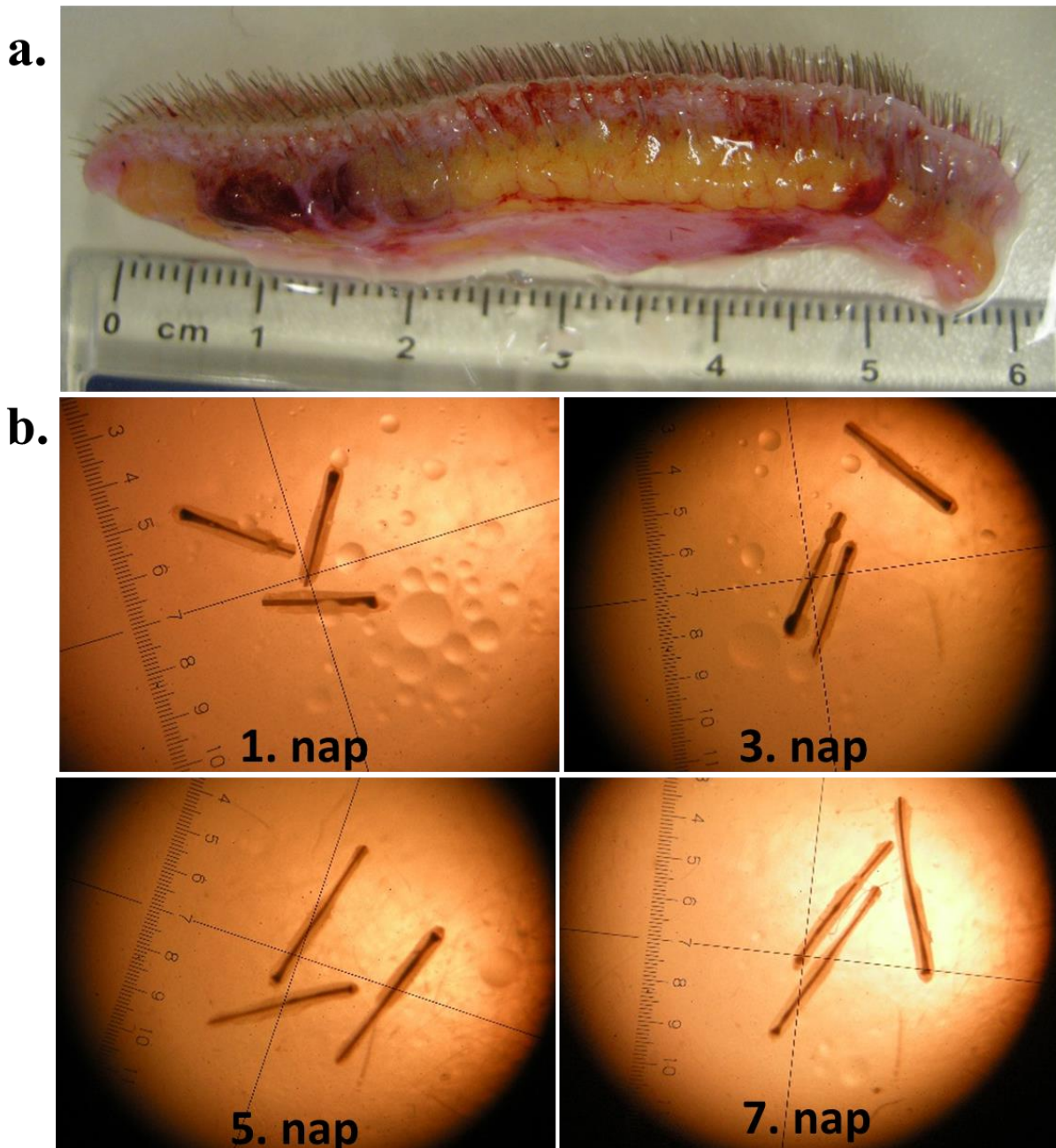
A sejtszintű folyamatok tanulmányozásához önkéntesek hajas fejbőréből fertőtlenítés után „egyszerű” epilációval eltávolított szőrszálakról leemésztett primer humán ORSK-kat tenyésztettünk [149]. Donoronként körülbelül 30 (nem intakt) szőrtüszőt három egymást követő alkalommal mostunk steril foszfát-pufferelt sóoldatban (PBS), melynek összetétele 115 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄ (mind a Sigma-Aldrich-től). Ezután a sejteket tartalmazó szőrtüszőket egy órán át 0,1% tripszin-0,2% etilén-diamin-tetra-acetát (EDTA, mindkettő Invitrogen) tartalmú emésztőoldatban inkuábáltuk 37 °C-on. Az emésztőoldatot 10 (V/V)% embrionális borjúsérumot (FBS, Sigma-Aldrich) tartalmazó oldattal inaktiváltuk, majd a sejtsuszpenziót többször trituráltuk, végül 1000 fordulat/perc fordulatszámra centrifugáltuk 10 percig. Az így nyert ORSK-kat ezután – irodalmi és saját laboratóriumunk tapasztalatai alapján ismert, az ORSK-k növekedésére kifejtett előnyös, támogató hatása miatt - osztódásában gátolt humán dermális fibroblaszt (HDF) tápláló sejtrétegre szélesztettük [150]. A HDF sejteket az ORSK-k szélesztése előtt 0,4 µg/ml mitomycin-C (Sigma-Aldrich) oldattal egy éjszakán át előkezeltük, és Petri-csészénként 20,000 sejtszámban szélesztettük. A HDF sejtszám a későbbiek során már nem növekedett, szemben a mitomycin kezelést követően a kokultúrába került ORSK-kal. A tenyésztés

során tenyésztőoldatként Ham's F12 és Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM, mindkettő Invitrogen) 1:3 arányú keverékét használtuk, illetve ezt az elegyet továbbá 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 gentamycin (Invitrogen) hozzáadásával egészítettük ki. A tenyésztést 37°C-on, 5% CO₂ parciális nyomásra szupplementált, párasított légtérben végeztük. A tenyésztőmédiomot kétnaponta cseréltük, és a sejteket mikroszkópos ellenőrzések során megítélt 70-80%-os konfluencia elérése esetén passzáltuk.

5.4. A TRPV4 ioncsatorna immunfluoreszcens jelölése humán szórtüszőn és primer humán ORSK tenyészetén

A TRPV4 fehérje kimutatása érdekében fluoreszcens immun-jelölést végeztünk anagén VI fázisú szórtüszőkön és ORSK-kon. Előzetesen mikroszkópos analízissel anagén VI. fázisban lévő szórtüszőket „optimal cutting temperature” (OCT)-médiumba ágyazva folyékony nitrogénbe mártva lefagyasztottunk, majd kriosztáttal 6 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Az így kapott szórtüsző-metszeteket vagy fedőlemezen tenyésztett acetonnal fixált ORSK-kat háromszori PBS-es öblítés után elsőként az 1:100 hígítású, nyúlban termelt TRPV4-ellenes primer antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át (Alomone, Jerusalem, Izrael), ezután ismét háromszori PBS-es mosás után Alexa Fluor 488 fluoreszcens festékkel konjugált másodlagos, nyúl antitest Fc-fragment-ellenes antitesttel (Invitrogen) inkubáltuk. A sejtmagok jelölése céljából újbóli háromszori PBS-öblítés után 40-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) festéket tartalmazó Vectashield fedőmédiummal fedtük (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Amerikai Egyesült Államok). Az így kapott fluoreszcens-jelölt metszetekről felvételeket készítettünk Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon, Tokyo, Japán) a megfelelő hullámhosszok alkalmazása mellett (Alexa

Fluor esetén 488/519 nm, DAPI esetén 360/460 nm excitációs/emissziós hullámhossz). Negatív kontrollként primer antitest kihagyásával, de minden egyéb szempontból a leírttal megegyező



11. ábra

A humán mikrodiszektált szőrtüsző szervkultúra

A kísérleteinkhez szolgáló szőrtüszők forrása a.) teljes vastagságú bőrszelvény, amelynek jól látszanak ismert rétegei, és az epidermisz eltávolítása után kiemelhetők az egyedi szőrtüszők. b.) Ezek közül egy napos inkubáció után az anagén VI fázisúakat vizsgáljuk tovább, az ábrákon ugyanazon 3 szőrtüsző fényképei láthatóak, a szervkultúra 6 napja alatt látható a szőrszál növekedése.

protokollal jelölt metszeteket vagy fedőlemezeket használtunk.

5.5. A szőrtüsző elongáció vizsgálata

A teljes szőrtüszők megfelelő médiumban képesek akár egy hétig megőrizni legfontosabb funkciójukat, a szőrszál képzését [18]. Ezek során az úgynevezett elongációs kísérletek során 24-lyukú kezelő lemezen fent részletezett módon tenyésztett szőrtüszőkön kétnaponta cseréltünk médiumot, és ekkor fénymikroszkóppal fotodokumentáltuk a tenyészeteket (11.b ábra), és a mikroszkóp okulárjában lévő skálát használva utólag lemértük a szőrtüszők hosszát. A mért értékeket a 1. napi (kezdeti) hossza normalizálva az adott kezelési csoportok átlagos szőrszál/szőrtüsző-hossz növekedése kifejezhető, így a donoron belüli, különböző kezelési csoportok, illetve a kontroll csoport egymással összehasonlítható. A TRPV4 agonistával és antagonistával, illetve CBD-vel végzett kezeléseket minden nap elvégeztük. Az eredményeket a kezdeti hosszhoz viszonyított átlagnövekedés (\pm SEM) formában ábrázoltuk az idő függvényében.

5.6. Hajciklus hisztomorfometriai analízise szőrtüszők gyorsfagyasztott metszetein

Az elongációs kísérletek végére a hat napig kezelt, kezdetben anagén VI szőrtüszők bizonyos hányada a hajciklus más fázisára jellemző strukturális változásokon megy keresztül, és ezeket a változásokat rutin szövettani festés után mikroszkópos vizsgálat során analizálni lehet. Ezek mintázata alapján klasszifikálhatjuk a szőrtüszőket anagén, korai vagy kései katagén (és telogén) fázisokba. Ezáltal a kezelőanyag hajciklusra gyakorolt hatását tudjuk vizsgálni *ex vivo* körülmények között. Az azonos kezelési csoportba tartozó, különböző fázisú szőrtüszők aránya összevethető. Erre csak azok a hosszirányú metszetek alkalmasak, amelyek a szőrtüsző minden kompartmentjét és rétegét tartalmazzák. Ilyen metszetek előállítására érdekében a cryosztátos metszések során folyamatos mikroszkópos ellenőrzéssel olyan metszeteket választottunk a későbbi analízisre, amelyek a metszés módjának köszönhetően megfelelően vizsgálhatók. A metszeteket desztillált vizes öblítés után hematoxillinban inkubáltuk 10 percre, majd 15 perces mosást követően

1 percen keresztül 0,1%-os alkoholos eozin oldatba merítettük, majd felszálló alkohollal dehidráltuk a metszeteinket és végül Eukitt médiummal (mind Sigma-Aldrich) történt a fedésük. A szakirodalom alapján jól ismerjük a különböző fázisú szőrtüszők strukturális és egyéb jellegzetességeit, amelyek alapján elkülönítettük a rutin szőrtüsző-metszeteket hajciklus-fázis alapján [17, 151]. Ez főként az anagén VI. és a korai katagén fázisok esetén lehet kihívás, az ennek segítségével alkalmazott hisztomorfometriai kritériumokat a 1. táblázatban foglaltuk össze, az 15. ábrán pedig be is mutatunk néhányat.

	anagén VI	korai katagén	késői katagén
DP alak	hagyma, gazdag extracelluláris mátrixban	kondenzált, mandula alakú	kondenzált, kerek
MK	vaskos és körülveszi a DP-t	2-3 sejtsor vastag, megnyúlt	eltűnik
MK melanin tartalom	magas	alacsonyabb	alacsonyabb
MK proliferáció/apoptózis	csak proliferáció	sok apoptózis, csökkenő proliferáció	még több apoptózis, nincs/alig van proliferáció
DP nyél	nincs, laza sejthalmaz	kondenzáltabb sejtcsoport	van
szőrszál	jól pigmentált	"korai bunkó" morfológia	"bunkó" morfológia
proximális hajmátrix	zártabb	nyitottabb	nincs

1. táblázat

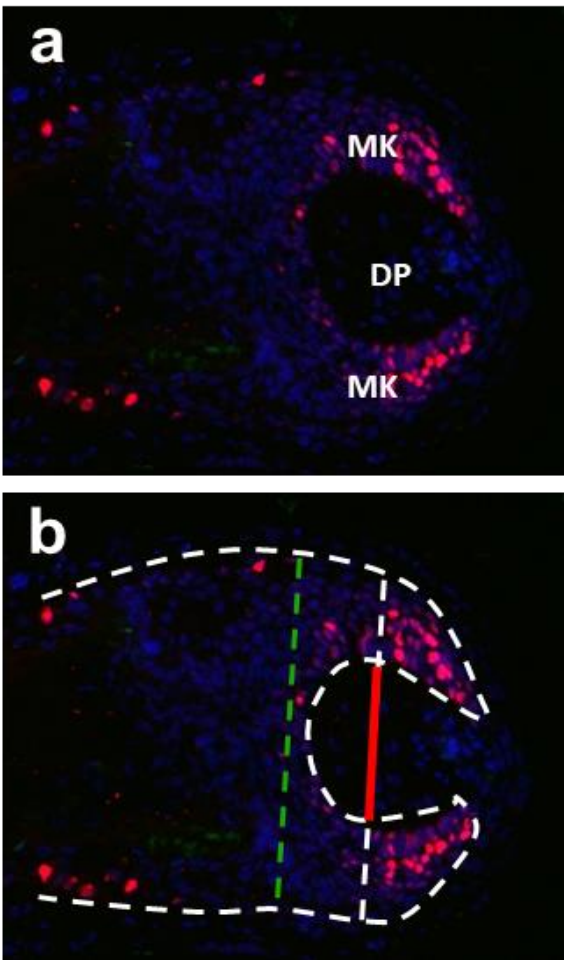
A hajciklus különböző fázisaiban lévő szőrtüszők klasszifikációja

A szőrtüszők különböző kompartmentjei a hajciklus közben (a Bevezetésben ismertetett módon) a fázisra jellemző módon változnak, változik a DP alakja, a MK sejtfolymatai, új struktúrák jelennek meg (DP nyél) és a szőrszál vége is „bunkó” alakú lesz. Részletes leírását lásd a szövegben.

5.7. A szőrtüszők mátrix keratinocitáinak proliferáció/apoptózis-vizsgálata - Ki-67/TUNEL kettős jelölés

A hajciklusanalízist és az elongációra gyakorolt hatást jól kiegészíti a szőrtüszők mátrixát felépítő keratinociták proliferációjának, illetve apoptotikus folyamatainak vizsgálata. Főként a korai katagén szőrtüszőket segít elkülöníteni az anagén szőrtüszőktől, hiszen hasonlóak morfológiailag,

de a celluláris folyamatok már ellentétes irányba változnak, az MK régióban az anagénre jellemző intenzív proliferáció helyett a sejtek apoptotizálnak.



12. ábra

A mátrix keratinociták (MK) apoptózis és proliferáció-vizsgálata során használatos referencia-régiók

a.) A fenti panelen látható a Ki-67 (vörös immunoreaktivitás, IR) és TUNEL (zöld IR) kettős-immunjelölés alkalmazásával, valamint DAPI magfestéssel jelölt szőrtüsző. A vörös vonal az alsó, b.) ábrán az úgynevezett Auber-vonal, a DP legszélesebb kiterjedése. A proliferáció során a MK Auber-vonal meghosszabbítása (szaggatott, egyenes, fehér vonal), illetve attól a szőrtüsző proximális része felé eső (két) régióban lévő proliferáló, vörös festődő sejteket számoltuk. A zöld szaggatott vonal a DP disztális végétől két (DAPI+) sejt vastagságú réteg, az apoptózis elemzése során az attól proximálisan (az ábrán jobbra) elhelyezkedő zölden festődő sejteket vettük figyelembe. Mindkét esetben az adott régióban lévő összes (DAPI+) sejtre normalizáltuk a pozitív sejteket.

A proliferáció és apoptózis vizsgálatára a Ki-67/TUNEL kettős-immunjelölést alkalmaztuk. Ennek során fagyasztva-metszett (6 μ m) szőrtüszők 10 percig szabad levegőn szárítása után ismét 10 percig inkubáltuk 1% paraformaldehidet (PFA) tartalmazó PBS oldatban (mind a Sigma-Aldrichtól) szobahőmérsékleten. A mintákat ezután rehidráltuk PBS-tal 5 percig (2x), majd előhűtött ethanol-acetát (2:1) oldatban -20°C hőmérsékleten fixáltuk, majd ismét 5 percig PBS-ban mostuk újra (3x). Ezután az apoptotikus sejtek TUNEL-assay-vel való kimutatásához a metszeteket a terminális deoxinukleotidil transzferáz (TdT)-enzimet és digoxigenin-deoxy-UTP-t tartalmazó reagens (ApopTag Fluorescein *in situ* Apoptosis Detection Kit, Merck Millipore)

oldatban egy órán keresztül inkubáltuk 37°C-on. A proliferáló sejteket egérben termelt anti-humán Ki-67 (DAKO, Carpinteria, CA, Amerikai Egyesült Államok) primer antitesttel jelöltük, amellyel egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk, majd kecskében termelt anti-egér másodlagos antitesttel (Alexa Fluor 568 IgG, Invitrogen) újabb 45 percig szobahőmérsékleten. A TUNEL+ sejteket FITC-konjugált antidigoxigenin antitesttel jelöltük (ApopTag Kit). Ezután a metszetek PBS-es mosása után DAPI-magfestést (1 µg/ml) végeztünk (Sigma-Aldrich) és fedtük a metszeteket Fluoromont G fedőmédiummal (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, Amerikai Egyesült Államok). Az elkészült, fluoreszcens-jelölt metszeteket Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Nikon). Az alkalmazott excitációs és emissziós hullámhossz a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat és felvételkészítés során 495/519 nm volt a TUNEL, míg 579/603 nm volt Ki-67 esetén, DAPI esetén pedig 360/460 nm. A felvételeket Image J alkalmazással analizáltuk, és a 12. ábrán látható referencia-régióknak megfelelő területeken lévő apoptotikus (TUNEL pozitív) sejteket, valamint a proliferáló (Ki-67 pozitív) sejteket az összes adott referencia-régióban lévő (DAPI pozitív) sejtszám arányában adtuk meg százalékos formában (+/-SEM).

5.8. Valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

A teljes RNS-t TRIzol (Invitrogen) felhasználásával 0 °C hőmérséklet felett (jégen) izoláltuk, a gyártó protokolljának megfelelően, az esetleges (genomi) DNS-szennyeződés csökkentése céljából DNáz kezelést végeztünk. Az RNS minőségének és mennyiségének ellenőrzésére Nanodrop 1000 spektrofotométert használtunk (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Ezután a teljes RNS 1 µg-jához a reverz transzkripció során 15 IU AMV reverz transzkriptázt, 1 IU rekombináns RNasin ribonukleáz inhibitor és 0,025 µg/µl random primert (mind Promega, Madison, WI, USA) felhasználva cDNS-t állítottunk elő. A PCR amplifikációs reakciót TaqMan primerekkel és próbákkal végeztük (TRPV4 assay ID: Hs00222101_m1; IL-1α: Hs00174092_m1; IL-6:

Hs00985639_m1; IL-8: α Hs00174103_m1, TNF- α Hs00174128_m1), a kész TaqMan univerzális PCR „master mix” elegy felhasználásával, minden reakciót triplikátumként, vagyis 3 technikai ismétléssel. A qRT-PCR vizsgálatok során 50 alatt során a standard hőprotokollt alkalmaztuk. A qRT-PCR vizsgálatokhoz Stratagene MXP3005p (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Amerikai Egyesült Államok) rendszert használtunk, amely során meghatároztuk az átlagos küszöb-ciklust (Ct, cycle-threshold), vagyis a releváns expressziót jelző fluoreszcencia intenzitás eléréséhez szükséges ciklus számot. Belső kontroll génként gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH assay ID: Hs99999905_m1) használtuk. A TRPV4 expressziót a Ct érték belső kontrollra normalizált formában, a Δ Ct módszer felhasználásával adtuk meg átlag \pm SEM formában. Amikor különböző kezelési csoportba tartozó mintákból származó mRNS expressziós változását vizsgáltuk a kezelés hatására, a relatív expressziókat (Δ CT) a kontrol kezelési csoport relatív expressziós értékére normalizálva adtuk meg ($\Delta\Delta$ CT módszer), átlag \pm SD formában.

5.9. Fluoreszcens Ca^{2+} -mérés

A TRPV4 Ca^{2+} -permeábilis kationcsatorna, ezért működését, hőstimulussal való aktiválhatóságát, valamint a CBD hatására bekövetkező intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változás nyomon követéséhez fluoreszcens Ca^{2+} -mérést végeztünk. Ehhez Fluo-4 AM (Invitrogen) fluoreszcens Ca^{2+} -indikátort használtunk. A Fluo-4 az élő sejtekbe bejut, majd a sejten belüli észterázok a molekulához konjugált acetoxi-metilészter (AM) csoportot levágják, és a Fluo-4 festék a sejten belül marad. A Fluo-4 fluoreszcencia intenzitása jelentősen megnő, ha Ca^{2+} kötődik hozzá, vagyis korrelál a sejten belüli Ca^{2+} -koncentráció változásával.

5.9.1. Mikrofluorimetriás intracelluláris Ca^{2+} -mérés

A fluoreszcens Ca^{2+} -méréseket „Hank oldatban” végeztük (136,75 mM NaCl, 5,56 mM glükóz, 5,36 mM KCl, 4,17 mM NaHCO_3 , 1,26 mM CaCl_2 , 0,34 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,44 mM KH_2PO_4 , 0,81 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mM HEPES [Sigma-Aldrich]; pH 7,2), melyet BSA-val (Sigma-

Aldrich; végkoncentráció: 1 g/100 ml) egészítettünk ki. A nem-specifikus aniontranszporterek általi Fluo-4 „szivárgás” (és az így jelentkező fals fluoreszcencia intenzitás csökkenés) elkerülésére probenecidet ([Invitrogen]; végkoncentráció: 2,5 mM) alkalmaztunk.

Kísérleteink során az ORSK-kat 96 lyukú („black well/clear bottom”) tenyésztőlemezekre (Greiner Bio-One) szélesztettük 20000 sejt/lyuk denzitásban. A Ca^{2+} -mérés során a felülúszó eltávolítása után egyszer mostuk a sejteket 100 μ l/lyuk Hank oldattal. Ezt követően 1 μ M Fluo-4 AM-et tartalmazó Hank oldattal (100 μ l/lyuk) kezeltük az ORS keratinocitákat (1 óra, 37 °C), majd újabb három Hank oldatos öblítés következett (100 μ l/lyuk). A sejtekre 100 μ l/lyuk Hank oldatot mértünk, és újabb 30 percig inkubáltuk őket 37 °C-on, ami alatt előkészítettük a vizsgálni kívánt agonisták esetén az alkalmazandó végkoncentrációkhoz képest háromszoros töménységű kezelőoldatokat tartalmazó lemezt, amelyről a későbbiekben a fluoreszcens mérés során a készülék a kezeléseket az előre programozott protokoll szerint automatikusan elvégezte. Ha antagonistát is alkalmaztunk, az mind a mérés kezdetétől a sejteken lévő, mind a kezelőoldatokat tartalmazó lemezen lévő oldatokban jelen volt. Ezt követően FlexStation III spektrofluoriméter (Molecular Devices) segítségével sorozatmérést végeztünk „Flex” módban (excitáció: 490 nm; emisszió: 520 nm). Ennek során 400 másodpercen keresztül rögzítettük az egyes lyukakban detektálható fluoreszcencia intenzitást. A mérések harmincötödik másodpercében a készülék az előre programozott protokoll szerint 50 μ l kezelőoldatot mért a sejtekre, így kezdetben, a mérés elején (a kezelés előtti ideig) egy 35 másodperces alapjelet rögzíthettünk. Ennek az átlagértékét a kiértékelés során minden esetben kivontuk a mért értékekből, ezzel azonos alapvonalra „normalizálva” a különböző kezeléseket. Minden kezelést 4-6 ismétléssel végeztünk, a relatív fluoreszcencia intenzitást a 35 másodperces alapvonalra normalizálva ábrázoltuk.

5.9.2. Hőstimulussal kiváltott Ca^{2+} -beáramlás mérése

A TRPV4 ioncsatorna hővel való aktiválhatóságát, illetve az ORSK-k hőstimulusra adott Ca^{2+} -beáramlását hasonlóan vizsgáltuk, mint az előzőekben ismertettük, azonban nem kezeltük a mérés közben a sejteket, hanem a hőmérsékletet változtattuk. Ezekhez a speciális módszerekhez a Fluo-4-AM festéket az egyébként RTq-PCR-nál használatos és ott ismertetett Stratagene MXP3005p (Agilent Technologies) detekciós rendszert használtuk. Az ORSK-kat még 35 mm-átmérőjű Petri-csészékben kezeltük a Fluo-4 AM-et tartalmazó Hank oldattal 30 percig 37 °C-on, majd tripszines emésztés és számolás után 96-lyukú, az egyébként a PCR-kísérletek (és nem sejt-alapú assay-k) során használatos reakció-lemezre szélesztettük viszonylag nagy, 100000/lyuk denzitásban. Bizonyos lyukakban lévő sejtekhez TRPV4 antagonistá HC067047-et adtunk 10 μM koncentrációban. Ezután a fluoreszcencia intenzitást mértük a Stratagene készülék FAM-szűrőjével, amely gerjesztési és emissziós hullámhossza (494 és 516 nm) közel van a Fluo-4-hez ajánlott (490 és 520 nm) hullámhosszakhoz, így alkalmas a Fluo-4 fluoreszcencia intenzitás változásának mérésére is. Természetesen a hőmérséklet hatására a Fluo-4 Ca^{2+} -affinitása is változik, ezért bizonyos lyukakban sejtek nem, csak a 2 μM Fluo4-AM festéket tartalmazó Hank oldat volt, amelyet festék-kontrollként használtunk, és minden mérési eredményünkből kivontuk, így az ebből fakadó háttérváltozást kiküszöböltük. A Stratagene készülékkel az előre programozott hő-protokoll szerint változtatva rögzítettük a sejtek Ca^{2+} -koncentráció-változás hatására bekövetkezett fluoreszcencia intenzitás változását, kezdetben 25 °C-on inkubálva a sejteket 2 percig, majd a hőmérsékletet 31 °C-ra emeltük a mérések végéig (25,5 percig). A mérések során rögzített intenzitásokat a háttér fluoreszcencia változással csökkentve ábrázoltuk kezelési csoportonként (átlag \pm SEM formában). A hőérzékeny TRP csatornák ilyen módon való vizsgálatát korábban néhány munkacsoport végezte a világon [152, 153], az ő leírásaik alapján, részben módosítva állítottuk be laborunkban az erre alkalmas kísérleti elrendezést.

5.10. Sejtproliferáció vizsgálata – CyQUANT-assay

A sejtproliferáció vizsgálatát genomi DNS mérésén alapuló CyQUANT sejt-proliferációs assay kit (Life Technologies) felhasználásával végeztük. ORSK-kat 5000/lyuk denzitásban 96-lyukú (“black well/clear bottom”, Greiner Bio-One) lemezekre szélesztettük és 8-szori technikai ismétléssel végeztük, vagyis egy kezelési csoportba 8 lyukban tenyésztett sejtek kerültek. A kezelt sejtek felülűszóinak eltávolítása után a tenyésztőlemezeket $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletűre fagyasztottuk. A lemezeket a mérés előtt szobahőmérsékleten hagytuk kiolvadni és lyukanként $200\text{ }\mu\text{l}$ CyQUANT festék és lízispuffer-eleggyel kezeltük. Öt perces inkubáció után a fluoreszcencia intenzitást 490 nm és 520 nm excitációs/emissziós hullámhosszak alkalmazásával lemértük FlexStation II384 microplate reader (Molecular Devices) segítségével. A relatív fluoreszcencia intenzitás kezelési csoportonkénti átlag (\pm SEM) értékeket a napi kontroll százalékos hányadában adtuk meg.

5.11. Életképesség vizsgálata – MTT-assay

Az életképesség vizsgálatához MTT-assay-t (Sigma-Aldrich) végeztünk, amelynek alapja a tetrazólium só enzimatisz átalakítása. A tetrazólium sót csak az élő sejtekben lévő mitokondriumok képesek formazán kristályokká alakítani, így az élő sejtek számával arányos a reakció mértéke. Az ORSK-kat $10\ 000$ /lyuk denzitásban 96-lyukú (“black well/clear bottom”, Greiner Bio-One) lemezekre szélesztettük, és 8-szori technikai ismétléssel végeztük, majd a TRPV4 aktivátorral vagy CBD-vel kezeltük, vagy csak oldószereikkel. Ezután a sejteket $0,5\text{ mg/ml}$ MTT reagenssel inkubáltuk 3 óráig $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd a formazán kristályok szolubilizálása után koncentrációjukat kolorimetriás úton meghatározva becsülhettük az élő sejtek mennyiségét, amely a kolorimetriás intenzitással korrelált. A mérést 565 nm -es abszorbancia spektrumon, FlexStation III microplate reader (Molecular Devices) segítségével végeztük el. A kezelési csoportonkénti átlagos relatív abszorbancia-intenzitás értékeket (átlag \pm SEM formában) az adott napi kontrollok százalékos hányadában adtuk meg.

5.12. Apoptózis vizsgálata – DilC-assay

A csökkenő mitokondriális potenciál az apoptózis egyik legkorábbi markere, ezért ezt az ORSK-k tenyésztésén a MitoProbe™ DilC1(5) Assay Kit (Life Technologies Hungary Ltd.) felhasználásával vizsgáltuk. Az ORSK-kat 10 000/lyuk denzitásban 96-lyukú (“black well/clear bottom”, Greiner Bio-One) lemezekre szélesztettük, és 8-szori technikai ismétléssel végeztük, majd a TRPV4 aktivátorral vagy CBD-vel kezeltük, vagy csak oldószereikkel. A felülűszók leszívása után a sejteket 30 percig 1,1',3,3',3'-hexamethylindodicarbo-cyanine-jodid (DilC1(5)) festéket tartalmazó munka-oldattal (50 µl/lyuk) inkubáltuk, majd PBS-sel öblítettük, és a sejteket saját tápoldatukkal inkubáltuk. Ezután a 30 perces inkubáció után a fluoreszcencia intenzitást 630 nm és 670 nm excitációs/emissziós hullámhosszak alkalmazásával lemértük FlexStation II384 microplate reader (Molecular Devices) segítségével. A relatív fluoreszcencia intenzitás kezelési csoportonkénti átlag (+/-SEM) értékeket a napi kontroll százalékos hányadában adtuk meg.

5.13. Nekrózis vizsgálata – SYTOX-assay

Az esetlegesen megjelenő nekrotikus folyamat vizsgálatára SYTOX Green fluoreszcens jelölést (Life Technologies Hungary KFT.) alkalmaztunk, amely képes a nekrotikus sejtek sérült membránján penetrálni, majd intracellulárisan genomi DNS-hez kötődni, míg egészséges sejtek membránján nem, így azok SYTOX Green intenzitása elhanyagolható. Az ORSK-kat 10000/lyuk denzitásban 96-lyukú (“black well/clear bottom”, Greiner Bio-One) lemezeken szélesztettük és 8-szori technikai ismétléssel végeztük, majd a TRPV4 aktivátorral vagy CBD-vel kezeltük, oldószer kontroll mellett. A felülűszók leszívása után a sejteket 30 percig 1 µM SYTOX Green festéket tartalmazó munka-oldattal (50 µl/lyuk) inkubáltuk, majd PBS-sel öblítettük, és a sejteket saját tápoldatukkal inkubáltuk. Ezután a 30 perces inkubáció után a fluoreszcencia intenzitást 490 nm és 520 nm excitációs/emissziós hullámhosszak alkalmazásával lemértük FlexStation II384

microplate reader (Molecular Devices) használatával. A relatív fluoreszcencia intenzitás kezelési csoportonkénti átlag (\pm SEM) értékeket a napi kontroll százalékos hányadában adtuk meg.

A Dilc1(5) és SYTOX Green festékeket együtt alkalmaztuk, hiszen a két folyamatot egyszerre kívántuk vizsgálni, és a két festék fluoreszcencia intenzitásának mérése során alkalmazott excitációs és emissziós fény hullámhossza elég távol esik egymástól, hogy a két mérés ne interferáljon egymással.

5.14. Statisztikai analízis

A kísérletek során nyert adatsorokat statisztikailag IBM SPSS Statistics 22.0 (SPSS Inc., Armonk, NY, Amerikai Egyesült Államok) és Origin Pro Plus 6 (Microcal, Northampton, MA, USA) szoftverekkel analizáltuk. Amikor megfeleltek adatsoraink, χ^2 -tesztet, majd Fisher-egzakt tesztet, vagy Student-féle kétmintás T-próbát, vagy egyutas ANOVA-t követő Bonferroni *post hoc* tesztet alkalmaztunk, és a $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikáns különbségnek.

5.15. A kísérletes munka kivitelezése

A projekt és kísérletek tervezését Prof. Dr. Bíró Tamás vezetésével, Dr. Oláh Attila és Dr. Szöllősi Attila segítségével végeztem. A humán szőrtüsző szervkultúra izolálását és fenntartását, a primer humán ORSK-k izolálását és tenyésztését döntően Hollósi Erikával együtt végeztük. A TRPV4 ioncsatorna immunfluoreszcens jelölését humán szőrtüszőn és primer humán ORSK tenyészetben, a szőrtüsző elongáció vizsgálatát, a hajciklus hisztomorfometriai analízisét szőrtüszők gyorsfagyasztott metszetein egyedül végeztem. A szőrtüszők mátrix keratinocitáinak proliferáció/apoptózis-vizsgálatát (Ki-67/TUNEL kettős jelölés) dr. Lisztes Erikával és dr. Béke Gabriellával végeztem. A valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) és fluoreszcens Ca^{2+} -mérést, a sejtproliferáció (CyQUANT-assay), életképesség (MTT-assay), apoptózis (DilC-assay) és nekrozis (SYTOX-assay) vizsgálatát egyedül végeztem. Az eredmények kiértékelését és statisztikai elemzését Dr. Oláh Attila segítségével végeztem.

6. Eredmények

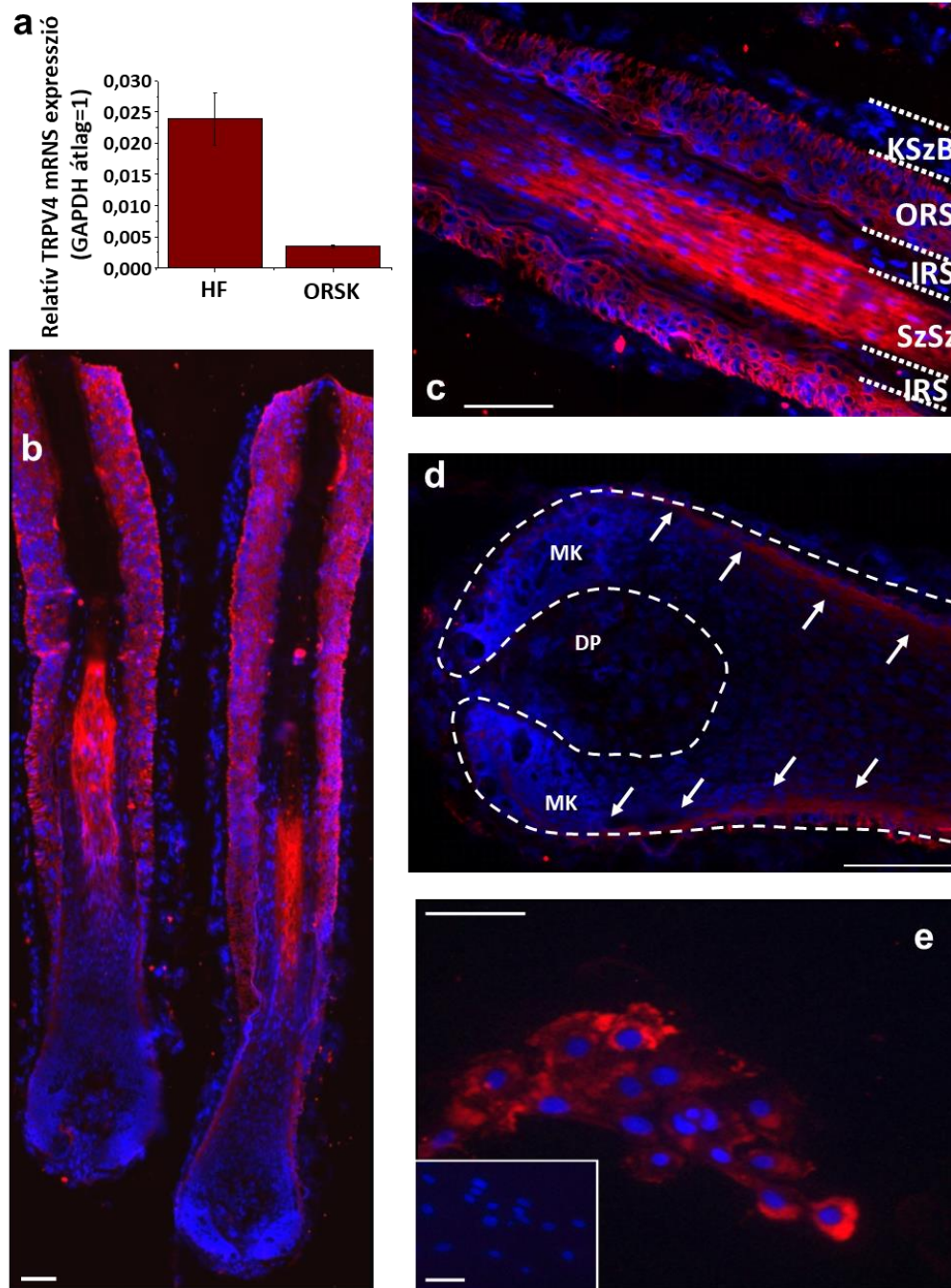
6.1. A TRPV4 funkcionális vizsgálata szőrtüszőn

6.1.1. A TRPV4 ioncsatorna kifejeződése és eloszlása a szőrtüsző kompartmentjeiben

A TRPV4 mRNS szinten kimutatható volt mind humán szőrtüszőkből, mind humán ORSK-k primer tenyészetéből (13.a ábra). Ezek alapján azonban még nem volt ismert a TRPV4 pontos kifejeződése, ezért ezt követően fehérje szinten is vizsgáltuk az expressziót. Amint az immunfluoreszcens jelölésen látható (piros immunreaktivitás), a TRPV4 jelenlétét fehérje szinten is igazoltuk a szőrtüszőn (13.b-d ábra). Emellett az is látható, hogy az epiteliális kompartmentekben volt jelen jelentősebb mennyiségben, főleg a ORS-rétegben (13.b-c ábra), illetve kisebb mértékben a belső gyökérhüvelyben (IRS, 13.c ábra). A szőrtüsző bulbusának nagyobb felbontású felvételein látszik, hogy sem az intenzíven proliferáló mátrix régióban sem volt látványos TRPV4 expresszió, sem a szőrtüsző biológiai folyamatait „karmesterként szabályzó” DP fibroblasztjaiban (13.c ábra). A mátrix régióban azok a rétegek mutattak TRPV4 pozitív immunreaktivitást, amelyek a külső gyökérhüvellyel folyamatosak, és tulajdonképpen az azt felépítő ORSK-k elődeinek tekinthetőek (13.c ábra, nyilak). A szőrszál pozitív festődése adódhat a szál ismert autofluoreszcenciájából [154]. A kötőszöveti burokban (KSzB) elvétve volt detektálható pozitivitás. Az intakt humán szőrtüsző mellett vizsgáltuk a primer ORSK sejtkultúrát; ezek a sejtek *in vitro* tenyésztés alatt is expresszálták a TRPV4 fehérjét (13.e. ábra).

6.1.2. A TRPV4 aktiváció gátolta az *ex vivo* szőrnövekedést

Ahogy a 14.a ábrán látható, a TRPV4 kémiai aktivációja egy szintetikus, specifikus liganddal, a GSK106790A-val (GSK) a csak vivőanyagot tartalmazó kontroll médiumhoz képest szignifikánsan és dózis-függő módon gátolta az *ex vivo* szőrnövekedést. A magas (100-1000 nM) koncentrációban alkalmazott GSK kezelés esetén a szőrtüszők alig növekedtek, és már két nap kezelés elteltével markáns különbségek voltak a kezelési csoportok (n=18 szőrtüsző) között.

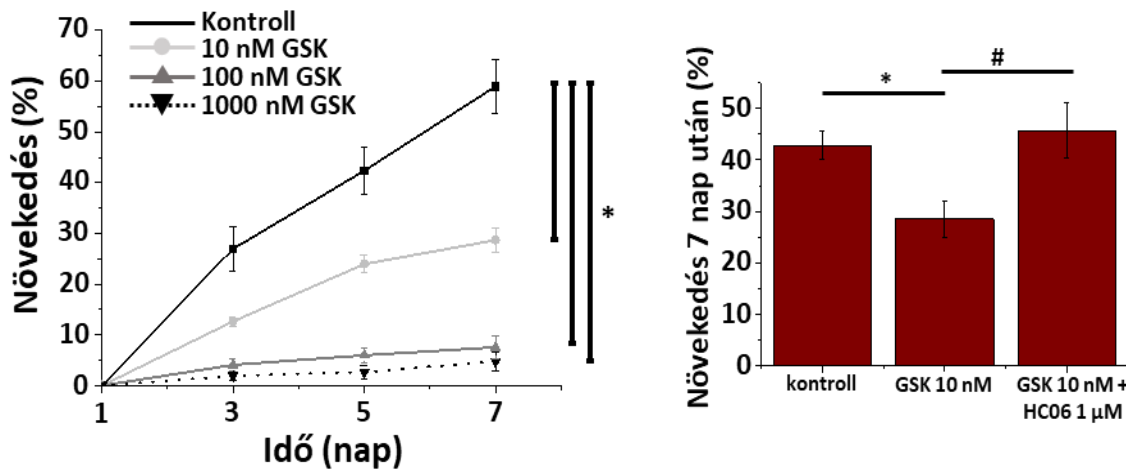


13. ábra

A TRPV4 mRNS és fehérje szintű kifejeződése humán szőrtüszőn és ORSK tenyészetben

a.) mRNS szinten mind a szőrtüszőkből, mind az ORSK-ból nyert mRNS-ből futtatott RT-qPCR-ral kimutatható volt a TRPV4, ($n=3$) adataiból, átlag (+/- SEM) formában. *b.)* két teljes hosszúságú szőrtüsző. *c.)* a szőrszál és az azt körülvevő epiteliális és kötőszöveti rétegek. *d.)* a bulbusz területe. Vörös immunreaktivitás jelöli a TRPV4 fehérjét (nyilak). A kék fluoreszcencia (DAPI) a sejtmagokat. *e.)* a TRPV4 fehérje (vörös immunreaktivitás) immunfluoreszcens jelölése ORSK-k primer tenyészetén. Betét: negatív kontroll. **KSzB:** kötőszövetes burok, **ORS:** külső gyökérhüvely, **IRS:** belső gyökérhüvely, **SzSz:** szőrszál, **DP:** dermális papilla, **HF:** szőrtüsző, **MK:** mátrix keratinociták, **GAPDH:** glicerin aldehid foszfát dehidrogenáz (belső kontroll), Lépték: 50 μ m.

Tekintettel arra, hogy az anagén fázisú szőrtüszők képesek a szőrszál szintetizálására (és a kiindulásnál anagén VI. fázisban lévő szőrtüszőket szelektáltunk az elongációs kísérletekhez), a növekedésgátlást kiváltó hatást a katagén fázis felé terelés egyik jelének is tekinthetjük. Kiemelendő, hogy az antagonistá együttes alkalmazása esetén a növekedés gátlását ki tudtuk védeni (14.b ábra), tehát az agonista hatása TRPV4-specifikus volt. Kísérleteink – némi donorfüggő varianciát leszámítva – 3 különböző donorból származó szőrtüszőkön ismételve hasonló eredményre vezettek.



14. ábra

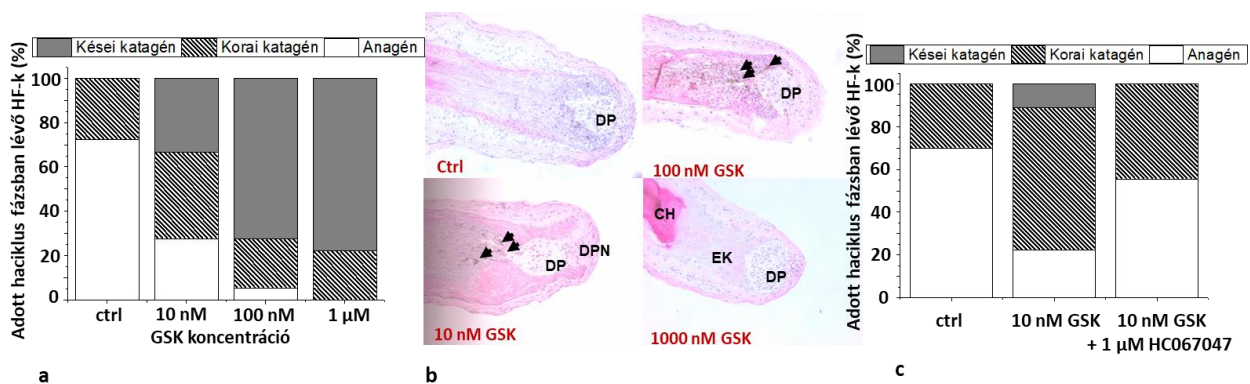
A TRPV4 farmakológiai aktivációja gátolja a humán szőrtüszők *ex vivo* növekedését

A napok az izolálás napjától (0. nap) számított időt mutatják, az első napot a szőrtüszők kezelés nélkül, izoláló (magas antibiotikum tartalmú) médiumban, egyebekben megegyező körülmények között töltötték. Reprezentatív eredmények egy donor ($n=18$) adataiból, átlag (+/- SEM) formában, $p^* < 0,05$. Összesen 3 donorból készült kísérletek hasonló eredményre vezettek. **GSK**: GSK1016790A (szelektív, szintetikus TRPV4 agonista). **HC06**: HC067047 (szintetikus TRPV4 antagonistá).

6.1.3. A TRPV4 aktiváció a szőrtüszőn katagén fázist indukált *ex vivo* körülmények között

Az elongációs kísérletek során kezelt szőrtüszőket az anyagok és módszerek fejezetben ismertett módon a szervkultúrában töltött 7. napon friss-fagyasztott metszeten, standard kritériumok alapján klasszifikáltuk anagén, korai katagén, illetve kései katagén fázisnak megfelelő szőrtüszőkre. A különböző kezelési csoportokon belül az adott fázisban lévő szőrtüszők aránya jellegzetesen változott; a TRPV4 aktivátor kezelés alkalmazott dóziséval korrelálva a korai/kései katagén fázisú

szórtüszők felé tolódott el a szórtüszők aránya. Az 15.b ábrán látható reprezentatív, az adott kezelési csoportra leginkább jellemző szórtüszők rutin szövettani festése során nyert felvételeken pl. a kontroll szórtüsző DP-ja hagyma alakú és a proximális vég felé nyitott volt, vagyis itt nem vette körül a MK régió. Ennek a nyílásnak a méretében is volt különbség a különböző fázisú szórtüszők között; a nyílás szűk maradt az anagén (pl. a „ctrl”) szórtüsző esetén, de korai katagén szórtüsző (pl. a 10-100 nM GSK-val kezelt szórtüsző) esetén ez a nyílás tágabb volt, és a mátrixot alkotó keratinociták fellazultak. Szintén látható a 15.b. ábrán a DP kondenzációja, valamint a DP



15. ábra

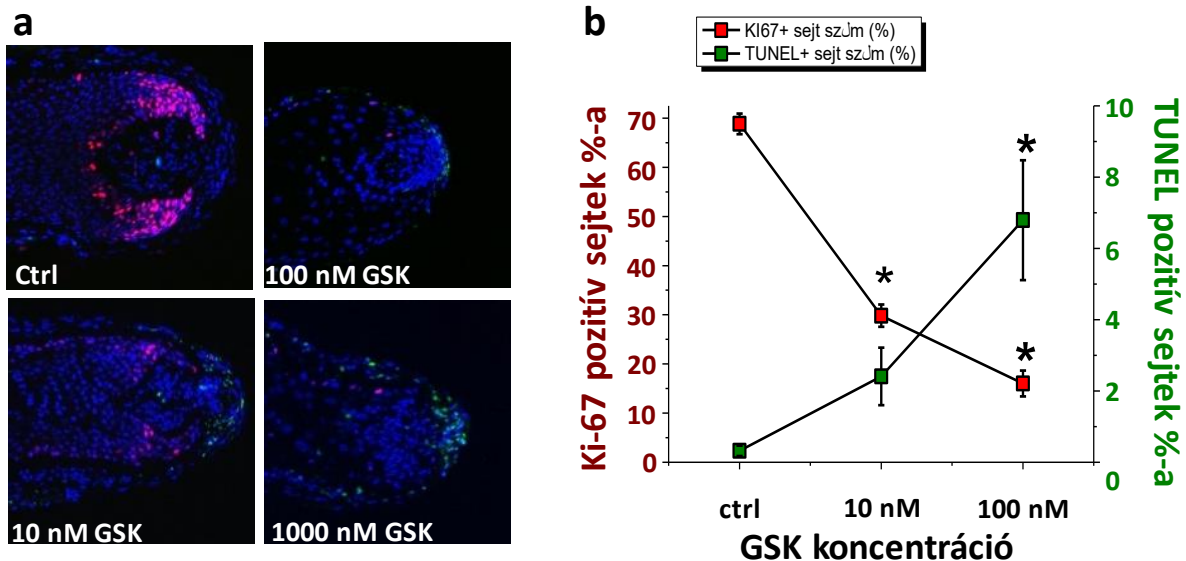
A TRPV4 farmakológiai aktivációjának hatása a hajciklusra

a.) Reprezentatív eredmények egy donor ($n=18$) adataiból, összesen 3 donorból készült kísérletek hasonló eredményre vezettek. **b.)** Egy-egy szórtüsző rutin szövettani metszete és bizonyos, adott fázisra jellemző struktúrák vagy változások. **c.)** a TRPV4 antagonistája kivédi az agonista hatását a hajciklusra. **DP:** Dermális papilla, **DPN:** DP nyél, **EK:** epiteliális köteg, **CH:** „bunkós” szőrszál. Nyilak: melanin felhalmozódás. **GSK:** GSK1016790A (szelektív, szintetikus TRPV4 agonista). **HC06:** HC067047 (szintetikus TRPV4 antagonistája).

és a szőrszál közötti epiteliális nyél kialakulása (1000 nM GSK). A katagénre jellemző, összességében kevesebb látható follikuláris melanin a csökkent szintézis eredménye. Ennek eloszlása is sokkal egyenetlenebb (nyilak), amely szintén a katagén fázis jellegzetessége. *In vitro*, a 6 napig tartó kezelés után látványos eltolódás alakult ki a GSK-val kezelt szórtüszők esetén, így 100 nM koncentrációjú kezelés esetén alig, míg 1 μM-lal kezelt szórtüsző esetén nem maradt anagén fázisban szórtüsző.

6.1.4. A TRPV4 aktiváció hatására a szőrtüsző mátrix keratinocitáinak proliferációs, illetve apoptotikus folyamatai a katagénre jellemző irányba változtak

Az anagén szőrtüszők mátrixában lévő keratinociták intenzíven osztódnak, és miközben a bulbus felől a szőrszál disztális irányába haladnak, differenciálódva a kemény keratinok expresszió fokozásával alakítják ki a növekvő szőrszálat. A mátrix keratinociták proliferációja a szőrszálképzés legalapvetőbb feltétele, így a szőrszálképző anagén fázis jellegzetessége.



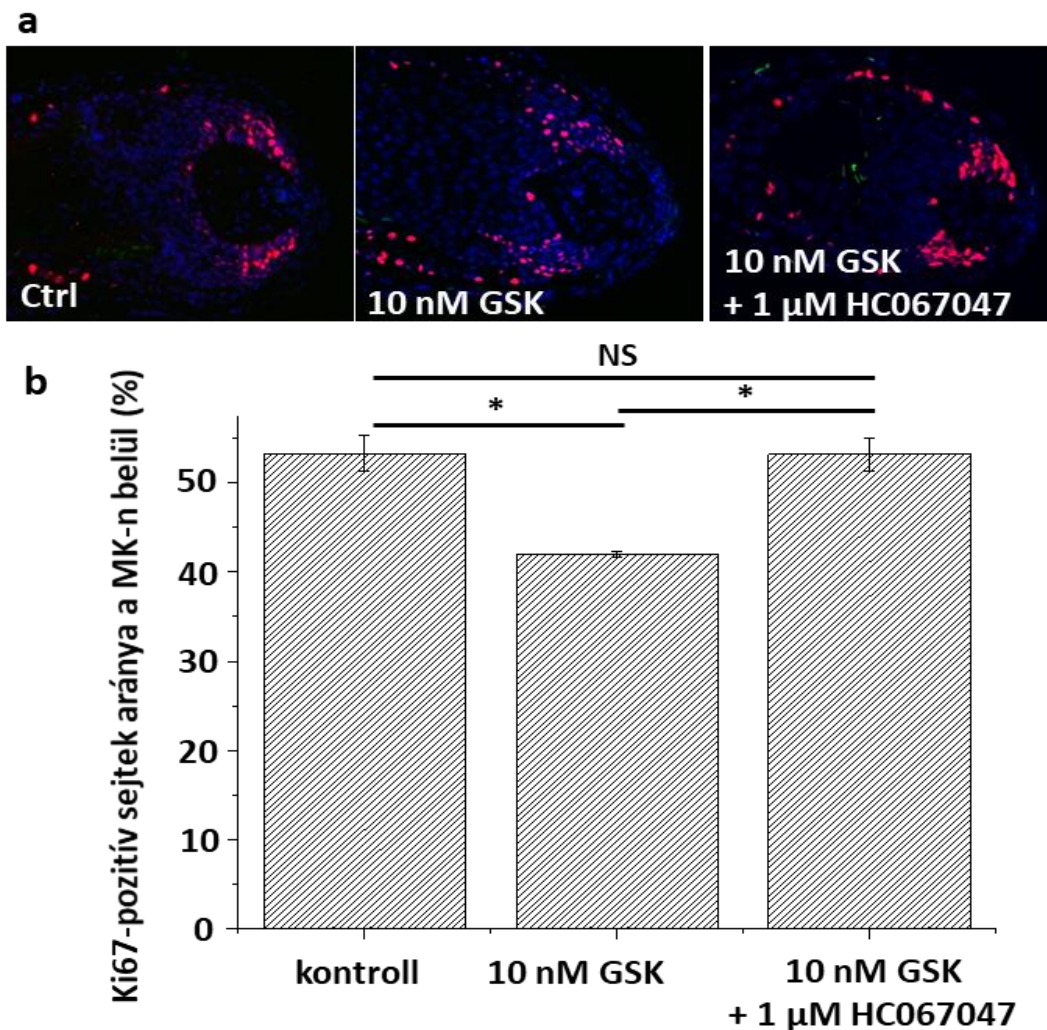
16. ábra

A TRPV4 farmakológiai aktivációja a mátrix keratinociták sejt-folyamataira

a.) Ki67 (vörös immunreaktivitás) és TUNEL (zöld) jelölt sejtek, amelyek proliferálnak, vagy éppen apoptózison mennek keresztül (1-1 kezelési csoportból jellegzetes), a sejtmagok jelölésére DAPI (kék) festést alkalmaztunk. b.) Ki67 és TUNEL pozitív sejtek aránya az összes MK sejtben belül, reprezentatív eredmények egy donor (n=18) adataiból, átlag (+/- SEM) formában, $p^* < 0,05$. összesen 3 donorból készült kísérletek hasonló eredményre vezettek. **GSK:** GSK1016790A (szelektív, szintetikus TRPV4 agonista).

A TRPV4 aktivátor kezelést nem kapott szőrtüszők mátrix régiójában lévő intenzív proliferációt jelölő (vörös) Ki67-immunreaktivitás (16. ábra) szépen kirajzolta magát a MK régiót, a sejtek többsége (kb. 60-70%) Ki67-pozitív volt (16.b ábra), vagyis éppen osztódott. Az is látható, hogy a mátrix keratinociták osztódása fokozatosan csökkent a TRPV4-aktivátor kezelés emelkedő dóziséval (a legmagasabb koncentrációjú GSK kezelés esetén, a kései katagénre jellemző morfológia miatt, a MK hiányában nem lehetett proliferáló/apoptotizáló sejteket sem számolni).

Ezzel párhuzamosan, a TRPV4 agonista kezelés esetén az egyébként anagén fázisban nem, vagy csak elvétve volt látható apoptotikus TUNEL pozitív (zöld immunreaktivitás) sejtek száma fokozódott, amely szintén a katagén szőrtüszőkre jellemző. A kísérleteink megerősítése céljából végzett TRPV4 antagonistá HC067047 kezelés képes volt kivédeni a proliferáció csökkenést (17. ábra).



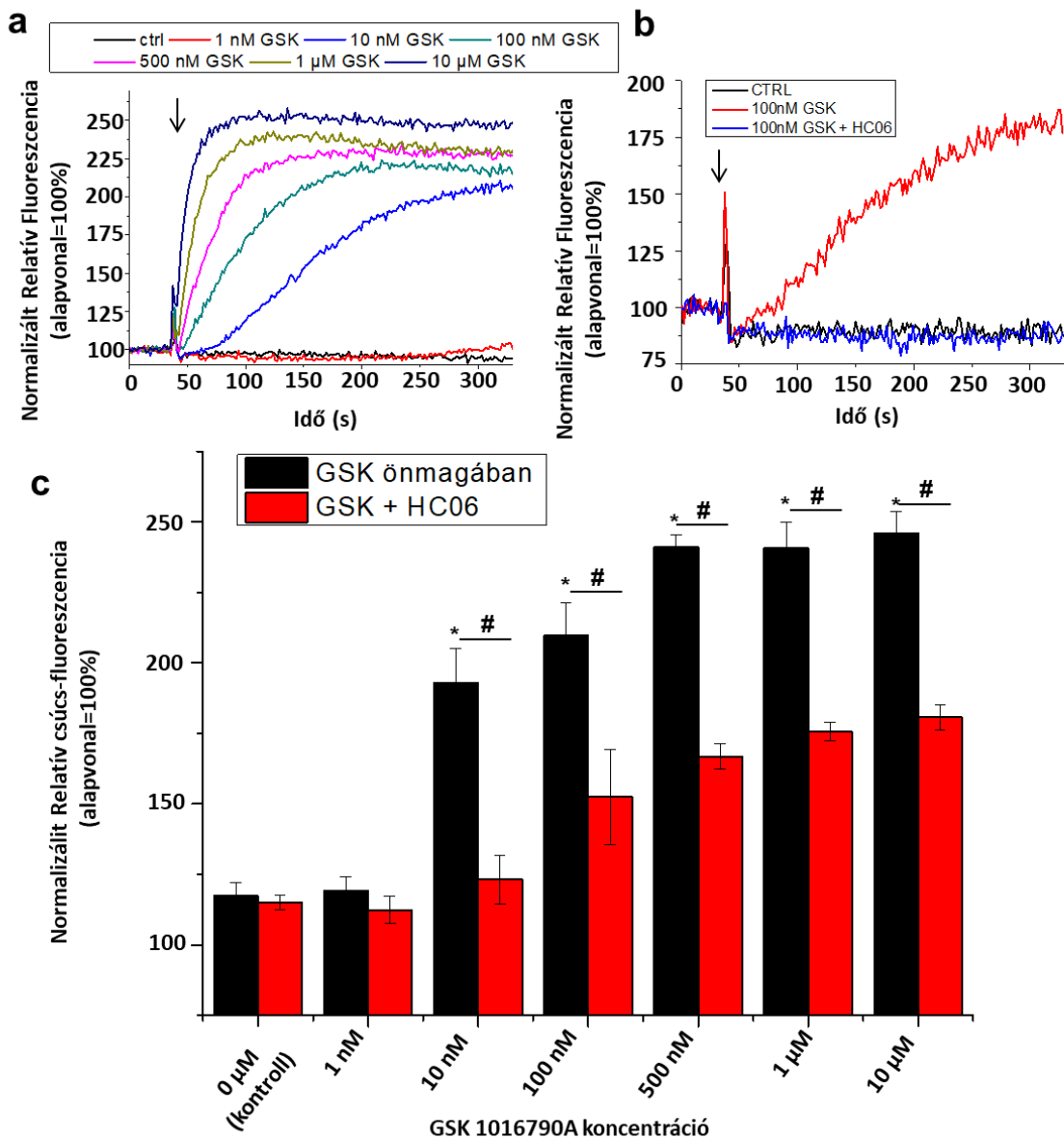
17. ábra

A TRPV4 farmakológiai aktivációjának hatása a mátrix keratinociták proliferációjára

a.) Reprezentatív szőrtüszőmetsetek Ki67 és TUNEL jelölése (vörös, ill. zöld immunreaktivitás), amely a proliferáló vagy apoptotizáló sejteket jelöli, a sejtmagok jelölésére DAPI (kék) festést alkalmaztunk. **b.)** Ki67 pozitív sejtek aránya az összes MK sejtben belül, reprezentatív eredmények egy donor ($n=18$) adataiból, átlag (\pm SEM) formában, $p^* < 0,05$. összesen 3 donorból készült kísérletek hasonló eredményre vezettek. **GSK:** GSK1016790A (szelektív, szintetikus TRPV4 agonista). **HC067047:** TRPV4 antagonistá, **NS:** nem szignifikáns

6.1.5. A TRPV4 működés vizsgálata az ORSK-k Ca^{2+} -homeosztázisára

A TRPV4 nem-specifikus Ca^{2+} -permeábilis kationcsatorna, vagyis képes Ca^{2+} -okat is a pórusformáló régió keresztül a sejtmembránon átengedni, ha aktivált állapotba kerül. Elsőként az



18. ábra

A TRPV4-aktiváció hatása az ORSK-k $[Ca^{2+}]_{ic}$ -ra

a.) reprezentatív fluoreszcencia görbék a TRPV4-aktivátor különböző koncentrációival végzett mérések alapján (az ábra feletti magyarázat szerinti kezelésekkel). *b.)* reprezentatív fluoreszcencia görbék TRPV4 agonista és antagonistá alkalmazásával. *c.)* az előző mérések és az azonos donorból származó technikai ismétlések ($n=6$) adataiból készült átlagos csúcs fluoreszcencia változás, TRPV4 antagonistá jelenlétében (piros oszlopok) és anélkül (fekete oszlopok., átlag (+/- SEM) formában, $p^*, \# < 0,05$, összesen 3 donorból készült kísérletek hasonló eredményre vezettek. **GSK:** GSK1016790A (szelektív, szintetikus TRPV4 agonista). **HC:** HC067047 (TRPV4-antagonista), **CTRL:** kontroll

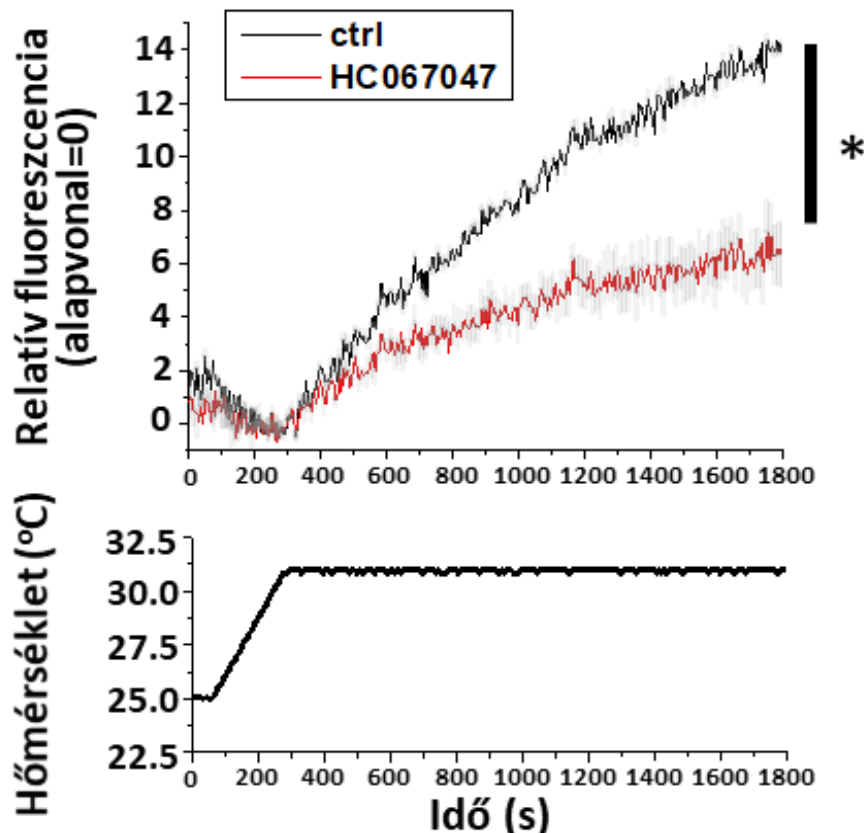
aktivációt kémiai stimulussal, a korábban is alkalmazott GSK1016790A-val teszteltük. Primer humán ORSK-k tenyészetét az „Anyagok, módszerek” szekcióban ismertetett módon, Fluo-4 fluoreszcens Ca^{2+} -méréssel vizsgáltuk.

Eredményeink szerint a TRPV4 aktivátor koncentrációfüggő módon fokozta az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$), ahogy a 18. ábrán is látható. A reprezentatív fluoreszcens mérések regisztrátumain (18.a-b ábra) jól látszik, hogy a TRPV4 aktivátor kezelés (függőleges nyíl) után szinte azonnal emelkedett a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$. A TRPV4 funkcionalitása mellett a TRPV4 antagonistá HC067047 hatásosságát is teszteltük (18.b-c ábra), eredményeink szerint sejtszinten képes volt a 10 nM GSK1016790A hatását teljesen kivédeni, de magasabb koncentrációban alkalmazott agonista kezelés esetén is képes szignifikánsan csökkenteni a TRPV4 aktivációt (18.b-c ábra). Megállapítható tehát, hogy a korábban látható, TRPV4 aktivátor kezelést követően a szőrtüszőn bekövetkezett változások valóban a TRPV4 működés miatt alakultak ki, illetve a TRPV4 valóban funkcionális Ca^{2+} -csatornaként működik az emberi szőrtüsző ORSK-in.

6.1.6. A TRPV4 részt vesz az ORSK-k hőstimulusra adott Ca^{2+} -beáramlásának közvetítésében *in vitro*

A TRPV4 ioncsatorna a termoszenzitív ioncsatornák közé tartozik, hőstimulus is képes aktiválni. Ez a bőrben talán a többi szervnél is relevánsabbnak tűnik, bár különböző szövetekben eltérhet az aktivációs hőtartomány, részben az egyéb TRP-receptorok szimultán jelenléte miatt is. A bevezetésben ismertetett okok miatt nem egy adott hőmérséklettel jellemezhetjük a TRPV4-et, ami felett nyitott vagy alatt zárt állapotban van. Tekintettel arra, hogy ezidáig a TRPV4 nem volt leírva humán szőrtüszőkön, így nem rendelkezünk információval, hogy milyen hőmérséklet aktiválja kifejezetten ezen a szöveten. Ezért a leginkább relevánsnak tűnő egerek keratinocitáiból származó ismeretek alapján 31 °C-kal kezeltük a sejteket, miután 25 °C-on inkubáltuk azokat (19. ábra, alsó panel). Látható, hogy az ORSK-kon mért fluoreszcencia folyamatosan emelkedett a hőmérsékletváltozás után, vagyis a sejtek képesek voltak a hőstimulusra *in vitro* fokozatosan

[Ca²⁺]_{ic} növekedésével reagálni (19. ábra). A TRPV4 hozzájárult ehhez a hatáshoz, mert az



19. ábra

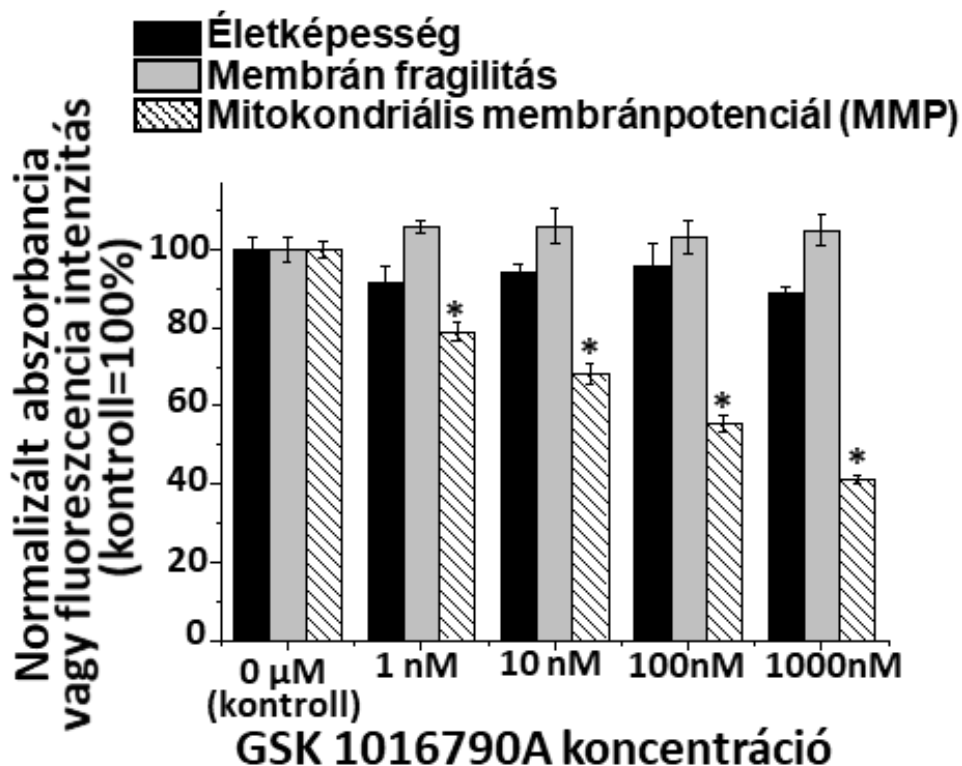
Az ORSK-kban hőstimulus hatására emelkedik a [Ca²⁺]_{ic}, melyet részben TRPV4 mediál. A fluoreszcencia intenzitás görbék átlag (+/- SEM) formában, az alsó panelen bemutatott hőprotokoll szerinti hőmérséklet-változás alatt (n=3) mért Fluo4 intenzitását mutatják, amely a [Ca²⁺]_{ic}-val korrelál. A TRPV4 antagonistá jelenlétében (piros görbe) és anélkül (fekete görbe) különbségek közötti szignifikancia az átlagos csúcs fluoreszcencia változásra vonatkozik, p*, #<0,05. összesen 3 donorból készült kísérletek hasonló eredményre vezettek. **HC067047**: TRPV4-antagonista, **CTRL**: kontroll.

antagonista jelenlétében szignifikánsan csökkent a Ca²⁺-beáramlás.

6.1.7. A TRPV4 aktiváció nem befolyásolta az ORSK-k életképességét, ugyanakkor apoptózist indukált *in vitro*

A szőrtüszőkön látott mátrixban mért hatások (proliferáció csökkenése és fokozott apoptózis) a katagén indukciót kísérő vagy követő jellegzetességek. A TRPV4 azonban – mint bemutattam a korábbi eredmények ismertetése során – az ORS réteg keratinocitáin expresszálódik és funkcionál.

A TRPV4 aktiváció hatására eredményeink szerint a sejtek életképessége nem változott (MTT-



20. ábra

A TRPV4 aktiváció hatása az ORSK-k életképességére, nekrotikus és apoptotikus folyamataira

A GSK1016790A kezelés hatása a sejtek életképességére (fekete oszlopok, MTT), membrán-fragmentációra (nekrózis marker, szürke oszlopok), valamint a mitokondriális membránpotenciálra (apoptózis, ferdén csikozott oszlopok) $n=8$, átlag \pm SEM, $p^* < 0,05$. Összesen 3 donorból készült kísérletek hasonló eredményre vezettek. **GSK1016790A**: szelektív, szintetikus TRPV4 agonista

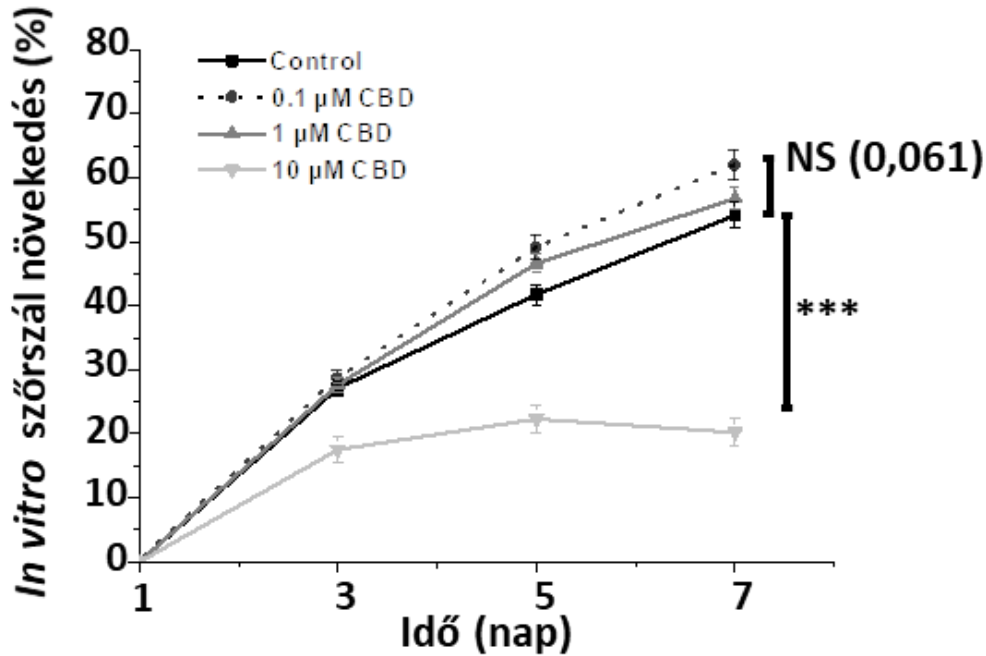
assay, 20. ábra, fekete oszlopok) 3 órás kezelés után. Az életképesség mellett a nekrotikus és apoptotikus folyamatok korai változásait is mértük. A nekrosis folyamán fragmentálódó membránon a SyTOX-assay magfestése magasabb fluoreszcencia intenzitással járna, azonban a GSK kezelés esetén ezt nem tapasztaltuk (20. ábra, szürke oszlopok). Ellenben a TRPV4 aktivátor koncentráció-függő módon csökkentette az apoptózis korai jelének tartott mitokondriális membránpotenciált (20. ábra, ferde csíkos oszlopok). A mitokondriális membránpotenciál mérését az azzal korreláló DilC1(5)-fluoreszcencia intenzitás detektálásával végeztük.

6.2. A CBD hatásai a szőrtüsző biológiai folyamataira

Kísérleteink második felében a CBD hatásait vizsgáltuk a szőrtüszőre *ex vivo* szervkultúrában. A hajciklusra gyakorolt hatások mellett, mivel – részben a korábban ismertetett eredmények alapján – a potenciális cél-spektrumba tartozó receptorok (TRPV4, adenosin receptorok) jelen vannak a szőrtüszőn, ezekre gyakorolt hatását is vizsgáltuk.

6.2.1. A CBD alacsony koncentrációban tendenciózusan fokozta, magas koncentrációban szignifikánsan gátolta a szőrnövekedést *ex vivo*

Megállapítottuk, hogy a CBD kezelés a szőrnövekedésre alacsony és magas koncentrációban ellentétes hatást gyakorolt (21. ábra). Magas (10 μM) koncentrációban alkalmazva a CBD



21. ábra

A CBD duális hatása az *in vitro* szőrnövekedésre

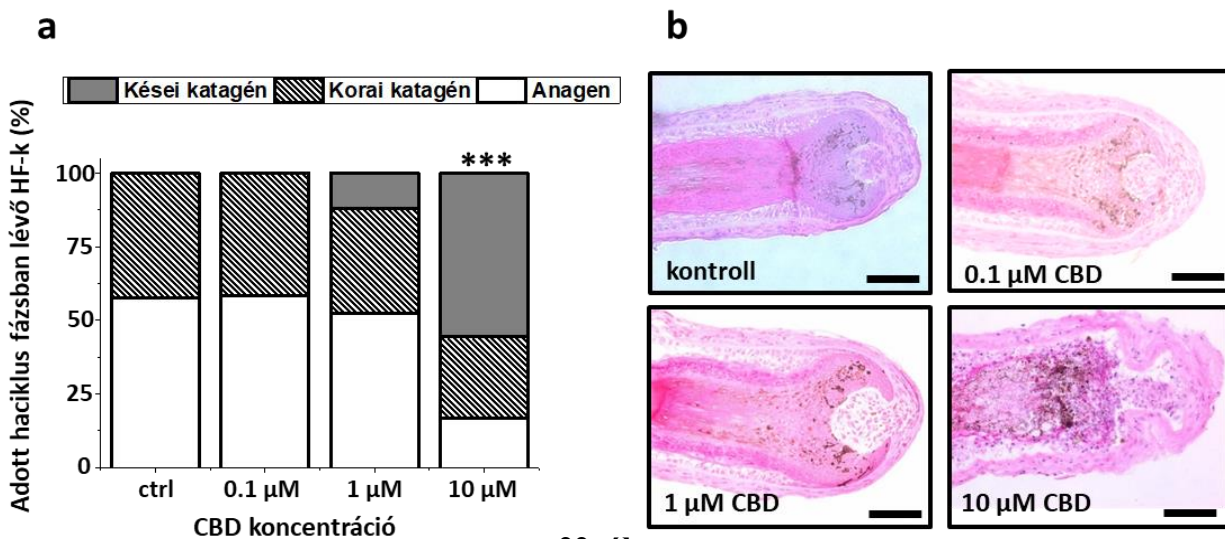
A CBD 0,1, 1, és 10 μM dózisokban alkalmazva fokozza, vagy szignifikánsan gátolja a szőrnövekedést. $n=54$, 3 donor ($n=18$ donoronként) összesített eredményeiből, átlag \pm SEM, $p^{***}<0,001$.

szignifikánsan és szinte teljesen gátolta a szőrnövekedést (21. ábra, fekete vs. szürke vonalak), azonban a legalacsonyabb koncentrációban alkalmazva (0,1 μM) kis mértéken fokozta az elongációt (szaggatott vonalak). Ugyanakkor ez nem minden donor esetén bizonyult

szignifikánsnak (56,66 % vs. 61,53 %; 52,08 % vs. 53,08 %; 60,53 % vs. 71,02% a 3 donor esetén a kezeletlen vs. 0,1 μM CBD kezelési csoportokban). Ezért eredményeinket korábban TRPV4 aktiváció hatásánál bemutatottakhoz képest kissé eltérően ábrázoltuk; nem egy donorból származó reprezentatív eredményt mutatunk be, hanem a három donor összes, azonos kezelési csoportba tartozó szőrtüsző elongációinak kombinálásával kapott növekedési görbét és statisztikát ábrázoltuk. Kimutattuk, hogy míg a magas koncentrációban alkalmazott CBD hatására kialakuló növekedés-gátlás hamar, már a második mérés idejére kialakult, addig az alacsonyabb koncentrációjú kezelések még a kontrollal kb. azonos hatásúak voltak, még nem volt köztük különbség. Méréseink alapján az 1 μM -os CBD kezelés a magasabb és alacsonyabb koncentrációjú kezelések között, a kontroll közelében helyezkedett el.

6.2.2. A CBD magas koncentrációban *ex vivo* katagén fázist indukált

A CBD szőrtüszőre kifejtett hatását tovább vizsgálva a korábban kezelt szőrtüszők hajciklus-analízisét végeztük el, tehát azt elemeztük, hogy a kiindulási (mind anagén) szőrtüszők milyen



22. ábra

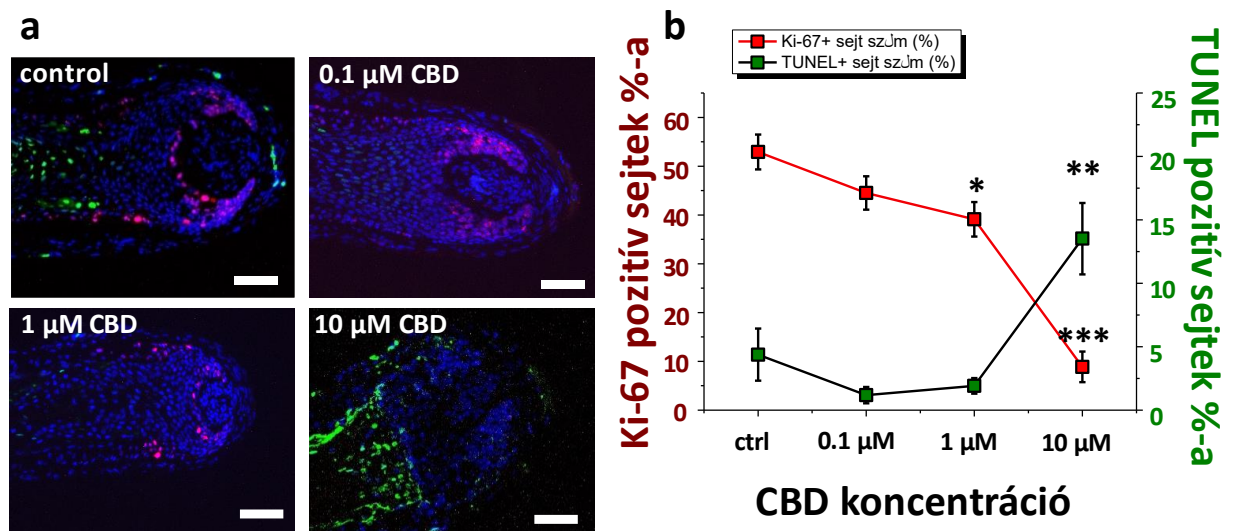
A CBD hatása a hajciklusra

Reprezentatív eredmények egy donor ($n=18$) adataiból, összesen 3 donorból készült kísérletek hasonló eredményre vezettek. **a.)** a CBD hatása a hajciklus fázisainak megoszlására a kezelési csoportokon belül. **b.)** Egy-egy szőrtüsző rutin szövettani metszete, a csoportra jellegzetes (10 μM -ban kései katagén, egyébként anagén) fázisban, $p^{***}<0,001$ Lépték = 50 μm .

arányban kerültek korai vagy kései katagén fázisba. Ezen kísérleteink eredménye (22. ábra a-b) alapján a CBD alacsony dózisban nem mutatott különböző hatást a kontroll csoporthoz (vivő anyaggal kezelt szőrtüszőkhöz) képest, vagyis a kezdeti anagén VI. fázisú szőrtüszők kb. ugyanolyan mértékben maradtak ebben a fázisban, míg kis részük korai (1 μM dózisban 1 szőrtüsző kései) katagén fázisba került. Ezzel szemben 10 μM CBD kezelés hatására drámai mértékben csökkent az anagén fázisban lévő szőrtüszők száma és aránya. Ezen eredményünk összecseng az elongációs kísérlet során tapasztaltakkal, ugyanis a katagén szőrtüszők nem termelnek szőrszálát. Ebben a kezelési csoportban a kései katagén szőrtüszők aránya dominált (22. ábra).

6.2.3. A CBD magas koncentrációban fokozta a mátrix keratinociták apoptózist, és gátolta a proliferációt

Következő lépésként a hajciklusra kifejtett hatás feltérképezésben a CBD mátrix keratinociták sejtfolyamataira (proliferáció csökkenésére vagy apoptózis fokozódására) gyakorolt hatását kívántuk vizsgálni. Ezen, a katagén fázis kezdetére jellemző változások elemzése alapján



23. ábra

A CBD hatása a mátrix apoptózisra és proliferációra

*a.) A proliferáló, Ki67+ (vörös immunreaktivitás) és az apoptotizáló, TUNEL+ (zöld) jelölt sejtek (representatív szőrtüszők), a sejtmagok jelölésére DAPI (kék) festést alkalmaztunk. b.) Ki67 és TUNEL pozitív sejtek aránya az összes (DAPI+) MK sejten belül, reprezentatív eredmények egy donor (n=18) adataiból, átlag (+/- SEM) formában, * $P < 0,05$., ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$, összesen 3 donorból készült kísérletek hasonló eredményre vezettek. Vonal = 50 μm*

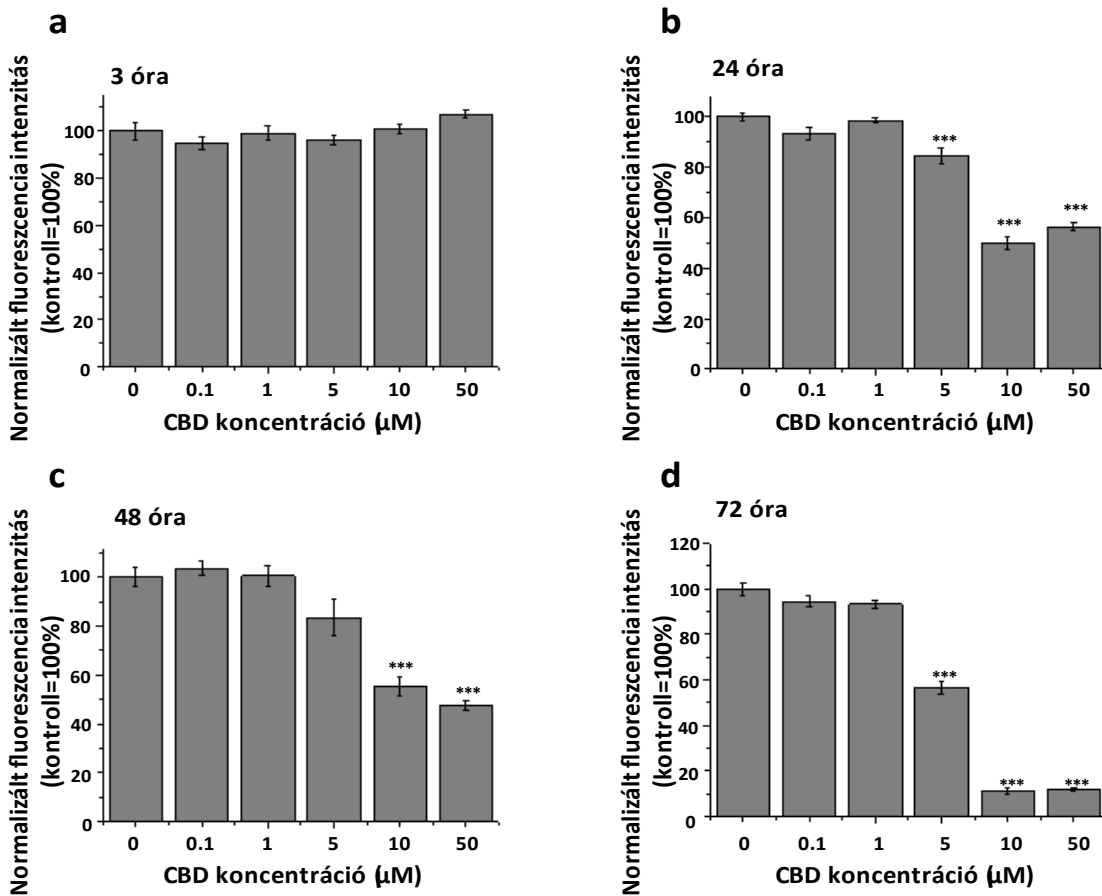
következtethetünk az anagén-katagén átmenet bekövetkezésére, annak egyébként hisztomorfometriával nehezen megítélhető, korai fázisában is.

A CBD kezelés koncentráció függő módon csökkentette a mátrixban zajló proliferációs folyamatokat (23.a ábra, vörös immunoreaktivitás, 23.b ábra), mely 1 μM koncentráció esetén szignifikáns, de 10 μM CBD alkalmazása esetén már drámai volt. Ezzel párhuzamosan az anagén VI. fázisú szőrtüszőben alig megfigyelhető apoptotikus folyamatokat a 10 μM dózisban alkalmazott CBD szignifikánsan fokozta, igaz, alacsony koncentrációban (tendenciózus mértékben) csökkentette. A kezelés hatására tehát az értékelhető szőrtüsző mátrix régióban a korai katagénre jellemző változások mentek végbe. Azonban, mint a 22.a. ábrán látható, a 10 μM dózisú CBD kezelés esetén az anagén és korai katagén morfológia aránya nagymértékben csökkent a kései katagén javára. Ez utóbbi fázisban a szőrtüsző nem értékelhető a standard módszerek alapján, a kései katagén fázisú szőrtüsző bulbusának és ennél fogva a mátrixnak ugyanis teljesen más morfológiája van. Tekintve, hogy ezen kísérleteink során a magas koncentrációjú CBD-vel kezelt csoportban a számszerűleg értékelhető szőrtüszők száma sokkal kevesebb volt, azokat nem ábrázoltuk az eredményeink interpretálása során.

6.2.4. A CBD magas koncentrációban csökkentette az ORSK-k életképességét és proliferációs potenciálját

A CBD-kezelés hatását celluláris szinten tovább vizsgálva fontosnak tartottuk mérni az életképességre gyakorolt változásokat. Korábban ismertetett, *ex vivo* szőrtüszőn mért eredmények alapján ugyanis valószínűnek tűnt, hogy számolhatunk az életképesség csökkenésének lehetőségével is. A genomi DNS mennyiségi meghatározásán alapuló CyQUANT-assay-vel következtethetünk a sejtszámra és proliferációra gyakorolt hatásra is. Eredményeink alapján a CBD 3 órás kezeléssel (24.a ábra) még nem gyakorolt szignifikáns hatást az ORSK-kra. Azonban 24 óra elteltével már szignifikánsan és koncentráció-függő módon csökkentette a sejtszámot (24.b ábra). Ezek a hatások 48, illetve 72 óra elteltével (24.c-d ábra) fokozódtak, látható, hogy 10 μM

koncentrációjú kezelésnél már elérte a CBD a maximális hatását (24.d ábra), míg az 5 μM kezelés kevésbé, de szignifikánsan befolyásolja a sejtszámot. Alacsony, 1 μM -nál kisebb koncentrációan



24. ábra

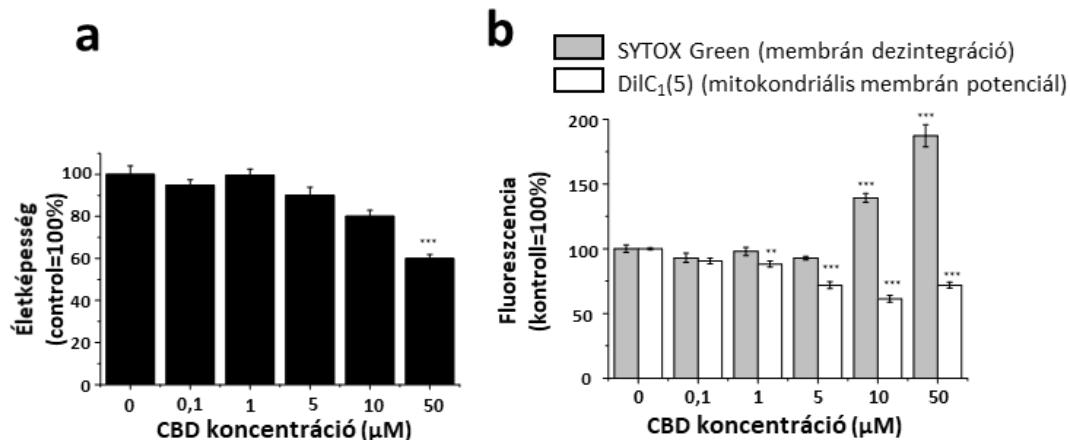
A CBD hatása az ORSK-k sejtszámára (genomi DNS mennyiségére)

a-d.) 3-24-48-72 órás kezelése után a genomi DNS alapján becsültük a sejtszámot, amelyet a kontrollhoz (100%) viszonyítva adtunk meg. A CBD hatására a sejtszám dózisfüggő módon csökken, valamint ez a hatás az idő elteltével is kifejezettebbé válik. 1 μM koncentrációig alkalmazva a CBD nem befolyásolja a sejtszámot ($n=8$), átlag (+/- SEM) formában. $p^ < 0,05$, $** < 0,01$, $*** < 0,001$ összesen 3 donorból készült kísérletek hasonló eredményre vezettek.*

a CBD kezelésnek nem volt hatása a sejtszámra. Ezekkel az eredményeinkkel összhangban vannak a hasonló folyamatokat mérő, de más módszereken alapuló vizsgálataink is. A sejtek mitokondriális enzimeinek aktivitásán alapuló MTT-assay alapján a 3 órás CBD-kezelés szintén koncentráció-függő módon csökkentette a sejtek életképességét (25.a ábra), igaz ez ilyen rövid kezelési idő után még csak a legmagasabb, 50 μM -os koncentrációban alkalmazva bizonyult szignifikánsnak a CBD által okozott viabilitás-csökkenés.

6.2.5. A CBD kombinált módon, apoptózist és nekrozist kiváltva gátolta az ORSK-k életképességét magas koncentrációban

A sejtszintű hatásokat tovább vizsgálva a sejtszámcsökkentő hatás háttérében álló potenciális apoptotikus és/vagy nekrotikus folyamatok mozzanatait is elemeztük. Ezért kombinált DiLC-SYTOX mérést végeztünk (25.b ábra). Ezekkel a kísérletekkel – legalábbis a kutatólaborunkban meghonosodott szokásként – egyidőben mindig végzünk MTT-assay-t is (25.a ábra). Ennek egyik



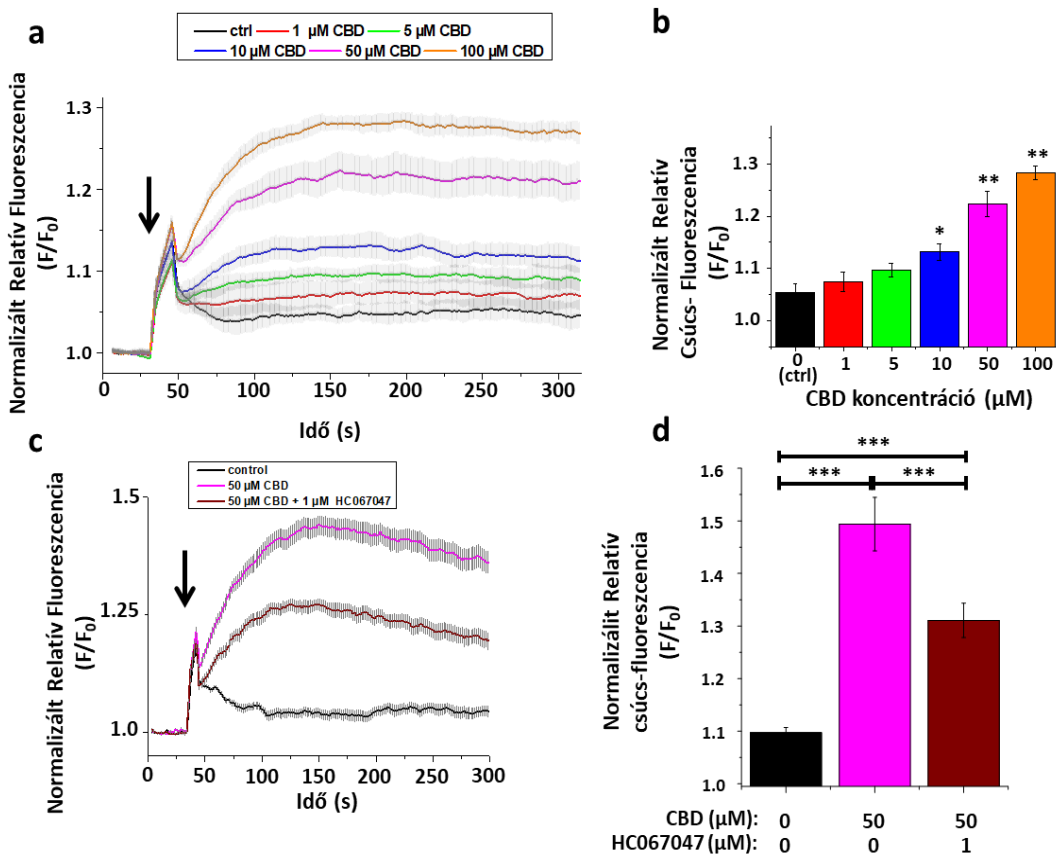
25. ábra

A CBD hatása az ORSK-k apoptotikus és proliferációs folyamataira

a.) 3 órás CBD kezelés után mért mitokondriális membránpotenciál értékkel korreláló DiLC-fluoreszcencia (fehér oszlopok), amely az apoptózis esetén csökken, valamint a membránfragmentáció esetén fokozott mértékben DNS-hez kötődő SYTOX fluoreszcencia intenzitás (szürke oszlopok), amely nekrozis esetén fokozódik, amelyeket a kontrollhoz (100%) viszonyítva adtunk meg. A CBD hatására az apoptózis és a nekrozis mértéke is dóziszfüggő módon fokozódik. b.) az előző kísérlettel párhuzamosan mért viabilitás mérés (MTT) eredményei, (n=8, átlag (+/- SEM) formában. $p^* < 0,05$, $** < 0,01$, $*** < 0,001$ összesen 3 donorból készült kísérletek hasonló eredményre vezettek.

oka, hogy a nagymértékű viabilitás-csökkenés esetén keletkező, a kevesebb sejtől származó fals okból negatív fluoreszcencia intenzitás okát is kiszűrjük. Az azonos ideig (3 óra) tartó kezelés során csak az 50 μM koncentrációban alkalmazott CBD-kezelés esetén tapasztaltunk szignifikáns mértékű sejtszámcsökkenést. Ennek tükrében a CBD-kezelés 50 μM-os koncentrációjában mért DiLC-SYTOX fluoreszcencia intenzitás értékek a többi kezelési csoportból származó méréshez képest szignifikánsan kevesebb sejtől származik, amely befolyásolja az eredmények összehasonlíthatóságát és értelmezését. Látható a 25.b ábrán, hogy a CBD 10 μM koncentráció

felett okoz nekrozist, és már kismértékben 1 μM koncentráció esetén is apoptózisra jellemző mitokondriális membránpotenciál-csökkenéshez vezet. Ez alatti koncentrációban (0,1 μM) nem



26. ábra

A CBD hatásainak vizsgálata az ORSK-k $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}\text{-ra}$

a.) A CBD hatására az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ dóziszfüggő módon fokozódik, ($n=3$), átlag (\pm SEM) formában. b.) az előző mérések csúcs-fluoreszcencia intenzitás értékei, c.) a CBD hatására kialakuló Ca^{2+} -beáramlás a TRPV4 antagonistá alkalmazása esetén szignifikánsan csökken, átlag (\pm SEM) formában, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, összesen 3 donorból készült kísérletek hasonló eredményre vezettek d.) az előző mérésekből származó csúcs-fluoreszcencia értékek ábrázolása. **HC067047**: TRPV4 antagonistá

volt semmilyen vizsgált, korai apoptotikus/nekrotikus folyamatokra jellemző változás.

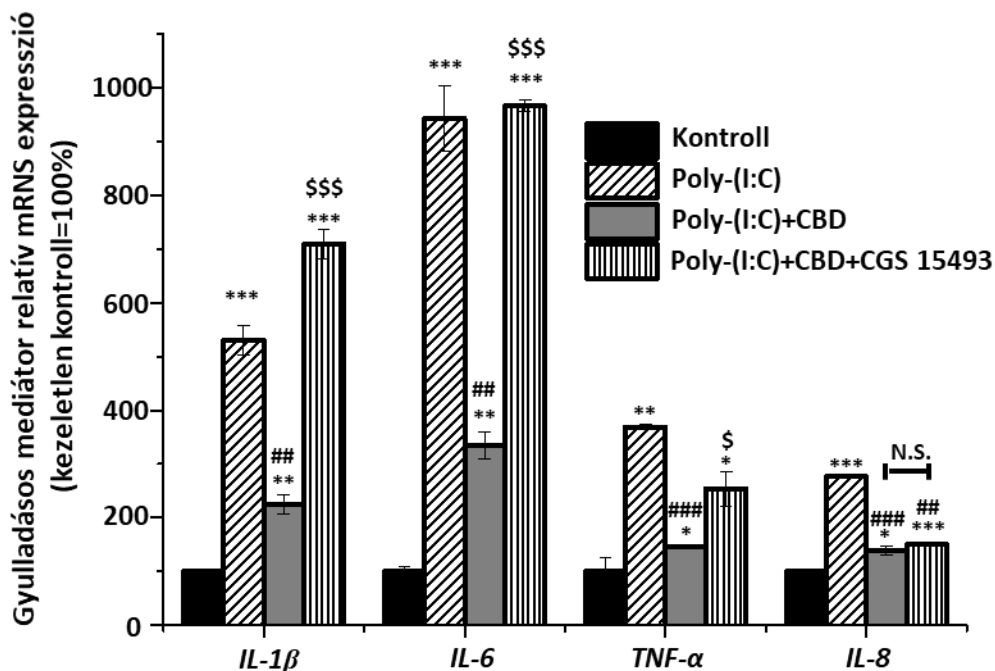
6.2.6. A CBD alkalmazása magas koncentrációban döntően TRPV4 mediált Ca^{2+} -beáramláshoz vezetett az ORSK-kon

Mivel a CBD ismert módon képes TRPV4 csatornát aktiválni, ezért ezen csatornára kifejtett hatását is vizsgáltuk humán szórtüszőből izolált primer ORSK-k tenyészetén. Mint korábban bemutattam,

eredményeink szerint a csatorna kifejeződik a szőrtüszőn (13. ábra), azon belül pedig az ORS rétegében egyértelműen intenzíven jelen van és funkcionál. A CBD-kezelés is képes volt koncentráció-függő módon fokozni az ORSK-k $[Ca^{2+}]_{ic-t}$ (26. a-b ábra), ez pedig 10 μM koncentráció felett szignifikánsnak bizonyult. Amennyiben TRPV4 antagonistá jelenlétében vizsgáltuk az 50 μM CBD hatását, azt találtuk, hogy ez esetben a CBD által okozott Ca^{2+} -beáramlás szignifikánsan csökkent (26.c-d ábra).

6.2.7. A CBD alacsony koncentrációban gátolta a szőrtüszők által termelt, indukált gyulladási citokinek mRNS szintű kifejeződését, amelynek háttérében adenosin receptor aktiváció állt

A CBD hatását a szőrtüsző gyulladási citokin termelésére több okból is fontosnak tartottuk mérni. Egyrészt ismert anti-inflammatorikus hatását szeretnénk volna vizsgálni. Másrészt a CBD a pilosebaceus egység másik tagján, a faggyúmirigyen releváns, részben adenosin-receptor mediált hatásokat is mutatott [107]. Végül pedig ez magyarázhatná a CBD kis koncentrációban mért, bár statisztikailag inszignifikáns szőrnövekedést fokozó hatását. Kísérleteink során a gyulladási mediátorok TLR3 aktivátor poly-(I:C) által indukált mRNS szintű kifejeződését vizsgáltuk. A poly-(I:C) láthatóan (27. ábra) kb. 3-10 szeres szintre fokozta a kontrollhoz (fekete oszlopok) képest az IL-1 β , IL-6 és TNF- α gyulladási citokinek, illetve a kemokin IL-8 expresszióját (ferdén csíkozott oszlopok). Az együttes, alacsony, 0,1 μM koncentrációjú CBD kezelés hatására ez szignifikánsan csökkent minden vizsgált citokin és kemokin esetén (szürke oszlopok), sőt, a TNF- α és az IL-8 szintje gyakorlatilag normalizálódott. Az adenosin receptorok mindegyikét gátolni képes CGS 15493 alkalmazása esetén a CBD hatása (az IL-8 kemokin esetét leszámítva) nem tud érvényesülni.



27. ábra

Az alacsony koncentrációjú (0,1 μ M) CBD hatása a szórtüsző által termelt pro-inflammatorikus citokinek mRNA szintű kifejeződésére

A TLR3 agonista poly-(I:C) kezelés hatására a gyulladásoos citokinek mRNA expressziója fokozódik, amely az együttes CBD kezelés esetén szignifikánsan csökken. E hatás (a kemokin IL-8 esetét leszámítva) az adozin-receptor gátlás esetén elmarad. (n=3), átlag (+/- SEM) formában. */#/\$ P<0,05, **/##/\$\$<0,01, ***/###/\$\$\$ P<0,001, (*: vs. kontroll; #: vs. poly-(I:C); \$: vs. poly-(I:C)+CBD). Összesen 3 donorból készült kísérletek hasonló eredményre vezettek. **Poly-(I:C)**: Polyinozin-polycitidilsav (TLR3 aktivátor), **CGS 15493**: az adozin receptorok pán-antagonistája, **IL**: interleukin, **TNF- α** : tumornekrózis-faktor- α , **NS**: nem szignifikáns

7. Megbeszélés

7.1. A TRPV4 szerepe a hajciklus szabályozásában

A TRPV4-et a bőrben már korábban is fontos funkciókkal hozták összefüggésbe. Az epidermisz keratinocitáiban hozzájárul a sejt-sejt kapcsolatok molekuláris szintű kialakításához, amely a bőr mechanikai és egyéb barrier funkcióinak egyik alapja [102, 103, 115, 117]. A TRPV4 bőrben betöltött szerepéről szóló eddigi ismereteinket egészíti ki a TRPV4 szőrtüszőben jelen értekezésemben részletezett funkciója. Bár az emberi szőrtüszőben nem vizsgálták korábban a jelenlétét, egérből pontos ismereteink vannak a TRPV4 kifejeződéséről. Ezekkel összhangban eredményeink szerint a TRPV4 a szőrtüsző döntően epiteliális sejtjeiben, főként az ORS-ben van jelen (13. ábra). A kifejeződés eloszlása azért sem meglepő, mert egyrészt az egerekben való expresszió is hasonló mintázatot mutat, másrészt az TRPV4-et már ismert módon kifejező epidermisz bazális rétegével az ORS folytonos, és közöttük egyéb szempontok szerint is sok a hasonlóság.

A TRPV4 feltárt funkcionális jelenléte jól illeszkedik a korábban karakterizált TRP csatornák (TRPV1 és TRPV3) közé, amelyek szintén katagén induktornak bizonyultak [115, 117]. A TRPV4 szelektív agonista a hajszál növekedését csökkentette (14. ábra); ennek hátterében a korai katagén fázisra jellemző, a szőrszálat képző mátrix keratinocitákban bekövetkezett drámai proliferáció-csökkenés állt (16. ábra). A mátrix keratinociták apoptózisa nem feltétlenül direkt hatás, vagyis nem a rajtuk lévő TRPV4 csatorna aktiváció közvetlen következménye volt, hanem valószínűleg a katagén átmenet jól ismert mozzanata. Azonban a TRPV4 aktiváció közvetlenül is képes volt apoptózist indukálni vizsgálataink szerint a szőrtüsző fő TRPV4-expresszáló sejtjén (13. ábra és 26. ábra), az ORS-rétegből származó keratinocitákon. Valószínűleg a TRPV4 hatása főként ezeken a sejteken keresztül alakul ki, mivel egyértelműen itt a legnagyobb a TRPV4 immunoreaktivitás (13. ábra), illetve ezeken a sejteken a TRPV4 aktiváció egyéb hatásait is sikerült tetten érni. Mint a bevezetésben említettem, a csatorna nem-szelektív kation csatorna, vagyis Ca^{2+} -

ionokat is képes pórusán átengedni. Vizsgálataink alapján a TRPV4 aktivátor GSK1016790A koncentrációfüggő módon, illetve a szőrtüszőn a fenti hatásokat kiváltó dózis-tartományban fokozta az ORSK-k $[Ca^{2+}]_{ic}$ -t (18.a-c ábra). Eredményeink alapján összességében a TRPV4 főként az ORS-ben van jelen, aktivációja hatására sejtszinten Ca^{2+} -beáramlás történik, amely apoptotikus folyamatokat indít be. Ez az egész szőrtüszőre nézve – csakúgy, mint a pl. TRPV3 esetén – regresszív folyamatok beindulásával jár, így katagén fázis átmenetet indukál.

Érdekes elképzelés az is, hogy esetleg a TRPV4 nem egyszerűen kiegészíti a többi, szőrtüszőn kifejeződő TRPV receptor jelenlétét, hanem esetleg heterotetramerként komplexeket is képez velük. Ez jól ismert jelenség, elméletileg bármely három, szőrtüszőn már leírt TRP-csatorna képes heteromert formálni [94]. Olyan eredmények is vannak, miszerint a TRPV1-4 ioncsatornák együttes expresszió esetén nem önkényesen vagy véletlenszerűen homo/heteromerizálódnak, hanem inkább homotetramereket formálnak [155]. Fontos, és feltehetően élettani jelentősége is van, hogy a heteromer fehérjéket alkotó TRPV altípusok, amelyeknek sok egyéb tulajdonsága megegyezik (pl. szelektivitás), eltérő hőstimulussal aktiválhatóak, míg a heterotetramerek aktivációs stimulus-tartománya pedig a felépítő alegységek alapján változhat is. A bevezetésben ismertetett módon az epidermális keratinocitákban a TRPV4 az intercelluláris kapcsolatok kialakítása révén szerepet játszik a barrier fenntartásában [102-105], és ebben a hőmérsékletnek is van szabályozó szerepe. Az epidermisz mellett a TRPV4 hőstimulus hatására szabályozza a bőr ereinek átmérőjét, így – az átáramló vér mennyiségének, végül a hőcsere változtatásán keresztül – a hőháztartásban is szerepet játszik [106]. Egér keratinocitákban a TRPV4 mért (egyébként a fentiek és a bevezetésben említett okokból változékony) aktivációs küszöbhőmérséklete 32 °C volt [99], és a mi kísérletes elrendezésünkben is egy ehhez hasonló, 31 °C-os hőmérsékleti stimulus képes volt Ca^{2+} -beáramlást kiváltani az ORSK-kon (19. ábra). Az egyébként effektív TRPV4 antagonistá HC067047 még viszonylag magas, 10 μ M-os koncentrációban is csak részlegesen volt

képes kivédeni az ORSK-kon megvalósuló Ca^{2+} -beáramlást. Ezen eredményeink alapján feltételezhető, hogy bár hozzájárul, nem csak a TRPV4 mediálja a hőingerre bekövetkező $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ növekedést az ORSK-kban.

Érdekes kérdés, hogy az *in vitro* eredményeink alapján feltételezett hőérzékenység megnyilvánulhat-e *in vivo* körülmények között is. Eddig is több ízben sikerült *in vitro* hőingerrel aktiválni a TRPV4-et bőrből származó sejteken [99]. Továbbá a TRP csatornák kinetikájára általánosan jellemző, hogy az aktiváló hőmérséklet tartós fennállása az ioncsatorna inaktivációjához vezethet, hiszen a hőstimulus csupán az amúgy feszültségfüggő csatornák (aktivációs, ill. egyaránt inaktivációs) feszültség-küszöbét tolja el [156]. Még az is felmerülhet ezek alapján, hogy a tartósan az aktivációs hőmérsékleti tartomány közelében lévő bőrben a TRPV4 inaktív, ugyanakkor hideghatásra csökken a deszenzitizációja, és ismét aktiválhatóvá válik. Ismert, hogy a TRPV4 szerepet játszik szenzoros funkciókban. A viszketésben azonosították a szerepét [157], és a fájdalomérzékelésben is fontos a TRPV4 intakt működése [98]. Egérben vizsgálták a szenzoros végződéseken és végkészülékeken való expresszióját, és az eredmények alapján kifejeződik majdnem mindegyik kután szomatoszenzoros idegen (intraepidermális idegvégzódések, Ruffini-testek), kivéve a szőrtüsző környékén lévő érzékelő struktúrákat, melyeken nem igazolták a jelenlétét [158]. A szőrtüszők életciklusának és így a szőrzet mennyiségének, valamint színének évszakokkal és a hőmérséklettel összefüggő változása az állatvilágban jól ismert jelenség. Elméletileg a termo-TRP csatornáknak ebben is lehet funkciója, ráadásul a TRPV3 génjében bekövetkezett mutáció szerepet játszhatott a gyapjas mamutok sarkvidékhez való alkalmazkodásában is [122]. Emberben ezek a szezonális változással járó folyamatok nem fordulnak elő, azonban a szőrtüsző körüli hőmérséklet változtatása a klinikai gyakorlatban jelentős is lehet. Egyrészt sikerrel csökkentik a hajás fejbőr hűtésével a kemoterápiát kísérő hajhullás mértékét [159], másrészt a szelektív fototermolízis elvén működő intenzív pulzáló

fény kezelés (intense pulsed light, IPL) hatásos és tartós szőrtelenítést biztosít [160]. Ezen, a szőrtüszőt érintő, hő hatására kialakuló jelenségek mechanizmusa nem ismert; ezek háttérében a TRPV4 vagy más TRP csatorna esetleges szerepét még nem vizsgálták.

A hőingereken kívül sok egyéb általános, nem specifikus inger is aktiválja a TRPV4-et (pl. savas pH, feszülés). Ezek közül egy aktiváló mechanizmus a csatorna aktiválása mellett képes szenzitizálni is a TRPV4-et egy másik ingerre (például az ozmolaritás aciditásra), és ismert gyulladáshoz vezető mediátorok (szerotonin, prosztaglandin-E2) is képesek szenzitizálni a TRPV4-et [98, 161, 162]. Ráadásul, ezek az ingerek gyulladáshoz vezető folyamatok során egyszerre is jelen lehetnek, és az ismert, hogy a gyulladás – valamint *in vitro* több gyulladáshoz vezető mediátor önmagában is – a szőrszál elvesztéséhez vagy katagén fázis kialakulásához vezethet [74, 86, 87, 163, 164]. Felmerül, hogy a TRPV4 is hozzá járul a gyulladást kísérő hajvesztéshez.

Végül, a TRPV4 lehetséges *in vivo* aktivátorai után kutatva az endokannabinoid anandamid (illetve metabolitja) is felmerül lehetséges endogén ligandumként. A szőrtüsző képes főként anandamidot, és kisebb koncentrációban 2-AG-t termelni [113], és bár *ex vivo* az anandamid is katagén fázist indukál, ezen hatásait a CB1 receptoron keresztül fejti ki (ugyanakkor a TRPV4 szerepét ezen kísérleteink során nem vizsgáltuk).

Eredményeink szerint tehát a TRPV4 jól illeszkedik az endokannabinoid-TRP rendszer szőrtüszőn eddig leírt tagjai közé, hiszen mind a CB1 metabotrop receptor, mind a TRPV1,3-4 ioncsatornák aktivációja emberi eredetű *ex vivo* szőrtüsző szervkultúrán katagén fázist indukál [113, 115, 117]. Figyelemre méltó a szőrtüszőn belül a TRP csatornák expressziós mintázatának hasonlósága; dominál az ORS rétegben a kifejeződés, de a DP sejtekben nem igazolt egyik jelenléte sem. Ugyanakkor különbségek is vannak az általuk mediált hatásokban; így az ORSK-k TRPV3 aktivációja apoptózisra és nekrozisra jellemző változásokat is beindít [117], addig a TRPV4 aktiváció eredményeink szerint csak apoptotikus hatású (20. ábra). Amellett, hogy az epidermális

is keratinocitákban expresszálódik, a TRPV4-ről ismert, hogy immortalizált epidermális keratinocita sejtvonalon is képes apoptózist indukálni [165]. Eredményeink alapján a későbbiekben – a TRPV4 farmakológiai célbavétele mellett – mindenképpen érdemes további kutatásokat folytatni a TRPV4 szőrtüszően megnyilvánuló hatásainak *in vivo* karakterizálására, illetve a TRPV4 szerepét vizsgálni lehetséges endogén aktivátorok (pl. hő, gyulladás) hatásának közvetítésében is.

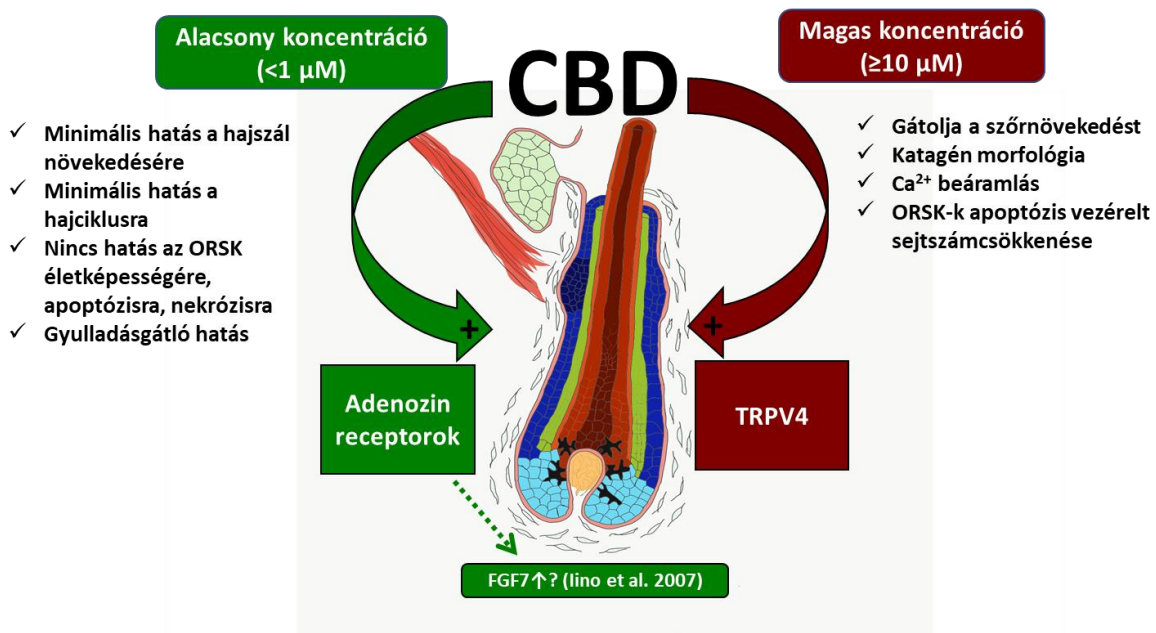
7.2. A CBD hatásai a szőrtüsző biológiai folyamataira

A CBD korábbi eredményeink szerint a PSU másik tagján, a faggyúmirigyen ígéretes acne ellenes hatásokat mutat, melyet részben TRPV4 és adenosin receptor aktiváció közvetít [107]. A két „miniszerv” közelsége, valamint az acne és más kórállapotok kialakulásában betöltött közös szerepük is megkívánja egy potenciálisan terápiás reménnyel kecsegtető hatóanyag vizsgálatát a PSU mindkét elemén. Ráadásul a CBD ismert receptorai közül több expressziója is ismertté vált a közelmúltban a szőrtüszőn is. Ezek között viszont bizonyos receptorok ellentétes hatásokat közvetíthetnek, például a TRPV4 inkább katagén irányba befolyásolja a hajciklust, az adenosin-receptorok pedig anagén irányba [73].

Eredményeink szerint ennek megfelelően nem lehet egyértelmű hajbiológiai hatást rendelni a CBD-hoz, mivel alkalmazott koncentrációtartománytól függően különböző, akár ellentétes hatásokat képes beindítani, és ennek hátterében több receptor aktiválása áll (28. ábra). Például az *in vitro* szőrnövekedést alacsony 0,1 μM koncentrációban inkább fokozta (bár nem szignifikáns módon, 21. ábra), anélkül, hogy a hajciklusra vagy a mátrix keratinociták folyamataira (apoptózis/proliferáció) bármilyen szignifikáns hatása lenne (22-23. ábra). Ebben az alacsony koncentráció-tartományban, kb. 1 μM -ig alkalmazva biztonságosnak tűnik, nincs hatása az ORSK-életképességére és apoptózist vagy nekrozist sem indukál (24-25. ábrák). Ebben a koncentráció-tartományban nem kell tehát számolni az esetleges, előző alfejezetben megbeszélt TRPV4-mediált

hatástól, amit a CBD a közeli faggyúmirigyen korábban leírt módon képes aktiválni. Az alacsony koncentrációjú CBD alkalmazása biztonságosnak tűnik, ugyanis a CBD-kezelésnek nem volt – alacsony koncentrációban – hatása az ORSK-k Ca^{2+} -homeosztázisára (26. ábra) sem.

A CBD magas, 10 μM -os koncentrációban ugyanakkor gátolta a szőrnövekedést *ex vivo* (21. ábra, világos szürke vonal), és a mátrix keratinociták között az apoptotizáló TUNEL-pozitív sejtek aránya az elenyésző néhány százalékról kb. 15 %-ra emelkedett (23. ábra). Ennek megfelelően a hajciklust is drámai mértékben a katagén irányba terelte (22. ábra). Fontos, hogy ebben a (10 μM feletti) koncentráció-tartományban már az ORSK-k $[Ca^{2+}]_{ic}$ -jét is szignifikánsan emeli (26.a-b. ábra), valamint, hogy a CBD által okozott Ca^{2+} -beáramlás szignifikáns módon kivédhető a TRPV4 antagonistá HC067047 együttes alkalmazásával (26.c-d ábra). A CBD az ORSK-k életképességére ennek megfelelően hasonló hatást mutat, mint a TRPV4 aktiváció (20. ábra) esetén, vagyis képes apoptózist indukálni, azonban ehhez nekrotikus hatás is társul (25. ábra). Sőt, a CBD ebben a



28. ábra

A CBD szőrtüszőn kifejtett hatásainak összefoglalása

A szőrtüsző (középen) bal oldalán az alacsony koncentrációban alkalmazott CBD által kifejtett hatásokat (zöld szín, nyíl) mutatjuk be, a gyulladásgátló hatások mögött adenozin-receptor aktivációt feltételezünk. Ezzel szemben magas (10 μM feletti) koncentrációban alkalmazva a TRPV4 receptorokat is aktiválja, és a hajciklust a katagén fázis felé terelve gátolja a szőrnövekedést.

koncentrációban gátolja a sejtek proliferációját és életképességét, valamint hosszú távú (1-3 nap) hatása már 5 μ M dózisban is megnyilvánul.

A CBD alacsony koncentrációban amellet, hogy biztonságosnak tűnik, vagyis nincsenek az előzőekben ismertetett TRPV4 mediált hatásai, gyulladásgátló hatásának is bizonyult. Modellünkben a TLR3 receptor aktivációjával indukáltunk *in vitro* gyulladós környezetet szórtüsző-szervkultúrában, amely során sikerült a teljesen kezeletlen szórtüszők citokin termelését fokozni, így az IL-1, IL-6, IL-8 és TNF α expressziója kb. 3-10-szeresére fokozódott (27. ábra, ferdén csíkozott oszlopok). A CBD képes volt ezt a gyulladós választ minimalizálni vagy kivédeni együttes alkalmazás esetén (27. ábra, szürke oszlopok), és ezt a hatást valószínűleg adenzin receptorok aktiválásával fejtette ki. Eredményeink szerint a CBD kellően alacsony dózisban alkalmazva, amelyben a TRPV4-et még nem aktiválja érdemben, képes az adenzin receptorokat serkentve anti-inflammatorikus hatást kifejteni. Ez megmagyarázza azt a megfigyelést, hogy a CBD ebben a dózisban, bár nem-szignifikáns módon, de képes a szórszálnövekedést is fokozni *in vitro* eredményeink szerint (21. ábra).

Részben ezen gyulladáscsökkentő hatás alapján a CBD-t bőrbetegségek közül a klinikai vizsgálatok irányelveit kimerítő módon először acnéban kezdték vizsgálni. A placebo-kontrollált, kettősvak, randomizált, 368 beteg bevonásával végzett vizsgálat (NCT03573518) eredményeit még nem ismerjük a disszertáció írásának idején, azonban az előzetes eredmények alapján a vizsgálati alanyok a napi kétszeri helyi kezelést jól tolerálták, bár a hatásosságról így sincs elérhető adat [148]. A CBD acné-ellenes hatása mögött részben a korábban munkacsoportunk által leírt, faggyúmirigyen megnyilvánuló komplex gyulladásgátló, antiproliferatív és szebosztatikus hatás állhat [107], ugyanakkor, tekintve, hogy az ORS réteg fokozott proliferációja is szerepet játszik a betegség kialakulásában, a CBD ORSK-kon kifejtett antiproliferatív és gyulladásgátló hatásai (25. és 27. ábrák) is hozzájárulhatnak a terápiás sikerességhez.

Jelenleg több más bőrbetegségben is vizsgálják a helyi CBD kezelés hatását; ezek többnyire korai fázisú vizsgálatok, kevés betegen és nem feltétlenül randomizáltak. Ezek között a lehetséges kórképek és állapotok között van az acnéra hajlamos arcbőr (NCT04045119). A gyermekek között gyakori, gyulladással kialakuló atópiás dermatitiszben zajló vizsgálat betegbevonásnál jár; placebo-kontrollált, randomizált, fázis 2 vizsgálatot terveznek összesen 200 betegen (NCT03824405). Emellett a pikkelysömörhöz társuló ízületi fájdalom és gyulladás (arthritis psoriatica) esetében *per os* CBD-vel terveznek fázis 2 klinikai vizsgálatot (NCT03693833, betegbevonás alatt). A topikális CBD kezelés iránt mutatott intenzív érdeklődés nem véletlen, ugyanis a gyulladásgátló hatású szerekre nagy szükség van a gyakori, részben immun-mediált bőrbetegségek kezelésére. Emellett a szisztémásan is biztonságosnak tűnő CBD kezelésnek helyi kezelés mellett még kisebb mértékű mellékhatás-profillal kell számolni.

Összességében humán *in vitro* és *ex vivo* kísérleteink során nyert eredményeink illeszkednek a CBD-ről eddig felhalmozott kutatási eredmények közé, amelyek alapján a CBD a bőrgyógyászatban továbbra is ígéretes hatóanyagjelölt. Továbbá, eredményeink közelebb visznek a CBD hatása mögött álló komplex mechanizmusok megismeréséhez is.

8. Összefoglalás

Jelen vizsgálataink során az endokannabinoid rendszer szőrtüszőben betöltött élettani szabályozó szerepéről szóló ismereteinket kívántuk bővíteni és egy új TRP csatornáról bizonyítottuk be, hogy szerepe lehet a hajciklus szabályozásában. Eredményeink szerint a TRPV4 ioncsatorna kifejeződik humán szőrtüszőben, főként a külső gyökérhüvely rétegben, melyben a keratinocitákon a TRPV4 Ca^{2+} -csatornaként funkcionál, és *in vitro* hőstimulussal is aktiválható. A TRPV4 kémiai stimulálása az keratinociták apoptózisához vezet, az intakt, humán szőrtüszők TRPV4 aktivációja pedig katagén fázist indukál, valamint gátolja a szőrnövekedést *ex vivo*.

Továbbá vizsgálatuk a cannabidiol humán szőrtüszőkre kifejtett hatásait és az azok háttérében álló receptorokat. Megállapítottuk, hogy az alkalmazott CBD kezelésnek koncentrációtól függően eltérő, ellentétes hatásai vannak. Alacsony koncentrációban alkalmazva elhanyagolható módon befolyásolja a hajciklust, a szőrnövekedést is csak inszignifikáns módon fokozza. Ráadásul, ebben az alacsony koncentrációban alkalmazva adenosin receptor mediált anti-inflammatórikus hatást fejt ki. Magas koncentrációban alkalmazva azonban a CBD képes a TRPV4 csatornákat aktiválni, amely dominálja szőrtüszőn kifejtett hatásait; így a CBD gátolja a szőrnövekedést, a mátrix keratinociták proliferációját és katagén morfológiát indukál. A szőrtüszőn a TRPV4-et leginkább kifejező külső gyökérhüvely keratinocitákon pedig apoptózis és nekrozis kialakulásához vezet a TRPV4 aktivációjával és Ca^{2+} -beáramlással.

Vizsgálataink amellet, hogy új információval szolgálnak az endokannabinoid-TRP rendszer, valamint a CBD hajbiológiai hatásairól, jól illeszkednek a korábban felhalmozott ismeretek közé. Eredményeink szerint a TRPV4 hozzájárulhat a TRPV1 és TRPV3, valamint a CB1 receptorok által a hajcikluson fenntartott pro-katagén „endokannabinoid-tónushoz”. Ezenfelül jellemeztük CBD összetett szőrbológiai hatásait, és azonosítottuk az ezeket mediáló célpontokat, úgymint az külső gyökérhüvely keratinocitákon kifejeződő TRPV4 és adenosin receptorokat.

9. Summary

In the current study we aimed to study the physiological role of the endocannabinoid system on hair follicles, and we introduced a novel hair cycle regulator of the TRP channel family. Our results suggest that human hair follicles express functionally active TRPV4 ion channel, particularly in the outer root sheath layer. In the outer root sheath keratinocytes, TRPV4 functions as a Ca^{2+} -channel that can be activated by thermal stimulus *in vitro*. Chemical TRPV4 activation leads to apoptosis on outer root sheath keratinocytes, whereas, when targeted on intact human hair follicles *ex vivo*, TRPV4 activation induces catagen transition along with suppressed hair growth.

Moreover, we tested the effects of CBD on human hair follicles and characterized the receptors that mediate its effect. We found that CBD-treatment exerted opposite effects depending on the concentration applied. We assume that CBD acts as an agonist on both TRPV4 and adenosine receptors that have opposite effects on the hair cycle. At low concentrations it has minor effects on the hair cycle and enhances hair growth, although statistically insignificantly. Additionally, also at low concentrations, CBD has anti-inflammatory effects mediated by adenosine receptor activation. However, at high concentrations, CBD activates TRPV4 channels, dominating its effects on hair follicles, leading to decreased hair growth and catagen morphology. On outer root sheath keratinocytes, the predominant TRPV4-expressing cells in the hair follicle, CBD induces apoptosis and necrosis mediated by TRPV4 activation and resultant Ca^{2+} -influx.

Our results are in line with earlier scientific reports, but they also deliver new data about the endocannabinoid-TRP system's function on hair follicles. We provided evidence that TRPV4 contributes to the TRPV1-TRPV3 and CB1 driven "pro-catagen endocannabinoid" tone on the hair cycle. Moreover, we characterized CBD's complex effect on hair biology and identified its cellular targets as TRPV4 and adenosine receptors on outer root sheath keratinocytes.

10. Hivatkozásjegyzék

1. Moll, R., M. Divo, and L. Langbein, *The human keratins: biology and pathology*. Histochem Cell Biol, 2008. **129**(6): p. 705-733.
2. Fuchs, E., *Keratins and the skin*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 123-153.
3. Quaresma, J.A.S., *Organization of the Skin Immune System and Compartmentalized Immune Responses in Infectious Diseases*. Clin Microbiol Rev, 2019. **32**(4).
4. Schneider, M.R., R. Schmidt-Ullrich, and R. Paus, *The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan*. Current Biology, 2009. **19**(3): p. R132-R142.
5. Owczarczyk-Saczonek, A., et al., *Therapeutic Potential of Stem Cells in Follicle Regeneration*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 1049641.
6. Gilliam, A.C., et al., *The human hair follicle: a reservoir of CD40+ B7-deficient Langerhans cells that repopulate epidermis after UVB exposure*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(4): p. 422-427.
7. Panteleyev, A.A., *Functional anatomy of the hair follicle: The Secondary Hair Germ*. Exp Dermatol, 2018. **27**(7): p. 701-720.
8. Lee, J. and T. Tumber, *Hairy tale of signaling in hair follicle development and cycling*. Semin Cell Dev Biol, 2012. **23**(8): p. 906-916.
9. Mort, R.L., I.J. Jackson, and E.E. Patton, *The melanocyte lineage in development and disease*. Development, 2015. **142**(7): p. 1387.
10. Clavel, C., et al., *Sox2 in the dermal papilla niche controls hair growth by fine-tuning BMP signaling in differentiating hair shaft progenitors*. Dev Cell, 2012. **23**(5): p. 981-994.
11. Millar, S.E., *Molecular mechanisms regulating hair follicle development*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(2): p. 216-225.
12. Chiang, C., et al., *Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis*. Dev Biol, 1999. **205**(1): p. 1-9.
13. Ellis, T., et al., *Overexpression of Sonic Hedgehog suppresses embryonic hair follicle morphogenesis*. Developmental Biology, 2003. **263**(2): p. 203-215.
14. Mesler, A.L., et al., *Hair Follicle Terminal Differentiation Is Orchestrated by Distinct Early and Late Matrix Progenitors*. Cell Rep, 2017. **19**(4): p. 809-821.
15. Paus, R. and G. Cotsarelis, *The biology of hair follicles*. N Engl J Med, 1999. **341**(7): p. 491-497.
16. Stenn, K.S. and R. Paus, *Controls of hair follicle cycling*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 449-494.
17. Oh, J.W., et al., *A Guide to Studying Human Hair Follicle Cycling In Vivo*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(1): p. 34-44.
18. Philpott, M.P., M.R. Green, and T. Kealey, *Human hair growth in vitro*. J Cell Sci, 1990. **97 (Pt 3)**: p. 463-471.
19. Langbein, L., et al., *The keratins of the human beard hair medulla: the riddle in the middle*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(1): p. 55-73.
20. Langbein, L. and J. Schweizer, *Keratins of the Human Hair Follicle*. 2005. **243**: p. 1-78.
21. Rogers, G.E., *Hair follicle differentiation and regulation*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(2-3): p. 163-170.
22. Rothnagel, J. and D. Roop, *Hair Follicle Companion Layer: Reacquainting an Old Friend*. The Journal of investigative dermatology, 1995. **104**: p. 42S-43S.
23. Ansell, D.M., et al., *Exploring the "hair growth-wound healing connection": anagen phase promotes wound re-epithelialization*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(2): p. 518-528.
24. Niderla-Bielinska, J., E. Jankowska-Steifer, and S. Moskalewski, *Keratinization of outer root sheath cells is prevented by contact with inner root sheath of rat hair follicles*. Arch Dermatol Res, 2009. **301**(5): p. 337-345.
25. Chermnykh, E.S., et al., *Dermal papilla cells induce keratinocyte tubulogenesis in culture*. Histochem Cell Biol, 2010. **133**(5): p. 567-576.

26. Seiberg, M., J. Marthinuss, and K.S. Stenn, *Changes in expression of apoptosis-associated genes in skin mark early catagen*. J Invest Dermatol, 1995. **104**(1): p. 78-82.
27. Soma, T., Y. Tsuji, and T. Hibino, *Involvement of transforming growth factor-beta2 in catagen induction during the human hair cycle*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(6): p. 993-997.
28. Lin, H.Y. and L.T. Yang, *Differential response of epithelial stem cell populations in hair follicles to TGF-beta signaling*. Dev Biol, 2013. **373**(2): p. 394-406.
29. Lei, M.X., C.M. Chuong, and R.B. Wideltz, *Tuning Wnt signals for more or fewer hairs*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(1): p. 7-9.
30. Krause, K. and K. Foitzik, *Biology of the hair follicle: the basics*. Semin Cutan Med Surg, 2006. **25**(1): p. 2-10.
31. Randall, V.A., *Androgens and human hair growth*. Clin Endocrinol (Oxf), 1994. **40**(4): p. 439-457.
32. Hendrix, S., et al., *A guide to assessing damage response pathways of the hair follicle: lessons from cyclophosphamide-induced alopecia in mice*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(1): p. 42-51.
33. Vidali, S., et al., *Hypothalamic-pituitary-thyroid axis hormones stimulate mitochondrial function and biogenesis in human hair follicles*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(1): p. 33-42.
34. Bodo, E., et al., *Human female hair follicles are a direct, nonclassical target for thyroid-stimulating hormone*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(5): p. 1126-1139.
35. Slominski, A., et al., *Corticotropin releasing hormone and the skin*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 2230-2248.
36. Ito, N., et al., *Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol*. FASEB J, 2005. **19**(10): p. 1332-1334.
37. Alam, M., et al., *Growth hormone operates as a neuroendocrine regulator of human hair growth ex vivo*. J Invest Dermatol, 2019.
38. Lutz, G., *Hair loss and hyperprolactinemia in women*. Dermatoendocrinol, 2012. **4**(1): p. 65-71.
39. *Prolactin and Its Receptor Are Expressed in Murine Hair Follicle Epithelium, Show Hair Cycle-Dependent Expression, and Induce Catagen*.
40. Ohnemus, U., et al., *The hair follicle as an estrogen target and source*. Endocr Rev, 2006. **27**(6): p. 677-706.
41. Oh, H.S. and R.C. Smart, *An estrogen receptor pathway regulates the telogen-anagen hair follicle transition and influences epidermal cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12525-12530.
42. Ohnemus, U., et al., *Hair cycle control by estrogens: catagen induction via estrogen receptor (ER)-alpha is checked by ER beta signaling*. Endocrinology, 2005. **146**(3): p. 1214-1225.
43. Hu, H.M., et al., *Estrogen leads to reversible hair cycle retardation through inducing premature catagen and maintaining telogen*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40124.
44. Conrad, F., et al., *Substantial sex-dependent differences in the response of human scalp hair follicles to estrogen stimulation in vitro advocate gender-tailored management of female versus male pattern balding*. J Invest Dermatol Symp Proc, 2005. **10**(3): p. 243-246.
45. Randall, V.A., et al., *The hair follicle: a paradoxical androgen target organ*. Horm Res, 2000. **54**(5-6): p. 243-250.
46. Inui, S., et al., *Androgen-inducible TGF-beta1 from balding dermal papilla cells inhibits epithelial cell growth: a clue to understand paradoxical effects of androgen on human hair growth*. FASEB J, 2002. **16**(14): p. 1967-1969.
47. Azzouni, F., et al., *The 5 alpha-reductase isozyme family: a review of basic biology and their role in human diseases*. Adv Urol, 2012. **2012**: p. 530121.
48. Hoffmann, R., et al., *Cytokines and growth factors influence hair growth in vitro. Possible implications for the pathogenesis and treatment of alopecia areata*. Arch Dermatol Res, 1996. **288**(3): p. 153-156.
49. Foitzik, K., et al., *The TGF-beta2 isoform is both a required and sufficient inducer of murine hair follicle morphogenesis*. Dev Biol, 1999. **212**(2): p. 278-289.

50. Hibino, T. and T. Nishiyama, *Role of TGF-beta2 in the human hair cycle*. J Dermatol Sci, 2004. **35**(1): p. 9-18.
51. Inoue, K., et al., *TGF-beta is specifically expressed in human dermal papilla cells and modulates hair folliculogenesis*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(11-12): p. 4643-4656.
52. Li, J., et al., *Exogenous IGF-1 promotes hair growth by stimulating cell proliferation and down regulating TGF-beta1 in C57BL/6 mice in vivo*. Growth Horm IGF Res, 2014. **24**(2-3): p. 89-94.
53. Inui, S., et al., *Identification of androgen-inducible TGF-beta1 derived from dermal papilla cells as a key mediator in androgenetic alopecia*. J Invest Dermatol Symp Proc, 2003. **8**(1): p. 69-71.
54. Foitzik, K., et al., *Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 in vivo*. FASEB J, 2000. **14**(5): p. 752-760.
55. Shin, H., et al., *Induction of transforming growth factor-beta 1 by androgen is mediated by reactive oxygen species in hair follicle dermal papilla cells*. BMB Reports, 2013. **46**(9): p. 460-464.
56. Green, M.R. and J.R. Couchman, *Distribution of epidermal growth factor receptors in rat tissues during embryonic skin development, hair formation, and the adult hair growth cycle*. J Invest Dermatol, 1984. **83**(2): p. 118-123.
57. Philpott, M.P. and T. Kealey, *Effects of EGF on the morphology and patterns of DNA synthesis in isolated human hair follicles*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(2): p. 186-191.
58. Heymann, W.R., *Epidermal growth factor receptor inhibitors and hair*. J Am Acad Dermatol, 2008. **58**(4): p. 642-643.
59. Ota, Y., et al., *Fibroblast growth factor 5 inhibits hair growth by blocking dermal papilla cell activation*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(1): p. 169-176.
60. Suzuki, S., et al., *Dual-mode regulation of hair growth cycle by two Fgf-5 gene products*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(3): p. 456-463.
61. Higgins, C.A., et al., *FGF5 is a crucial regulator of hair length in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(29): p. 10648-10653.
62. Vandenamee, S.I., et al., *Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor 18 in hair follicles of healthy beagle dogs*. Vet Dermatol, 2011. **22**(5): p. 423-428.
63. Nakatake, Y., et al., *Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-22, preferentially expressed in the inner root sheath of the hair follicle*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1517**(3): p. 460-463.
64. Kimura-Ueki, M., et al., *Hair cycle resting phase is regulated by cyclic epithelial FGF18 signaling*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(5): p. 1338-1345.
65. Lin, W.H., et al., *Fibroblast growth factors stimulate hair growth through beta-catenin and Shh expression in C57BL/6 mice*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 730139.
66. Gay, D., et al., *Fgf9 from dermal gamma delta T cells induces hair follicle neogenesis after wounding*. Nat Med, 2013. **19**(7): p. 916-923.
67. Jang, J.H., *Stimulation of human hair growth by the recombinant human keratinocyte growth factor-2 (KGF-2)*. Biotechnol Lett, 2005. **27**(11): p. 749-752.
68. Lee, Y.R., et al., *Hepatocyte growth factor (HGF) activator expressed in hair follicles is involved in in vitro HGF-dependent hair follicle elongation*. Journal of Dermatological Science, 2001. **25**(2): p. 156-163.
69. Rudman, S.M., et al., *The role of IGF-I in human skin and its appendages: morphogen as well as mitogen?* J Invest Dermatol, 1997. **109**(6): p. 770-777.
70. Ahn, S.Y., et al., *Effect of IGF-I on Hair Growth Is Related to the Anti-Apoptotic Effect of IGF-I and Up-Regulation of PDGF-A and PDGF-B*. Ann Dermatol, 2012. **24**(1): p. 26-31.
71. Hwang, K.A., et al., *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*. Int J Mol Med, 2012. **29**(2): p. 195-201.
72. Iino, M., et al., *Adenosine stimulates fibroblast growth factor-7 gene expression via adenosine A2b receptor signaling in dermal papilla cells*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(6): p. 1318-1325.

73. Lisztes, E., et al., *Adenosine Promotes Human Hair Growth and Inhibits Catagen Transition In Vitro: Role of the Outer Root Sheath Keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2020. **140**(5): p. 1085-1088 e1086.
74. Hoffmann, R., et al., *Interleukin-1beta-induced inhibition of hair growth in vitro is mediated by cyclic AMP*. J Invest Dermatol, 1997. **108**(1): p. 40-42.
75. Harmon, C.S. and T.D. Nevins, *Evidence that activation of protein kinase A inhibits human hair follicle growth and hair fibre production in organ culture and DNA synthesis in human and mouse hair follicle organ culture*. Br J Dermatol, 1997. **136**(6): p. 853-858.
76. Li, M., et al., *Minoxidil-induced hair growth is mediated by adenosine in cultured dermal papilla cells: possible involvement of sulfonylurea receptor 2B as a target of minoxidil*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(6): p. 1594-1600.
77. Christoph, T., et al., *The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege*. Br J Dermatol, 2000. **142**(5): p. 862-873.
78. Paus, R., et al., *The hair follicle and immune privilege*. J Invest Dermatol Symp Proc, 2003. **8**(2): p. 188-194.
79. Abbas, A.K., A.H.H. Lichtman, and S. Pillai, *Basic Immunology E-Book: Functions and Disorders of the Immune System*. 2015: Elsevier Health Sciences.
80. Miller, L.S., *Toll-Like Receptors in Skin*. Advances in Dermatology, 2008. **24**: p. 71-87.
81. Selleri, S., et al., *Toll-like receptor agonists regulate beta-defensin 2 release in hair follicle*. Br J Dermatol, 2007. **156**(6): p. 1172-1177.
82. Shin, J.M., et al., *Double-stranded RNA induces inflammation via the NF-kappaB pathway and inflammasome activation in the outer root sheath cells of hair follicles*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 44127.
83. Nelson, A.M., et al., *dsRNA Released by Tissue Damage Activates TLR3 to Drive Skin Regeneration*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(2): p. 139-151.
84. Krieger, K., et al., *NF-kappaB Participates in Mouse Hair Cycle Control and Plays Distinct Roles in the Various Pelage Hair Follicle Types*. J Invest Dermatol, 2018. **138**(2): p. 256-264.
85. Kloeppe, J.E., et al., *NF-kappaB activity is required for anagen maintenance in human hair follicles in vitro*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(7): p. 2036-2038.
86. Philpott, M.P., et al., *Effects of interleukins, colony-stimulating factor and tumour necrosis factor on human hair follicle growth in vitro: a possible role for interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha in alopecia areata*. British Journal of Dermatology, 1996. **135**(6): p. 942-948.
87. Ito, T., et al., *Interferon-gamma is a potent inducer of catagen-like changes in cultured human anagen hair follicles*. Br J Dermatol, 2005. **152**(4): p. 623-631.
88. Kim, C.D., et al., *Interferon Beta secreted from human hair dermal papilla cells inhibits the growth of outer root sheath cells cultured in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(3): p. 1133-1138.
89. Inoue, A., et al., *Excessive hair growth around local beta-interferon injection sites for malignant melanoma*. J Dermatol, 2016. **43**(4): p. 453-454.
90. Ribeiro, L.B.P., et al., *Alopecia secondary to anti-tumor necrosis factor-alpha therapy*. Anais brasileiros de dermatologia, 2015. **90**(2): p. 232-235.
91. Xing, L., et al., *Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition*. Nat Med, 2014. **20**(9): p. 1043-1049.
92. Ito, T., et al., *Collapse and Restoration of MHC Class-I-Dependent Immune Privilege*. The American Journal of Pathology, 2004. **164**(2): p. 623-634.
93. Clapham, D.E., *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*, in *Encyclopedia of Neuroscience*, L.R. Squire, Editor. 2009, Academic Press: Oxford. p. 1109-1133.
94. Clapham, D.E., *TRP channels as cellular sensors*. Nature, 2003. **426**(6966): p. 517-524.
95. Minke, B., C.-F. Wu, and W.L. Pak, *Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in Drosophila mutant*. Nature, 1975. **258**(5530): p. 84-87.

96. Mundt, N., M. Spehr, and P.V. Lishko, *TRPV4 is the temperature-sensitive ion channel of human sperm*. eLife, 2018. **7**: p. e35853.
97. Deng, Z., et al., *Cryo-EM and X-ray structures of TRPV4 reveal insight into ion permeation and gating mechanisms*. Nat Struct Mol Biol, 2018. **25**(3): p. 252-260.
98. White, J.P., et al., *TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra*. Physiol Rev, 2016. **96**(3): p. 911-973.
99. Chung, M.K., H. Lee, and M.J. Caterina, *Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 32037-32046.
100. Li, M., et al., *Transient receptor potential vanilloid 4 is a critical mediator in LPS mediated inflammation by mediating calcineurin/NFATc3 signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2019. **513**(4): p. 1005-1012.
101. Thorneloe, K.S., et al., *N-((1S)-1-[[4-((2S)-2-[[[(2,4-dichlorophenyl)sulfonyl]amino]-3-hydroxypropanoyl]-1-piperazinyl]carbonyl]-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **326**(2): p. 432-442.
102. Sokabe, T. and M. Tominaga, *The TRPV4 cation channel: A molecule linking skin temperature and barrier function*. Commun Integr Biol, 2010. **3**(6): p. 619-621.
103. Kida, N., et al., *Importance of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in epidermal barrier function in human skin keratinocytes*. Pflugers Arch, 2012. **463**(5): p. 715-725.
104. Akazawa, Y., et al., *Activation of TRPV4 strengthens the tight-junction barrier in human epidermal keratinocytes*. Skin Pharmacol Physiol, 2013. **26**(1): p. 15-21.
105. Denda, M., et al., *Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 654-659.
106. Fujii, N., et al., *Evidence for TRPV4 channel induced skin vasodilatation through NOS, COX, and KCa channel mechanisms with no effect on sweat rate in humans*. Eur J Pharmacol, 2019. **858**: p. 172462.
107. Olah, A., et al., *Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes*. J Clin Invest, 2014. **124**(9): p. 3713-3724.
108. Sennett, R., et al., *An Integrated Transcriptome Atlas of Embryonic Hair Follicle Progenitors, Their Niche, and the Developing Skin*. Dev Cell, 2015. **34**(5): p. 577-591.
109. Mechoulam, R., et al., *Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond*. Nat Rev Neurosci, 2014. **15**(11): p. 757-764.
110. Maccarrone, M., et al., *Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC*. Trends Pharmacol Sci, 2015. **36**(5): p. 277-296.
111. Bíró, T., et al., *The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities*. Trends in pharmacological sciences, 2009. **30**(8): p. 411-420.
112. Toth, K.F., et al., *Cannabinoid Signaling in the Skin: Therapeutic Potential of the "C(ut)annabinoid" System*. Molecules, 2019. **24**(5).
113. Telek, A., et al., *Inhibition of human hair follicle growth by endo- and exocannabinoids*. FASEB J, 2007. **21**(13): p. 3534-3541.
114. Biro, T., et al., *Hair cycle control by vanilloid receptor-1 (TRPV1): evidence from TRPV1 knockout mice*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(8): p. 1909-1912.
115. Bodo, E., et al., *A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control*. Am J Pathol, 2005. **166**(4): p. 985-998.
116. Harada, N., et al., *Administration of capsaicin and isoflavone promotes hair growth by increasing insulin-like growth factor-I production in mice and in humans with alopecia*. Growth Horm IGF Res, 2007. **17**(5): p. 408-415.
117. Borbiro, I., et al., *Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(8): p. 1605-1614.

118. Lin, Z., et al., *Exome sequencing reveals mutations in TRPV3 as a cause of Olmsted syndrome*. Am J Hum Genet, 2012. **90**(3): p. 558-564.
119. Mandadi, S., et al., *TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP*. Pflugers Arch, 2009. **458**(6): p. 1093-1102.
120. Larkin, C., et al., *Novel insights into the TRPV3-mediated itch in atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2020.
121. Szollosi, A.G., et al., *Activation of TRPV3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2018. **138**(2): p. 365-374.
122. Lynch, Vincent J., et al., *Elephantid Genomes Reveal the Molecular Bases of Woolly Mammoth Adaptations to the Arctic*. Cell Reports, 2015. **12**(2): p. 217-228.
123. Szanto, M., et al., *Activation of TRPV3 Inhibits Lipogenesis and Stimulates Production of Inflammatory Mediators in Human Sebocytes-A Putative Contributor to Dry Skin Dermatoses*. J Invest Dermatol, 2019. **139**(1): p. 250-253.
124. Solymosi, K. and A. Kofalvi, *Cannabis: A Treasure Trove or Pandora's Box? Mini Rev Med Chem*, 2017. **17**(13): p. 1223-1291.
125. Zuardi, A.W., et al., *Cannabidiol monotherapy for treatment-resistant schizophrenia*. J Psychopharmacol, 2006. **20**(5): p. 683-686.
126. Millar, S.A., et al., *A Systematic Review on the Pharmacokinetics of Cannabidiol in Humans*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 1365.
127. Bisogno, T., et al., *Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(4): p. 845-852.
128. Ibeas Bih, C., et al., *Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders*. Neurotherapeutics, 2015. **12**(4): p. 699-730.
129. Syed, Y.Y., K. McKeage, and L.J. Scott, *Delta-9-tetrahydrocannabinol/cannabidiol (Sativex(R)): a review of its use in patients with moderate to severe spasticity due to multiple sclerosis*. Drugs, 2014. **74**(5): p. 563-578.
130. Mecha, M., et al., *Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A2A receptors*. Neurobiol Dis, 2013. **59**: p. 141-150.
131. Iseger, T.A. and M.G. Bossong, *A systematic review of the antipsychotic properties of cannabidiol in humans*. Schizophr Res, 2015. **162**(1-3): p. 153-161.
132. Rohleder, C., et al., *Cannabidiol as a Potential New Type of an Antipsychotic. A Critical Review of the Evidence*. Front Pharmacol, 2016. **7**: p. 422.
133. Lattanzi, S., et al., *Efficacy and Safety of Adjunctive Cannabidiol in Patients with Lennox–Gastaut Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis*. CNS Drugs, 2018. **32**(10): p. 905-916.
134. Burstein, S., *Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation*. Bioorg Med Chem, 2015. **23**(7): p. 1377-1385.
135. Sangiovanni, E., et al., *Cannabis sativa L. extract and cannabidiol inhibit in vitro mediators of skin inflammation and wound injury*. Phytother Res, 2019. **33**(8): p. 2083-2093.
136. Petrosino, S., et al., *Anti-inflammatory Properties of Cannabidiol, a Nonpsychotropic Cannabinoid, in Experimental Allergic Contact Dermatitis*. J Pharmacol Exp Ther, 2018. **365**(3): p. 652-663.
137. Stinchcomb, A.L., et al., *Human skin permeation of Delta8-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol*. J Pharm Pharmacol, 2004. **56**(3): p. 291-297.
138. Jastrzab, A., A. Gegotek, and E. Skrzydlewska, *Cannabidiol Regulates the Expression of Keratinocyte Proteins Involved in the Inflammation Process through Transcriptional Regulation*. Cells, 2019. **8**(8).
139. Szabo, I.L., et al., *Heme Oxygenase and the Skin in Health and Disease*. Curr Pharm Des, 2018. **24**(20): p. 2303-2310.

140. Casares, L., et al., *Cannabidiol induces antioxidant pathways in keratinocytes by targeting BACH1*. Redox Biol, 2019. **28**: p. 101321.
141. Gegotek, A., et al., *The Differences in the Proteome Profile of Cannabidiol-Treated Skin Fibroblasts following UVA or UVB Irradiation in 2D and 3D Cell Cultures*. Cells, 2019. **8**(9).
142. Jhawar, N., et al., *The growing trend of cannabidiol in skincare products*. Clin Dermatol, 2019. **37**(3): p. 279-281.
143. Chelliah, M.P., et al., *Self-initiated use of topical cannabidiol oil for epidermolysis bullosa*. Pediatr Dermatol, 2018. **35**(4): p. e224-e227.
144. Schrader, N.H.B., et al., *Combined tetrahydrocannabinol and cannabidiol to treat pain in epidermolysis bullosa: a report of three cases*. Br J Dermatol, 2019. **180**(4): p. 922-924.
145. Rajesh, M., et al., *Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H610-619.
146. Gigli, S., et al., *Cannabidiol restores intestinal barrier dysfunction and inhibits the apoptotic process induced by Clostridium difficile toxin A in Caco-2 cells*. United European Gastroenterol J, 2017. **5**(8): p. 1108-1115.
147. Kircik, L.H., *What's new in the management of acne vulgaris*. Cutis, 2019. **104**(1): p. 48-52.
148. Spleman, L., et al., *1061 The safety of topical cannabidiol (CBD) for the treatment of acne*. Journal of Investigative Dermatology, 2018. **138**(5, Supplement): p. S180.
149. Limat, A. and F.K. Noser, *Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root sheath of human scalp hair follicles*. J Invest Dermatol, 1986. **87**(4): p. 485-488.
150. Limat, A. and T. Hunziker, *Cultivation of Keratinocytes from the Outer Root Sheath of Human Hair Follicles*, in *Human Cell Culture Protocols*, G.E. Jones, Editor. 1996, Humana Press: Totowa, NJ. p. 21-31.
151. Kloepper, J.E., et al., *Methods in hair research: how to objectively distinguish between anagen and catagen in human hair follicle organ culture*. Exp Dermatol, 2010. **19**(3): p. 305-312.
152. Reubish, D., et al., *Functional assessment of temperature-gated ion-channel activity using a real-time PCR machine*. Biotechniques, 2009. **47**(3): p. iii-ix.
153. Vriens, J., et al., *TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat*. Neuron, 2011. **70**(3): p. 482-494.
154. Hermsmeier, M., et al., *Characterization of human cutaneous tissue autofluorescence: implications in topical drug delivery studies with fluorescence microscopy*. Biomed Opt Express, 2018. **9**(11): p. 5400-5418.
155. Hellwig, N., et al., *Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 917-928.
156. Voets, T., et al., *The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels*. Nature, 2004. **430**(7001): p. 748-754.
157. Akiyama, T., et al., *Involvement of TRPV4 in Serotonin-Evoked Scratching*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(1): p. 154-160.
158. Suzuki, M., et al., *Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in mouse skin*. Neurosci Lett, 2003. **353**(3): p. 189-192.
159. Nangia, J., et al., *Effect of a Scalp Cooling Device on Alopecia in Women Undergoing Chemotherapy for Breast Cancer: The SCALP Randomized Clinical Trial*. Jama, 2017. **317**(6): p. 596-605.
160. Goldberg, D.J., *Current trends in intense pulsed light*. The Journal of clinical and aesthetic dermatology, 2012. **5**(6): p. 45-53.
161. Chen, X., N. Alessandri-Haber, and J.D. Levine, *Marked attenuation of inflammatory mediator-induced C-fiber sensitization for mechanical and hypotonic stimuli in TRPV4-/- mice*. Molecular pain, 2007. **3**: p. 31-31.
162. Alessandri-Haber, N., et al., *TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator*. Pain, 2005. **118**(1-2): p. 70-79.

163. Peters, E.M.J., et al., *Neurogenic Inflammation in Stress-Induced Termination of Murine Hair Growth Is Promoted by Nerve Growth Factor*. *The American Journal of Pathology*, 2004. **165**(1): p. 259-271.
164. Harmon, C.S. and T.D. Nevins, *IL-1 alpha inhibits human hair follicle growth and hair fiber production in whole-organ cultures*. *Lymphokine and cytokine research*, 1993. **12**(4): p. 197-203.
165. Olivan-Viguera, A., et al., *Pharmacological activation of TRPV4 produces immediate cell damage and induction of apoptosis in human melanoma cells and HaCaT keratinocytes*. *PLOS ONE*, 2018. **13**(1): p. e0190307.

11. Tárgyszavak

Bőr, cannabidiol, CBD, endokannabinoid rendszer, fitokannabinoid, hajnövekedés, szórtüsző, TRP csatorna, TRPV4

12. Key words

Cannabidiol, CBD, endocannabinoid system, hair growth, hair follicle, phytocannabinoid, skin, TRP channel, TRPV4

13. Köszönetnyilvánítás

A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Élettani Intézetében eltöltött PhD-hallgatói munkám (illetve az azt megelőző TDK munkám) során közvetlen munkatársaim támogatásáért hálával tartozom. Elsőként témavezetőmnek, Prof. Dr. Bíró Tamásnak, illetve az intézet vezetőjének, Prof. Dr. Csernoch Lászlónak, akik lehetővé tették, hogy a rendkívül színvonalas Élettani Intézet Molekuláris Sejtélettani laboratóriumában folytathassam doktori fokozat megszerzéséhez szükséges munkám.

A munkacsoportunk szenior tagjai, Dr. Szöllősi Attila Gábor, Dr. Oláh Attila, Dr. Herczeg-Lisztes Erika, Dr. Zákány Nóra, Dr. Ambrus Lídia és Dr. Tóth István Balázs mindig segítőkészek voltak a felmerül problémák megoldásában és nagy tárgyi és gyakorlati tudásukkal példát is mutattak. PhD-hallgató társaimmal, Dr. Vasas Nikolettal, Dr. Markovics Arnolddal, Dr. Balogh Norberttel, Angyal Ágnessel tartottuk egymásban a lelkesedést és számíthattunk egymás segítségére a mindennapi munka során.

A laboratóriumi munka során hatalmas segítség volt Dr. Varga Attiláné Ibcsike és Hollósi Erika asszisztensek munkája. A csoporthoz csatlakozó szakkörös hallgatók lelkes hozzáállása és szakmai hozzájárulása miatt köszönettel tartozom Dr. Yair Dan Meirynek és Dr. Einav Shitritnek is.

A Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Bőrgyógyászati Klinika részéről Prof. Dr. Szegedi Andreának, Dr. Emri Gabriellának és Prof. Dr. Remenyik Évának hálás vagyok a szakmai segítségért és biztatásáért.

Külföldi kollaborációs partnereinknek, Prof. Dr. Ralf Paus-nak, Dr. Iain Haslam-nek, valamint Prof. Dr. Martin Steinhoffnak és Dr. Ian McDonald-nak a tartalmas és eredményes közös munkáért és sok lehetőségért tartozom hálával.

És természetesen hálás vagyok a családomnak, főként feleségemnek, Dr. Kenyeres Annának támogatásáért és kitartásáért.

14. Függelék – Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/321/2019,PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabó Imre Lőrinc
Neptun kód: BHLFWC
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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)
2. **Szabó, I. L.**, Herczeg-Lisztes, E., Szegedi, A., Nemes, B. Á., Paus, R., Bíró, T., Szöllősi, 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

További közlemények

3. 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)
4. Steinhoff, M., Oaklander, A. L., **Szabó, I. L.**, Stander, S., Schmelz, M.: Neuropathic itch.
Pain. 160 (Suppl.), S11-S16, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001551>
IF: 6.029 (2018)





5. Szöllősi, A. G., McDonald, I., **Szabó, I. L.**, Meng, J., Bogaard, E. v. d., Steinhoff, M.: TLR3 in Chronic Human Itch: a Keratinocyte-Associated Mechanism of Peripheral Itch Sensitization. *J. Invest. Dermatol. [Epub ahead of print]*, 1-35, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2019.04.018>
IF: 6.29 (2018)
6. Steinhoff, M., Schmelz, M., **Szabó, I. L.**, Oaklander, A. L.: Clinical presentation, management, and pathophysiology of neuropathic itch. *Lancet Neurol.* 17 (8), 709-720, 2018.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30217-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30217-5)
IF: 28.755
7. **Szabó, I. L.**, Kenyeres, A., Szegedi, A., Szöllősi, A. G.: Heme Oxygenase and the Skin in Health and Disease. *Curr. Pharm. Design.* 24 (20), 2303-2310, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1381612824666180717155953>
IF: 2.412
8. Steuer-Hajdu, K., Sawhney, I., **Szabó, I. L.**, Irinyi, B., Herédi, E., Úr, F., Remenyik, É., Szegedi, A., Gáspár, K.: Atópiás dermatitis klinikai alcsoportjai. *Bőrgyógyász. Venerol. Szle.* 93 (3), 102-107, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2017.93.3.3>
9. **Szabó, I. L.**, Ócsai, H., Kiss, B. K., Kékedi, K., Kósa, P., Várvölgyi, T., Kun, E., Kenyeres, A., Szöllősi, A. G., Remenyik, É., Emri, G.: BRAF-mutáció pozitív áttétes melanoma célzott gyógyszeres kezelése. *Bőrgyógyász. Venerol. Szle.* 93 (4), 160-167, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2017.93.4.4>
10. Haslam, I. S., Jadkauskaite, L., **Szabó, I. L.**, Staeger, S., Hesebeck-Brinckmann, J., Jenkins, G., Bhogal, R. K., Lim, F. L., Farjo, N., Farjo, B., Bíró, T., Schäfer, M., Paus, R.: Oxidative Damage Control in a Human (Mini-) Organ: Nrf2 Activation Protects against Oxidative Stress-Induced Hair Growth Inhibition. *J. Invest. Dermatol.* 137 (2), 295-304, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.08.035>
IF: 6.448

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 68,804

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 12,58

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

Debrecen, 2019.09.16.

