

DEBRECENI EGYETEM, OEC, ÉLETTANI INTÉZET

**Jelátviteli mechanizmusok szerepe a bőr biológiai
folyamatainak szabályozásában**

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Írta:
Dr. Telek Andrea

Témavezető:
Dr. Bíró Tamás
Dr. Csernoch László



**DEBRECEN
2007**

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	4
<i>A bőr funkcionális anatómiája; a HaCaT keratinocyták</i>	4
<i>A szőrtüsző</i>	8
<i>A szőrtüsző funkcionális anatómiája</i>	9
<i>A hajciklus</i>	12
<i>A hajciklus szabályozása</i>	15
<i>A vanilloid (capsaicin) receptor-1 (TRPV1), a molekula szerkezete</i>	17
<i>A TRPV1 exogén és endogén vanilloidok segítségével aktiválható</i>	19
<i>A TRPV1 expresszióját először neuronális szöveteken írták le</i>	21
<i>A TRPV1 nem csak neuronális szöveteken fejeződik ki</i>	21
<i>A legújabb felfedezés: a TRPV1 kifejeződik humán bőrben is</i>	22
<i>A TRPV1 funkcionális szerepe a szőrtüszőben - előzetes eredmények</i>	23
<i>A cannabinoidok</i>	24
<i>A cannabinoid receptorok</i>	25
<i>A cannabinoid receptorok előfordulása a szervezetben</i>	26
<i>A cannabinoid rendszer a bőrben</i>	28
<i>Mechanikai ingerek hatása a bőrre; mechanoszenzitív csatornák</i>	29
PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	32
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
<i>Humán szőrtüszők izolálása és tenyésztése</i>	33
<i>HaCaT keratinocyták tenyésztése</i>	34
<i>A TRPV1 knockout egér</i>	34
<i>Szövetteni és morfológiai vizsgálatok</i>	35
<i>Immunhisztó- és -citokémia</i>	35
<i>Masson-Fontana festés</i>	38
<i>Kvantitatív PCR (Q-PCR)</i>	38
<i>A folliculusok endogén cannabinoid tartalmának meghatározása</i>	39
<i>Kvalitatív és kvantitatív hisztomorfometria</i>	39
<i>Alkalmazott oldatok</i>	40
<i>Patch clamp és konvencionális mikroelektródás mérés</i>	41
<i>Western (immuno) blot analízis</i>	42
<i>Intracelluláris kalciummérés</i>	43
<i>Az élő sejtszám vizsgálata</i>	44
<i>Statisztikai elemzések</i>	44
EREDMÉNYEK	45
A TRPV1 szerepe a hajciklus szabályozásában; a hajciklus fázisainak időbeli változása TRPV1 knockout egerekben	45
<i>A TRPV1 expressziója hajciklus-függő változást mutat egérben</i>	45
<i>A TRPV1 hiánya késlelteti a folliculusok katagén és telogén transzformációját egérben</i>	47

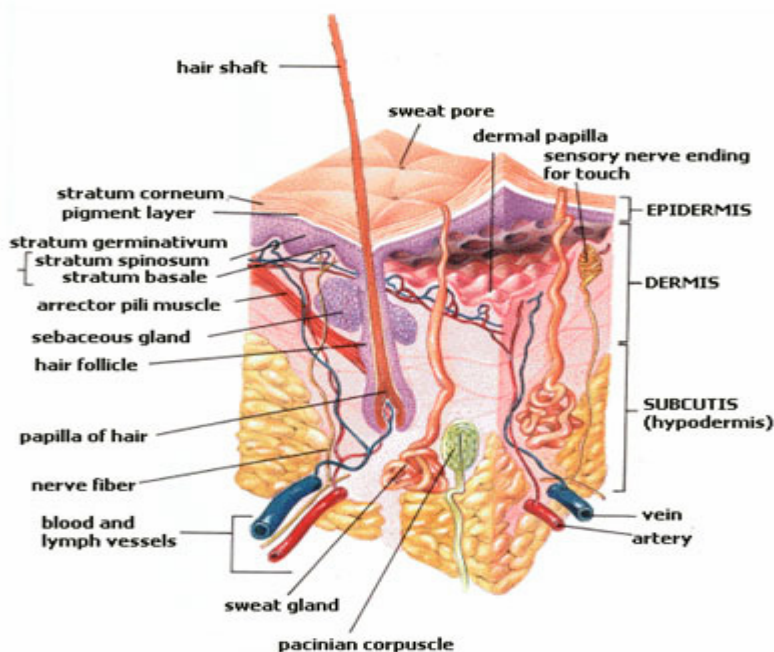
Az AEA szerepe a humán hajfollikulus biológiai folyamatainak Szabályozásában	49
<i>A CB1 mind protein, mind mRNS szinten kifejeződik a humán follikulusban</i>	49
<i>A CB1 expresszió katagén fázisban fokozódik</i>	50
<i>Az AEA dózisfüggően gátolja a follikulusok hossznövekedését</i>	51
<i>Az AEA gátolja a mátrix keratinocyták proliferációját és apoptosist indukál</i>	53
<i>Az AEA katagén transzformációt indukál a follikulusokban</i>	54
<i>A humán follikulus endogén AEA-t tartalmaz</i>	55
<i>A Δ^9-THC dózisfüggően gátolja a hajszál elongációját</i>	55
<i>A Δ^9-THC gátolja a mátrix keratinocyták proliferációját és apoptosist indukál</i>	56
<i>A Δ^9-THC katagén transzformációt indukál a follikulusokban</i>	57
<i>Az AEA és a capsaicin együttes alkalmazása szinergista módon csökkenti a hajszál elongációját</i>	59
<i>Az AEA és a capsaicin együttes alkalmazása szinergista módon gátolja a mátrix keratinocyták proliferációját és apoptosist indukál</i>	61
Stretch-aktivált csatornák szerepe a keratinocyták proliferációjában és membránpotenciáljának szabályozásában	62
<i>Hypotoniás stressz alkalmazása lecsökkenti a keratinocyták nyugalmi membránpotenciálját</i>	62
<i>A PMA előkezelés fokozza a hypotoniás oldat által kiváltott membránáramot</i>	64
<i>A stressz- indukálta áram nagyságát a kloridion elvonása csökkenti, ugyanakkor az extracelluláris Ca^{2+} pufferelése nem változtatja meg jelentősen</i>	67
<i>Hypotoniás oldat alkalmazása [Ca^{2+}]_i –emelkedést okoz kontroll valamint PMA előkezelt keratinocytákon</i>	68
<i>A tenyésztőoldat szérumszertartalmának, valamint tonicitásának változása befolyásolja a HaCaT keratinocyták proliferációját és differenciálódását</i>	70
MEGBESZÉLÉS	73
<i>A hajciklus időbeli eltolódása TRPV1 knockout egerekben</i>	73
<i>A cannabinoid rendszer szerepe a humán szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában</i>	74
<i>A mechanoszenzitív csatornák aktivációjának hatása keratinocyták elektrofiziológiai sajátosságaira, proliferációjára és differenciálódására</i>	76
ÖSSZEFOGLALÁS	79
IRODALOMJEGYZÉK	80
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	97
KÖZLEMÉNYEK	98

BEVEZETÉS

A bőr funkcionális anatómiája; a HaCaT keratinocyták

Egészen a múlt század közepéig tartotta magát az az elképzelés, hogy a bőr, mint a szervezet elsődleges védelmi vonala, „csupán” a szervezet mechanikai, termikus, valamint fényingerekkel szembeni védelmét biztosítja. A részletesebb kutatások azonban rávilágítottak arra, hogy a bőr emellett számos más biológiai folyamat szabályozásában is részt vesz, így napjainkban testünk legnagyobb tömegű szerve intenzív kutatások tárgyát képezi.

Ahhoz, hogy a bőr sokrétű funkcióját megértsük, ismernünk kell e szerv szövet-és fejlődéstanát. A **bőr (cutis)** anatómiailag három részre különíthető el: *epidermis*, *dermis*, valamint *tela subcutanea* (**1. ábra**). Ezek további rétegekre bonthatók, melyek mind fejlődéstanilag, mind funkcionálisan eltérnek egymástól.



1. ábra: A humán bőr felépítése

http://training.seer.cancer.gov/ss_module14_melanoma/unit02_sec01_anatomy.html

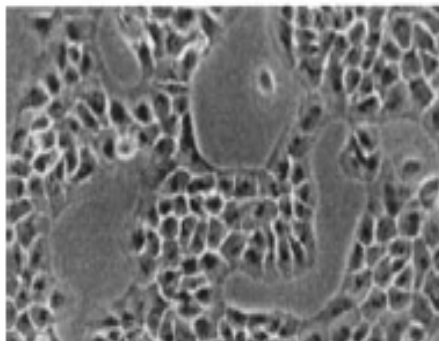
1. A külvilággal közvetlenül a hám (epidermis) érintkezik, melyet további rétegekre különíthetünk el (Rácz és mtsai, 1994; Szentágothai és Réthelyi, 2002):

- stratum basale
- stratum spinosum
- stratum granulosum
- stratum lucidum
- stratum corneum

A hám sejteinek 90%-át ectodermalis eredetű *keratinocyták* alkotják, melyek legfontosabb funkciója a keratin termelése, ezzel védelmet biztosítva a külvilág ártalmas ingereivel szemben. A stratum basale folyamatosan proliferáló sejtek alkotják, melyek az utánpótlást biztosítják a többi réteg számára. A keratinképződés a stratum spinosum felső sejtjeiben kezdődik el és az ezt követő sejtjeiben folytatódik. A keratinizáció végeredményeképpen a bőrt a legfelső, elhalt sejteket tartalmazó réteg, a stratum corneum borítja, melyet bevon a kémiaiailag igen ellenálló fehérje, a lágy típusú keratin. A szintén ectodermalis eredetű *Merkel-sejtek* lassan adaptálódó felületi proprioceptorok, a basalis réteg sejtjei között találhatóak. A hám ezen kívül tartalmaz *crista neuralis* eredetű *melanocytákat*, melyek feladata a napfénytől való védelem (melanin pigment termelése). A hám negyedik sejtjele a *Langerhans-sejt*, amely mesodermalis eredetű és a monocita-macrophag rendszerhez tartozik. Feladata a bőrön keresztüli szenzibilizáció biztosítása, valamint a károsodott hámsejtek eltakarításában is részt vesz. A felsorolt sejteken kívül ideiglenesen a hámba vándorolhatnak *lymphocyták*.

Bár a keratinocyták biológiai funkciói jól vizsgálhatók primer tenyészetben, a Normál Humán Epidermális Keratinocyták (NHEK) csupán néhány passzálást élnek túl.

Ezért számos próbálkozás történt olyan sejtvonal előállítására, amely a lehető legjobban megközelíti a humán keratinocyták biológiai tulajdonságait, mégis korlátlanul fenntartható és szaporítható. Manapság erre a célra az egyik leggyakrabban a HaCaT sejtvonalat használják (**2. ábra**). A név a Human Adult skin keratinocytes, low Ca²⁺, elevated Temperature rövidítéséből (HaCaT) ered. A sejtvonalat Boukamp és munkatársai 1988-ban hozták létre (Boukamp és mtsai, 1988). A sejteket egy 62 éves, melanómában szenvedő férfibeteg hátbőrének azon részéből izolálták, amely, bár a tumor melletti részből származott, de bizonyítottan nem szenvedett malignus átalakulást. A sejteket alacsony extracelluláris Ca²⁺ -koncentráció mellett (0,2 mM), magas hőmérsékleten (38,5 °C) tartották.



2. ábra: HaCaT keratinocyták
(Boukamp és mtsai, 1998)

A sejteket cytogenetikai módszerekkel, DNS ujjlenyomattal, egerekbe történő beoltással, immuncitokémiai és gélelektroforézis technikával is ellenőrizték. A HaCaT sejtek genetikailag különböznek az egészséges bőrsejtektől: a kromoszómaszám aneuploid, a p53 tumorszupresszor gén pontmutációt szenvedett és transzkripciósan inaktív. Mivel a p53 gátolja a sejtosztódást, ezért ezen gén inaktivitása is hozzájárul a sejtvonal korlátlan fenntarthatóságához (több, mint 140 passzáls után sem változik a sejtek

génállománya). Ugyanakkor ezen genetikai eltérések ellenére a sejtek az egészséges keratinocytákhoz hasonlóan differenciálódnak (bizonyítottan expresszálják a differenciálódási markereket: keratin 1, keratin 10, involucrin és filaggrin). Kollagén gélen szélesztve a sejteket, azok az egészséges felnőtt keratinocytákhoz hasonló epidermis réteget hoznak létre.

2. A bőr következő rétege az irha (dermis), melyet szintén további alrétegekre oszthatunk (Rácz és mtsai, 1994; Szentágothai és Réthelyi, 2002):

- stratum papillare
- stratum subpapillare
- stratum reticulare

Az irha mesodermális eredetű kötőszövet, melynek vastagsága kb. 3 mm. Feladata a bőr turgorának, valamint tápanyag- és idegellátásának biztosítása, ezen kívül dús érhalózata révén fontos szerepet játszik a szervezet hőháztartásában. Számos sejttípus alkotja, ezek közül a legnagyobb számban *fibroblastok* találhatóak, melyek az alapállományt és a kötőszöveti rostokat termelik. Az alapállományt proteoglikánok, glükózaminoglikánok, glikoproteinek, elektrolit és víz alkotja. Az irha rostrendszerrel elasztikus, kollagén- és rácsrostokból áll. A *histiocyták/macrophagok* a mononuclearis phagocytá system (MPS) tagjai, sejttörmelék és melanint fagocitálnak. A *hízósejtek* hisztamin, szerotonint és heparint tartalmaznak, az allergiás reakció keletkezésében van szerepük. A *zsírsejtek* neutrális zsírokat tárolnak. A *differenciálatlan mesenchymalis sejtek* a bőr őssejtjei, így részt vesznek az elpusztult szövetek regenerációjában. A *lymphocyták* és a *plazmasejtek* az immunválaszban játszanak fontos szerepet. Emellett

az irhában találhatóak a vérből kivándorolt *eosinophil*, *basophil*, *neutrophil granulocyták*, illetve *monocyták* is.

3. A bőr legbelső része a bőralja (tela subcutanea, subcutis, hypodermis).

A bőralja lebenyekbe rendeződött zsírsejtekből áll, mely lebenyekben erek és idegek futnak (Rácz és mtsai, 1994; Szentágothai és Réthelyi, 2002). A zsírpárna vastagsága nemenként, korcsoportonként, illetve testtájanként változó nagyságú. A zsírpárnát felépítő zsírsejtek mesodermalis eredetűek, feladatuk a bőr rétegeinek táplálása, a hőszabályozás biztosítása, illetve a zsírréteg által a belső szervek mechanikai védelme, valamint energiaraktár képzése.

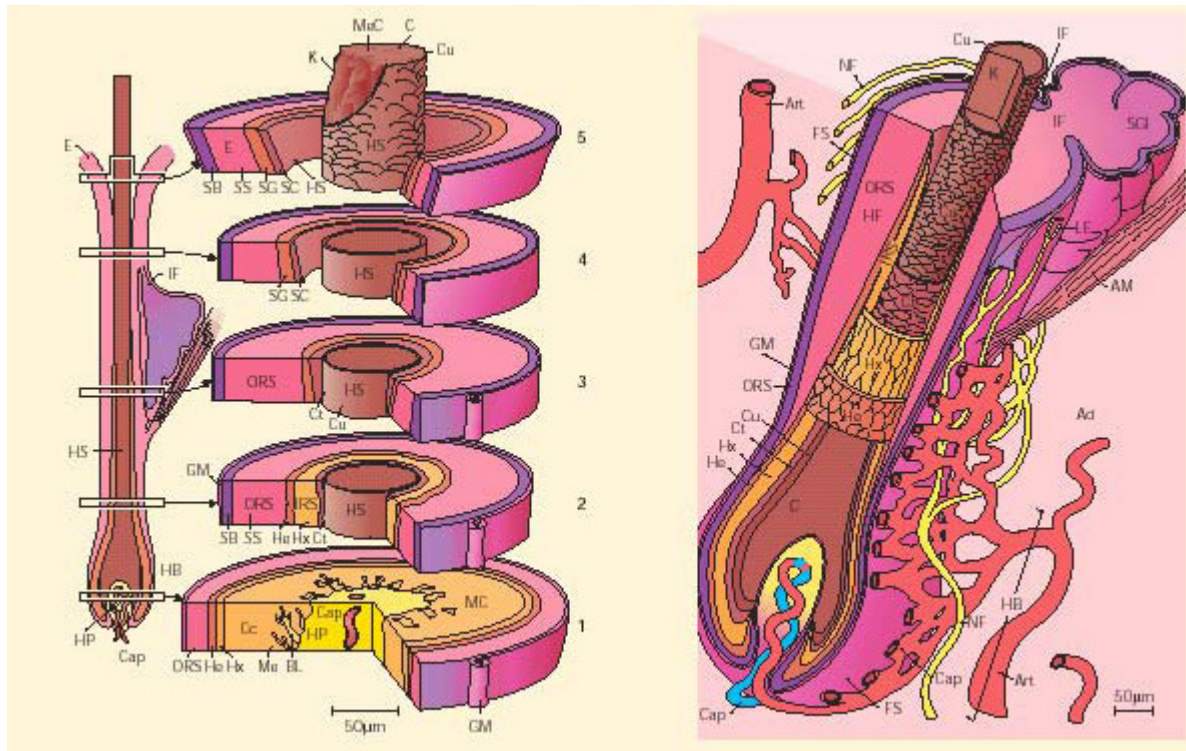
A szőrtüsző

A bőr egyik függeléke a szőrtüsző (más néven folliculus), mely a bőr biológiájában egyedülálló szerepet betöltő ectodermalis eredetű „mini-orgánum”. A folliculus a konvencionálisan ismert funkciók (mechanikai védelem, érzékelés, hőtárolás, szociális és szexuális jelzések) mellett más, a bőr biológiáján is túlmutató szereppel bír (Paus és Cotsarelis, 1999). A szőrtüsző egyik legfontosabb tulajdonsága a folyamatos regenerációra való képesség. Ezen regeneráció magában foglalja a proliferációs, differenciálódási és apoptotikus folyamatok szigorúan ellenőrzött összhangját, különböző eredetű és funkciójú sejtrétegek kölcsönös kommunikációja révén (Paus, 1998). A folliculus sejt-reservoirként szolgál számos sejttípus kialakulásának, úgymint a bőr és a szőrtüsző immunfolyamataiban szerepet játszó Langerhans-sejteknek (Gilliam és mtsai, 1998), a melanocytáknak (Peters és mtsai, 2002b) és a keratinocytáknak (Panteleyev és mtsai, 2001). A szőrtüsző által termelt növekedési faktorok, citokinek, neuropeptidek, enzimek és adhéziós molekulák segítik a folliculus és járulékos

képleteinek (őket ellátó erek, idegek, különféle mirigyek) finoman összehangolt működését (Stenn és Paus, 2001). A folliculusok említett sejtfolyamatainak tanulmányozása emellett lehetőséget nyújt a hajkutatókon túlmutató, de hasonló jelenségek értelmezésére is (pl. sebgyógyulás).

A szőrtüsző funkcionális anatómiája

A szőrtüszők különböző típusaiban megfigyelhető finom eltérések ellenére azonos alapszerkezettel jellemezhetők (**3. ábra**), mely a folliculus fő tevékenységének, a környezettel összhangban lévő haj-, illetve szőrszáltermelésnek van alárendelve (Montagna és Ellis, 1958; Montagna és Parakkal, 1974; Dawber, 1997; Paus és Cotsarelis, 1999). A hajszál létrehozása a következő elv szerint történik: az epithelium egy betüremkedése (a bulbus) egy speciális mesenchymalis sejtcsoporttal, a dermális papillával (DP) történő kommunikáció során létrehoz egy igen ellenálló struktúrát, a hajszálát, amely azután a környező szövetek megsértése nélkül áthatol az epidermisen. Ennek megfelelően a folliculust egy hagymához is szokták hasonlítani, melynek a legbelső burkai a DP-nak felelnek meg, amit a bulbus epithelium több rétege héjszerűen vesz körül. A hagyma szára a folliculus belsejében elhelyezkedő, folyamatosan kifelé mozgó hajszál. A DP fölött található keratinocyták terminális differenciálódás során ún. trychocytákká alakulnak és a differenciálódási folyamatok részeként a szintén ezen a területen elhelyezkedő melanocytáktól melanint vesznek föl. A trychocyták folyamatosan fölfelé mozogva alakítják ki ezután a hajszál három rétegét: a kortextet (ahol a kénben gazdag fehérjemátrixba ágyazódnak a teljesen keratinizált trychocyták kötegei), az ezt tetőcserépszerűen borító kutikulát, valamint a medullát.



3. ábra: A szőrtüsző anatómiája

Az ábrán a szőrtüsző különböző magasságban készített keresztmetszeti képeinek sematikus rajza látható. IF: infundibulum, Is: isthmus, HS: hajsál, HP: dermális papilla, Cap: kapillaris, ORS: külső gyökérhüvely keratinocyták, IRS: belső gyökérhüvely keratinocyták, HC: Henle réteg, HX: Huxley réteg, MC: mátrix keratinocyták, E: epidermis, SG: faggyúmirigy, C: hajsál cortex, Cu: kutikula, NF: idegrost, AM: Arrector pili izom, GM: üvegmembrán, Ad: adipocyták, BL: bazális lamina, HF: hajfollikulus, SB: stratum basale, SS: stratum spinosum, SG: stratum granulosum, SC: stratum corneum, K: keratin, Ct: kutikula, MeC: medullaris sejtek, HB: bulbus, FS: folliculáris kötőszöveti réteg, Me: melanocytá, Art: arteriola. (Paus és mtsai, 1999)

A belső gyökérhüvely (inner root sheath, IRS) keratinocytáinak terminálisan differenciálódott rétegei egy szilárd, ellenálló palástot képeznek a hajsál körül és vele együtt kifelé mozognak, elcsúszva a külső gyökérhüvely (outer root sheath, ORS) keratinocytáinak legbelső rétegén. Az IRS maga is több koncentrikusan rendeződő rétegből áll: Henle-réteg, Huxley-réteg és a kutikula. Ezen rétegek mindegyike eltérő epithelialis differenciáltsági mintázattal és jellegzetes szerkezeti fehérjékkel (pl. haj keratinok, trychohialin), mátrix molekulákkal és enzimekkel rendelkezik. A folliculus-epithelium morfológiai sokszínűségére utal továbbá, hogy a nyolc epithelialis réteg

mindegyikében a keratin multigén család bizonyos tagjai és expressziós mintázata írható le (Powel és Rogers, 1997; Langbein és mtsai, 1999, 2001 és 2002).

Az ORS keratinocyták alkotják a dermist és az IRS-t elválasztó és egyben összekötő réteget. Ezen sejtek folyamatos kapcsolatban és sejtkecserelődésben vannak az epidermissel. Erre utal az a tény is, hogy az epidermis sérülése esetén az ORS sejteiből regenerálódhat (Taylor és mtsai, 2000). Az IRS-sel és a hajszállal ellentétben az ORS sejteinek egy részére lassú osztódási ráta és így a proliferáló keratinocyták keratin-expressziós mintázata jellemző. A differenciálódás a bazális membrán irányából az IRS felé történik. Az ORS egyrészt sejt-reservoirként szolgál (Panteleyev és mtsai, 2001), másrészt a belsőbb sejtrétegek táplálását végzi (oxigén, energia-raktár), illetve számos olyan faktort és citokint termel, melyek a hajciklus (ld. később) szabályozásában játszanak szerepet.

Úgy tűnik, hogy az ORS, az IRS és a hajszál keratinocytái három prekursor sejtpopulációból jönnek létre, melyek egyrészt a musculus arrector pili csatlakozásának közelében (elsődleges sejtpopuláció), másrészt (másodlagosan) a bulbusban helyezkednek el (Panteleyev és mtsai, 2001). A fejlődő, aktív follikulumus leggyorsabb ütemben osztódó sejtpopulációja, a mátrix keratinocyták, melyek az Auber-féle vonal (a bulbus legszéleesebb része, a dermális papilla maximális átmérője) alatt helyezkednek el.

A follikulumus nagyságát és átmérőjét a DP határozza meg (Jahoda és Reynolds, 1996). A sérült DP teljes mértékben képes regenerálódni a follikulumus legkülső burkából, a proximális kötőszövetes burokból (CTS) (Jahoda és Reynolds, 1996; Reynolds és mtsai, 1999). A DP sejtei egy olyan mátrixba vannak beágyazva, ami összetételében egy bazális membránra hasonlít. A növekedő fázisban lévő follikulumus fibroblastjai

közvetlen kontaktusba tudnak lépni a mátrix keratinocyttal, ami jelentősen leegyszerűsíti a köztük fennálló jelátvitelt (Jahoda és Reynolds, 1996; Jahoda, 1998). Feltehetőleg hasonló kommunikáció áll fenn a CTS/DP sejtek és a bőr alatti zsírsejtek között is (Jahoda és mtsai, 2003).

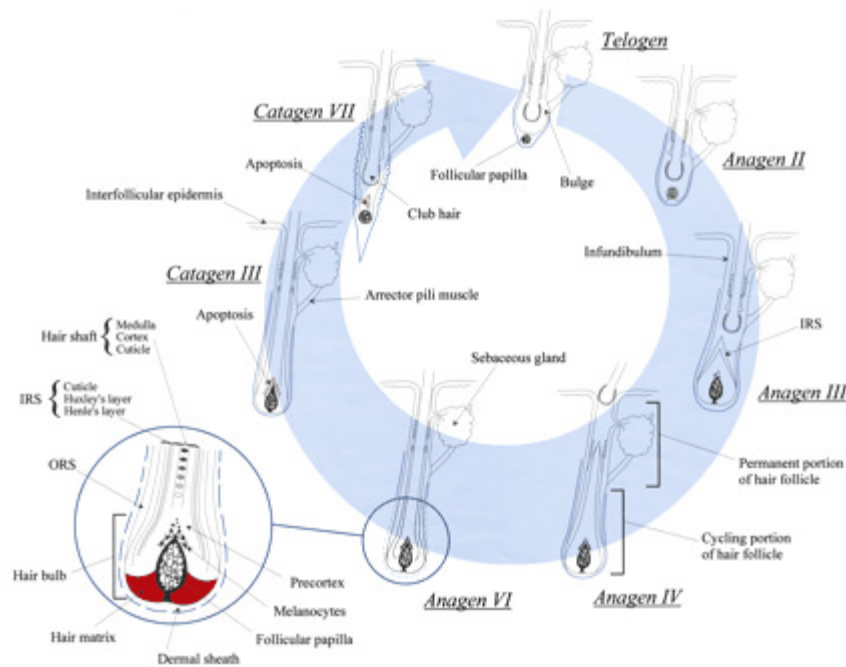
A növekedési fázisban lévő hajszál pigmentációjáért a proximális szőrtüszőben, a mátrix keratinocytták közt elszórtan elhelyezkedő terminálisan differenciálódott melanocytták felelősek (Tobin és Paus, 2001).

A musculus arrector pili szőrtüszőhöz való kapcsolódásának területe igen gazdag szenzoros és vegetatív beidegzéssel rendelkezik, ami egyrészt lehetővé teszi a szőrszál „tapintószervként” való működését, másrészt az itt termelt neurotranszmitterek, neurohormonok és neurotrofinok fontos szabályozó szerepet töltenek be (Botchkarev és mtsai, 1997; Peters és mtsai, 2001 és 2002; Paus és mtsai, 1997). A follikulus érellátása a dermális és bőr alatti plexusokból származik.

A hajciklus

A szőrtüszőt az egész életen át váltakozó regressziós és regenerációs tevékenysége teszi egyedülállóvá a többi emlős szerv között. A regresszió és regeneráció ezen ciklikus váltakozását hajciklusnak nevezzük (**4. ábra**), melynek három jellegzetes szakaszát különböztetjük meg. Az *anagén* fázisban aktív növekedés és fejlődés történik, a szőrtüsző ebben a fázisban éri el maximális fejlettségét. A *katagén* fázisban a szőrtüsző növekedése megáll, regressziós folyamatok indulnak be. A nyugalmi *telogén* fázis pedig a tulajdonképpeni felkészülés a következő anagén fázisra. Az anagén és katagén fázis felosztható további alszakaszokra (anagén I-VI, katagén I-VIII), mely stádiumok jól elkülöníthető morfológiai kritériumokkal és molekuláris

markerekkel jellemezhető (Müller-Röver és mtsai, 2001; Panteleyev és mtsai, 2001; Stenn és Paus, 2001).



4. ábra: A hajciklus

Az emlős szőrtüsző nem folyamatosan ugyanabban a formában működik, hanem a hajciklus során egy ismétlődő változáson megy keresztül. A hajciklusban a szőrtüsző proximális részében strukturális újraépülés történik, mely az epithelialis és mesenchymalis kompartmenteket egyaránt érinti. Az aktív növekedési anagén és a regressziós katagén fázisokat a nyugalmi telogén választja el egymástól. Az anagén VI stádiumban éri el a szőrtüsző jellegzetes, komplex formáját, melyben a fejlődő hajsza a gyökérhüvely keratinocyták több rétege táplálja és védi a maximális kiterjedésű dermális papilla kontrollja alatt. A katagén transzformáció a bulbus keratinocytáinak és melanocytáinak apoptózisával, illetve a dermális papilla sejtszámbeli csökkenésével jár. A viszonylag rövid telogén fázis után a szőrtüsző ismét belép az anagénbe, vagyis képes lesz egy újabb hajsza kialakítására (Paus és mtsai, 1999)

A ciklus szempontjából a szőrtüszőt funkcionálisan két részre oszthatjuk: a felső, állandó részre, mely viszonylag változatlan formában marad, és az alsó részre, mely teljesen leépül, majd megújul a ciklus során.

A kis méretű telogén folliculusban nem találunk IRS-t, a DP egy kompakt, golyó alakú sejtsomó, és a szőrtüszőhöz arányaiban igen nagy faggyúmirigy csatlakozik.

Az anagén fázis kialakulása során a szőrtüsző alsó részében a proliferációs folyamatok kerülnek előtérbe, ami főleg az epithelialis sejtrétegeket érinti, de ezzel párhuzamosan morfológiai változások történnek a DP-ban is. A korai anagén stádiumok

során a szőrtüsző egyre inkább meghosszabbodik és egyre mélyebbre nyúlik. A mátrix keratinocyták igen gyors proliferációja kialakítja a hajszál és a belső gyökérhüvely egymást határoló rétegeit, miközben a bulbus keratinocytái egyre inkább körbeveszik a DP-t. Újra felépülnek az ORS tápláló rétegei is. Az utolsó, hatodik anagén stádiumban a szőrtüsző eléri jellegzetes, komplex formáját: létrejön egy új, folyamatosan növekvő hajszál, melyet a gyökérhüvely keratinocyták és a CTS határol. A DP ebben a szakaszban eléri maximális nagyságát és aktivitását. Kialakul továbbá a beidegzés, az érellátás, valamint a melanocyták proliferációja és melanintermelése által a pigmentáció is. Az emberi szőrtüsző 4-5 éven át ebben a formában működik a fejbőrben.

A katagén fázis során a szőrtüsző „visszafejlődése” történik, amit az apoptotikus sejtfolyamatok beindulása kísér. A programozott sejtelhalás megfigyelhető mindkét gyökérhüvely rétegben, a mátrix keratinocytákban, illetve a melanocytákban is. Ennek megfelelően a katagén fázis egymást követő stádiumaiban a bulbus egyre inkább elvékonyodik, valamint pozícióját tekintve egyre közelebb kerül az epidermishez. A hagyma alakú DP proximális irányba húzódik, a hajszáltól (a késői katagén fázisban ún. club hair) jelentősen eltávolodva. A késői katagén fázisban a DP és a hajszál között egy vékony epithelialis híd biztosít összeköttetést. A melanocyták apoptózisa miatt a pigment szemcsék mennyisége is lecsökken, a proximális hajvég korábbi jelentős pigmenttartalma megszűnik. A rövid (2-3 hét) regressziós katagén stádium után a follikulus ismét a nyugalmi fázisba kerül, amivel a későbbiekben egy újabb ciklus indulhat be. Megemlítendő továbbá, hogy a hajciklus változásait a szőrtüsző járulékos képleteinek folyamatos átalakulása is kíséri (Paus és mtsai, 1999).

A hajciklus szabályozása

A hajátültetési kísérletek során már hosszú ideje megfigyelték, hogy a hajciklus egy úgynevezett „belső órával” rendelkezik, amely valószínűleg vagy a szőrtüsző közelében, vagy magában a szőrtüszőben helyezkedik el (Chase, 1954; Paus és mtsai, 1990 és 1999; Stenn és Paus, 2001). Ez teszi lehetővé a szőrtüszők átoperálását, valamint az általunk is alkalmazott szőrtüsző szervkultúra alkalmazását is. Ezen óra biológiai természetéről viszonylag keveset tudunk, ma azonban azt tartjuk valószínűnek, hogy a DP fibroblastjaival állhat igen szoros kapcsolatban (Paus és mtsai, 1999). Az a nézet is elterjedt, hogy a szőrtüszőt körülvevő, jelátviteli molekulák által biztosított miliő irányított, gyors és lokális megváltozása okozza a ciklusban bekövetkező átalakulásokat (Hardy, 1992; Paus és mtsai, 1999; Stenn és Paus, 2001). Maga a szabályozás igen szigorú kontrollt követel meg, hiszen határt kell szabni mind a korai anagén fázis aktív proliferációs folyamatainak, mind a katagén fázisban megfigyelhető apoptotikus és differenciálódási folyamatoknak. Ez biztosítja például, hogy a regresszió során bekövetkező sejtelhalás a bulbusban kizárólag a (mátrix és gyökérhüvely) keratinocytákra, illetve a melanocytákra korlátozódjon (Lindner és mtsai, 1997; Tobin és mtsai, 1998; Müller-Röver és mtsai, 1999, Tobin és Paus, 2001). A dermális fibroblastok számbeli csökkenésének ugyanis a CTS-be való kivándorlás az oka (Tobin és mtsai, 2003).

Érdekes kérdés, hogy melyek azok a molekulák, amelyek részt vehetnek a ciklus beindításában és fenntartásában. Számos növekedési faktorról, citokinről, hormonról és egyéb molekuláról bizonyosodott már be, hogy a hajciklus valamelyik pontján képes beavatkozni. Igen fontos szabályozási pont a telogén szakasz, s a fázis nyugalmi jelzője ellenére igen sokrétű regulatórikus folyamat zajlik ekkor (Chase, 1954; Paus és mtsai,

1990 és 1999; Stenn és Paus, 2001). Folyamatos ösztrogén adagolással például egér szőrtüszőkben megakadályozható a telogén-anagén átalakulás, miközben a DP-ban jelentősen megemelkedik az ösztrogén-receptorok száma (Oh és Smart, 1996; Chanda és mtsai, 2000). Ez a jelenség is utalhat arra, hogy néhány faktornak a különböző stádiumok határain kiemelkedő szerepe lehet. A teljesség igénye nélkül példaként szolgálhatnak a hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor (IGF-I), stem cell factor (SCF) és vascular endothelial growth factor (VEGF), amelyek az anagén fázis meghosszabbodását idézik elő, vagyis őket a hajciklus pozitív regulátoraiként tartjuk számon (Philpott és mtsai, 1994a; Lindner és mtsai, 2000; Yano és mtsai, 2001; Botchkareva és mtsai, 2001). Ezzel szemben a fibroblast growth factor-5 (FGF5), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 β (IL-1 β), transforming growth factor- β_1 (TGF β_1) tumor necrosis factor- α (TNF- α), a neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin-4 (NT-4) és brain-derived neurotrophic factor (BDNF) citokinekről részben humán, részben egéren folytatott kísérletek során kiderült, hogy szerepük a katagén fázis kialakításának elősegítése (negatív regulátorok) (Hébert és mtsai 1994; Philpott és mtsai, 1996; Botchkarev és mtsai, 1998a és 1998b; Foitzik és mtsai, 2000; Botchkareva és mtsai 1999 és 2001). Érdekes kiemelni a TGF β_1 szerepét a ciklus során. Ezen növekedési faktort már korábban leírták a szőrtüsző fejlődésében, mint a morfogenezist elősegítő kulcsmolekulát (Foitzik és mtsai, 1999). A molekula ugyanakkor ellentétes szerepet játszik a hajciklus során; azaz fokozza a regresszió beindulását (Soma és mtsai, 2002). Vagyis míg a szőrtüsző morfogenezise során a follikulus kialakulását, érését, növekedését segítette elő, addig a ciklus során megakadályozza ezen folyamatokat.

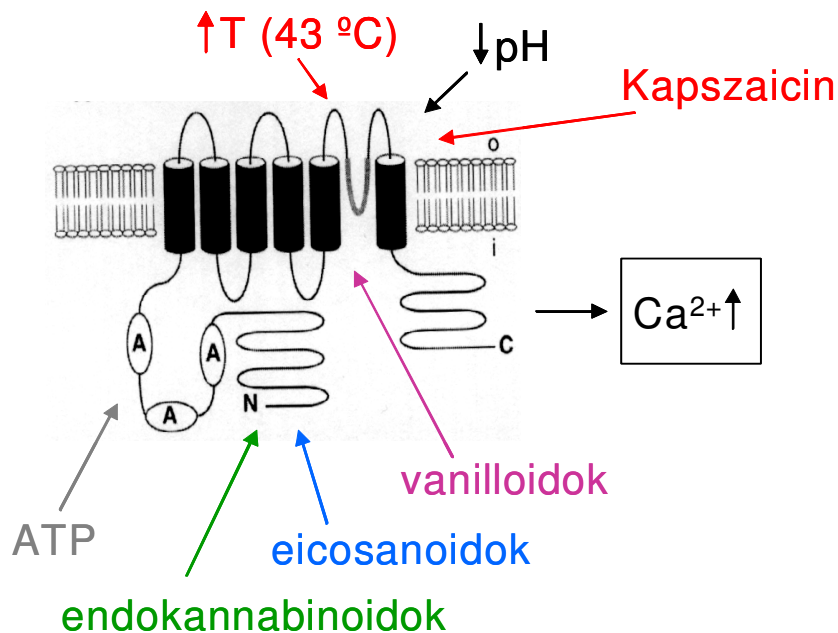
A hajciklus szabályozásának autonomitása mellett meg kell azonban említenünk azt is, hogy a hajfollikulum számos extrinsic hatás célpontja is. Szinte minden nagy hormoncsaládról leírták már, hogy befolyásolja a szőrtüszők kialakulását és a hajciklust (ösztrogének, androgének, tiroxin) (Ahsan és mtsai, 1998; Randall és mtsai, 2001; Thornton, 2002). Hasonló szerepet tulajdonítanak számos neuropeptidnek, neurotranszmitternek, neurotrophinnak és egyes stresszhatásokat kialakító molekulának. Egér hajfollikulumok estében, például, beszámoltak arról, hogy a P-anyag és az adrenokortikotropin (ACTH) igen hatékonyan módosítja a hajciklus eseményeit *in vivo* és *in vitro*, míg a stresszorok alkalmazása során tapasztalt szőrnövekedést gátló hatás is a P-agyag közvetítésével valósul meg (Paus és mtsai, 1994a és 1994b; Arck és mtsai, 2003).

A szőrtüsző biológiájának, illetve a hajciklus szabályozásának logikájába való mélyebb betekintés nagyfokú klinikai relevanciával bír. A hajnövekedés problémáinak legtöbbje ugyanis a normál hajciklus valamilyen megváltozására vezethető vissza, ami azt jelenti, hogy a funkcióképes szőrtüszők „biológiai órája” a kívántnál lassabban vagy gyorsabban jár.

A vanilloid (capsaicin) receptor-1 (TRPV1), a molekula szerkezete

A capsaicin receptor egy nem-specifikus kationcsatorna, melyet ma a nociceptív ingerek hatására kialakuló folyamatok egyik központi integrátor molekulájának tekintünk. A receptor klónozása és molekuláris karakterizálása Caterina és munkatársai nevéhez fűződik, akik 1997-ben patkány cDNS könyvtárat használva határozták meg a receptor pontos szerkezetét (**5. ábra**). A patkány TRPV1 esetében egy 2514 nukleotidból álló DNS szakasz kódolja a 838 aminosavból felépülő 95 kDa tömegű fehérjét (Caterina és

mtsai, 1997). Strukturális sajátosságai alapján a TRPV1 nagyfokú homológiát mutat a *Drosophila melanogaster* retinájában megtalálható TRP (tranziens receptor potenciál) proteinnel, ezért a TRP receptor család egyik tagjának tekinthető (Caterina és Julius, 2001; Benham és mtsai, 2002).



5. ábra: A TRPV1 szerkezete és működését befolyásoló molekulák és hatások

Közös jellemzőjük a nagy valószínűséggel tetramer formát kialakító 6-transzmembrán domén, melyek közül a TRPV1 esetében az ötödik és hatodik domén között található „hurok” hozza létre a csatorna pórúsát. Ezen receptorcsaládra jellemző továbbá, hogy mind az N-, mind a C-terminális intracellulárisan helyezkedik el (Kedei és mtsai, 2001; Benham és mtsai, 2002).

A TRPV1 szerkezetét tanulmányozva megállapították, hogy számos kötő- és szabályozóhellyel bír, így pl. az intracelluláris N-terminális szakaszon megtalálható 3 db ankyrin repeat domén (mint potenciális protein kináz A foszforilációs helyek) (Caterina

és mtsai, 1997; Kwak és mtsai, 2000; Kedei és mtsai, 2001), az ugyancsak az intracellulárisan elhelyezkedő vanilloid (azaz a capsaicint és ultrapotens analógját, a resiniferatoxint, RTX, felismerő) kötőhely, vagy az extracelluláris oldalon található allosztérikus modulációs helyek (Garcia-Martinez és mtsai, 2000; Jordt és mtsai, 2000; Welch és mtsai, 2000). Kimutatták továbbá, hogy a klónozott TRPV1 is funkcionális, nem-specifikus, főként Ca^{2+} -ra permeábilis csatornaként működik (relatív permeabilitása $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ közelítőleg 10, Caterina és mtsai, 1997).

A TRPV1 exogén és endogén vanilloidok segítségével aktiválható

Az első vegyület, mely összefüggésbe hozható a TRPV1 receptorral, a csípős paprikából (*Capsicum annuum*) izolálható capsaicin (Tresh, 1846), mely a csípős paprika fogyasztását követő égő, fájdalmas érzést okozza. A capsaicin tulajdonképpen már jóval a receptor leírását megelőzően ismert volt; részben nociceptív neuronokon való hatásait tanulmányozva jutottak arra a következtetésre, hogy léteznie kell egy olyan specifikus receptornak, ami a capsaicin hatásait közvetíti (Jancsó, 1968). A capsaicin celluláris hatásmechanizmusa ugyanis a szenzoros neuronokon három jól elkülöníthető folyamattal jellemezhető. Az első a capsaicin adagolását követő excitáció, melynek során a capsaicin megnöveli a sejtmembrán Ca^{2+} és Na^{+} -permeabilitását, ami depolarizációhoz vezet (Bevan és mtsai, 1993). Ezután egy deszenzitizáció lép fel, ahol a sejtek mind a capsaicin (homológ deszenzitizáció) (Szolcsányi, 1977; Winter és mtsai, 1990), mind egyéb fájdalomkeltő anyagok (heterológ deszenzitizáció) (Jancsó, 1960; Holzer, 1991) iránt is érzéketlenné válnak. Végül a capsaicint nagy koncentrációban, elég hosszú ideig alkalmazva a sejteken a harmadik jellegzetes folyamat, a citotoxicitás

váltható ki, mely leginkább a megemelkedett intracelluláris kalciumszintnek, valamint ennek következtében kalcium-függő proteázok fokozott működésének tulajdonítható (Wood és mtsai, 1988; Winter és mtsai, 1990; Holzer, 1991).

A TRPV1 molekuláris biológiai leírását követően elvégzett nagyszámú kísérletnek köszönhetően kiderült az is, hogy ezen receptort nemcsak az exogén vanilloid vegyületek, hanem számos endogén, főként a fájdalom kialakításában központi szereppel bíró molekula is képes aktiválni (5. ábra). Ezek közül a TRPV1 legfontosabb endogén aktivátorának („ligandjának”) tekinthető az alacsony küszöbű (43°C) hőmérséklet-emelkedés, valamint a pH csökkenése (acidózis) (Caterina és mtsai, 1997; Tominaga és mtsai, 1998). Megállapították ugyanakkor azt is, hogy ezen hatások mellett számos, leginkább gyulladáscsökkentő mediátornak tekinthető anyag (pl. bradikinin, extracelluláris ATP, arachidonsav-származékok, leukotriének, lipid-peroxidáció termékei, stb.) is képes a TRPV1 működésének pozitív befolyásolására (Hwang és mtsai, 2000; Tominaga és mtsai, 2001; Premkumar, 2001; Di Marzo és mtsai, 2002). Ezen ágensek egyrészt direkt módon (azaz a TRPV1-hez közvetlenül kapcsolódva) aktiválhatják a receptort (pl. hő, acidózis), másrészt saját, főként metabotróp receptoraikhoz kötődve intracelluláris jelátviteli útvonalak (kináz-rendszerek, intracelluláris hírvivők) módosítása révén szabályozzák a TRPV1 működését. Ilyen allosztérikus módosító hatás lehet az, hogy ezen anyagok a TRPV1 hőérzékenységi küszöbét csökkentik, azaz a receptor már fiziológias hőmérsékleten is aktiválódik és fájdalomérzést vált ki (termális hyperalgesia) (Tominaga és mtsai, 1998, Caterina és mtsai, 2000). A TRPV1 szerepét bizonyítja a fenti folyamatokban a TRPV1 knock-out egerekkel végzett kísérletek eredménye is, miszerint ezen állatokban (természetesen a hiányzó vanilloid-érzékenység mellett) főként a termális/gyulladáscsökkentő hyperalgesia jelensége hiányzik (Caterina és mtsai, 2000).

Mindezek alapján a TRPV1 a különféle (pl. kémiai, termális) nociceptív ingerek hatására kialakuló folyamatok egyik központi integrátor molekulájának tekinthető.

A TRPV1 expresszióját először neuronális szöveteken írták le

A receptort autoradiográfiás, valamint különféle funkcionális vizsgálatok segítségével elsőként a primer szenzoros neuronok egy meghatározott alcsoportjában írták le (Szallasi, 1995; Szallasi és Blumberg, 1999), melyek sejtteste a spinális hátsó gyöki és trigeminális szenzoros ganglionokban helyezkedik el. Ezen neuronok a capsaicin és rokon vegyületeikkel szemben mutatott érzékenységük miatt (Holzer, 1991; Szallasi és Blumberg, 1999) a capsaicin-szenzitív neuron elnevezést kapták (Szolcsányi, 1982). A TRPV1-et kimutatták továbbá a gerincvelő hátsó szarvában (Guo és mtsai, 1999), ahol a TRPV1-immunreaktivitás főleg az I. laminára lokalizálódott. A kötődési vizsgálatok során ugyanakkor olyan központi idegrendszeri struktúrák is jelölődtek, amelyek nincsenek egyértelműen leírt közvetlen kapcsolatban a primer szenzoros neuronokkal (Ács és mtsai, 1996). Ilyen terület többek között a hypothalamus, ahol a TRPV1 jelenlétét hipotermiás hatásaival hozták összefüggésbe (Jancsó-Gábor és mtsai, 1970; Szolcsányi és mtsai, 1971). Sasamura és munkatársai (1998) beszámoltak emellett arról, hogy az agy számos további helyén is (cerebellum, cortex, striatum, bulbus olfactorius, híd, hippocampus és thalamus) megtalálható a TRPV1.

A TRPV1 nem csak neuronális szöveteken fejeződik ki

A TRPV1-et vizsgáló kutatások egyik legizgalmasabb eredménye volt ugyanakkor, amikor kiderült, hogy a receptor elhelyezkedése és működése nem csupán

neuronális szövetekre korlátozódik. Bíró és munkatársai például capsaicin segítségével a hátsó gyöki ganglionokéhoz nagyon hasonló, TRPV1-specifikus kalcium-beáramlást idéztek elő hízósejteken és glióma sejteken (Bíró és mtsai, 1998a és 1998b). További kutatócsoportok emellett beszámoltak a capsaicin specifikus hatásairól, többek között, humán polimorfonukleáris sejteken (Partsch és Matucci-Cerinic, 1993), timocytákon (Amantini és mtsai, 2004), bronchialis epitheliumon (Lundberg, 1993; Chitano és mtsai, 1994; Ellis és mtsai, 1997) és humán lymphocytákon (Lai és mtsai, 1998). Végezetül bebizonyosodott, hogy a receptor funkcionális formája expresszálódik humán húgyhólyag epithelialis és intersticialis, valamint simaizomsejtjeiben is (Birder és mtsai, 2001; Ost és mtsai, 2002; Lazzeri és mtsai, 2004).

A legújabb felfedezés: a TRPV1 kifejeződik humán bőrben is

A legutóbbi felfedezések egyike volt, amikor TRPV1-et immunhisztokémia segítségével kimutatták humán bőr epidermisén és tenyésztett epidermális keratinocytákon, amit RT-PCR módszerrel is alátámasztottak (Denda és mtsai, 2001; Inoue és mtsai 2002). Ezt követően beszámoltak arról, hogy a keratinocyták a receptor funkcionális formáját expresszálják. Kimutatták továbbá, hogy a capsaicin és a savas közeg ezeken a sejteken is aktiválta a receptort, vagyis megemelte az intracelluláris kalciumkoncentrációt ($[Ca^{2+}]_i$) (Inoue és mtsai, 2002). További vizsgálatok rámutattak, hogy az epidermális eredetű HaCaT sejtvonalon capsaicin-kezelést követően megemelkedett a ciklooxygenáz-2 expressziója, valamint az interleukin-8 és a prosztaglandin E2 felszabadulása (Southall és mtsai, 2003), ami arra utalhat, hogy az epidermális keratinocytákon megtalálható TRPV1 szerepet játszhat a bőr gyulladós folyamatának kialakításában, illetve szabályozásában. A receptor farmakológiai

befolyásolása pedig különböző bőrbetegségek, így például a viszketéssel járó kórképek kezelésében lehet hasznos (Bíró és mtsai, 2007; Paus és mtsai, 2006; Bíró és mtsai, 1997).

A TRPV1 funkcionális szerepe a szőrtüszőben - előzetes eredmények

Mindezen eredmények irányították figyelmünket a TRPV1 bőr, illetve bőrfüggelékek biológiájában betöltött lehetséges szerepének vizsgálatára. A disszertációban bemutatandó kísérleteinket közvetlenül megelőzően beszámoltunk a TRPV1 expressziós mintázatáról a bőrben (Bodó és mtsai, 2004). Leírtuk, hogy a TRPV1 kifejeződik az epidermisben, elsősorban a stratum basale és spinosum rétegben. Emellett a bőr egyéb sejtjei is expresszálják a TRPV1-et, így a Langerhans-sejtek, sebocyták, az erek simaizomsejtjei, a faggyúmirigy epithelialis sejtjei valamint a hízósejtek. Ugyanakkor a melanocyták és a fibroblastok TRPV1 negatívnak bizonyultak. Ezt követően humán szőrtüszőben vizsgáltuk a TRPV1 expresszióját és funkcionális szerepét. Megállapítottuk, hogy a TRPV1 az ORS, az IRS, valamint a mátrix keratinocyták rétegében fejeződött ki. Ugyanakkor a dermális papilla és a melanocyták nem mutattak TRPV1-pozitivitást. A TRPV1-immunreaktivitás (TRPV1-ir) változott a hajciklus során: katagén fázisú follikulusban, elsősorban az ORS-ben, fokozott TRPV1 expressziót láttunk. Bebizonyosodott az is, hogy a TRPV1 aktivációja funkcionális következményekkel járt: azt találtuk, hogy a capsaicin alkalmazása dóziszfüggően csökkentette a szőrtüsző elongációját, mely hatás kivédhető volt a TRPV1 specifikus antagonistá iodo-resiniferatoxinnal (I-RTX) (Wahl és mtsai, 2001). Kimutattuk azt is, hogy a capsaicin csökkentette a proliferáló, Ki67 pozitív sejtek számát és növelte a

TUNEL pozitív apoptotikus sejtek arányát. Emellett a TRPV1 aktiválása katagén átalakulást indukált a folliculusok nagy részében.

Kísérleteinket megismételtük HaCaT és ORS keratinocytákon is, ahol szintén erőteljes TRPV1 expressziót figyeltünk meg. A receptor funkcionális szerepét bizonyította, hogy capsaicin alkalmazása megemelte az $[Ca^{2+}]_i$ -t, mely kivédhető volt I-RTX alkalmazásával. Az extracelluláris Ca^{2+} eltávolítása után nem volt detektálható változás az $[Ca^{2+}]_i$ -ben. A TRPV1-aktiváció proliferációra gyakorolt hatását befolyásolta az extracelluláris tér Ca^{2+} tartalma: magas (2 mM) Ca^{2+} -tartalmú oldatban a capsaicin csökkentette a keratinocyták proliferációját, mely hatás I-RTX-szel kivédhető volt, ugyanakkor alacsony $[Ca^{2+}]_e$ mellett sokkal kisebb volt a proliferáció-csökkentő hatás. A proliferációs és apoptózis markerek flow-cytometriai analízise megerősítette eddigi eredményeinket: a Ki67 marker, valamint a hajciklus pozitív regulátorainak szintje megemelkedett, míg az annexin-V és a hajciklus negatív regulátorainak szintje lecsökkent capsaicin hatására (Bodó és mtsai, 2005).

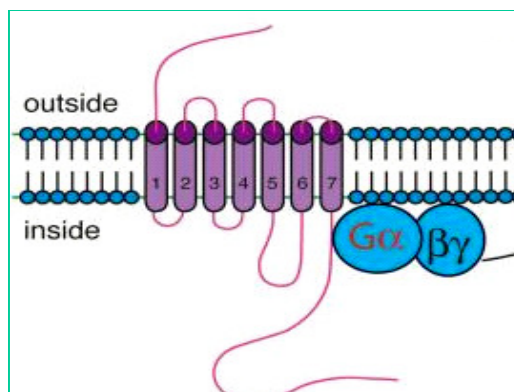
A cannabinoidok

A cannabinoidok nevüket a leghíresebb (és egyben leghírhedtebb) vegyületről, a *Cannabis sativa* leveléből izolált Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)-ről kapták. A cannabinoid vegyületek különböző alcsoportokra oszthatók: növényi, endogén és szintetikus cannabinoidokra (Di Marzo és Petrocellis, 2005). A **növényi cannabinoidok** közé tartozik a már említett Δ^9 -THC, valamint a Δ^8 -THC. Az elsőként felfedezett **endogén cannabinoid** az *N-arachidonoylethanolamine* (anandamide, AEA), melyet 1992-ben Devane és munkatársai mutattak ki emlős agyból. A név a szanszkrit „ananda” szóból származik, mely boldogságot jelent. Az AEA kémiaiilag az eicosanoidok

közé tartozó, 22 szénatomból álló vegyület, mely a leggyakrabban alkalmazott endogén cannabinoid (Howlett és mtsai, 2002). Az AEA a preszinaptikus membránon retrográd hírvivőként gátolja többek között az NMDA, a szerotonin, az acetilkolin felszabadulását (Fride, 2005). Az eicosanoidok közé tartozik ezen kívül a *homo- γ -linolenylethanolamide*, a *docosatetraenylethanolamide*, a *2-arachidonoylglycerol* (2-AG), és a *noladin ether*. A **szintetikus cannabinoidok** közé tartoznak többek között *CP55940*, a *CP47497* valamint a *CP55244* elnevezésű szintetikus vegyületek, melyek szerkezetileg szintén a Δ^9 -THC analógjai.

A cannabinoid receptorok

A cannabinoid receptor 1-et (CB1) 1990-ben mutatták ki először Matsuda és munkatársai (6. ábra).



6. ábra: A cannabinoid receptorok szerkezete és a hozzájuk kapcsolódó G-protein

Később patkány, egér és humán cDNS könyvtárat használva meghatározták a receptor pontos szerkezetét (Pertwee, 1997; Rinaldi-Carmona és mtsai, 1996). A receptor génje a 6. kromoszómán található, a q14-15-ös régióban. A 473 aminosavból álló, 60 kDa tömegű molekula szerkezetileg a 7-transzmembrán fehérjék közé tartozik. A

CB1 G-protein jelátvitellel működő, metabotróp receptor, mely az adenilát-cikláz gátlásával csökkenti a cAMP szintet, ezzel gátolja a protein kináz A-t és így különböző fehérjék foszforilációját csökkenti. A receptorhoz feltehetőleg nem csupán inhibitorikus G-protein kapcsolódik, így a cAMP koncentrációja attól függően változik a sejtben, hogy milyen típusú G-protein aktiválódik. A G-proteinek aktivációjának hatására a membránban különböző Ca^{2+} -és K^{+} -csatornák is megnyílhatnak. Emellett a receptor stimulálása a MAPK szignalizációs útvonalon keresztül génexpressziós változásokat is elindíthat.

A cannabinoid receptor 2 (CB2) mRNS-ét 1993-ban találták meg immunszövetekben (lép, thymus, tonsillák, csontvelői T-és B sejtek) Munro és munkatársai. A receptor génje az egyes kromoszóma hosszú karjának 36. régiójában található. A protein 360 aminosavból áll és 44% -os homológiát mutat a CB1-es receptorral. A két receptor transzmembrán régiójában 68%-os a homológia, mely arra utal, hogy a két molekula funkciójában nagy a hasonlóság. Ezt támasztja alá az a tény, hogy a CB2, hasonlóan a CB1-hez, hatását 7-transzmembrán szerkezetű G-proteinen keresztül fejt ki (**6. ábra**): az adenilát-cikláz gátlásával csökkenti a cAMP szintet (Bayewitch és mtsai, 1995). Emellett képes a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) stimulálására is (Bouaboula és mtsai, 1996.). Ezenkívül leírták, hogy a CB2 stimulálása az Erk kaskád aktivációján keresztül génexpressziós változásokat okozhat (Mackie és Stella, 2006).

A cannabinoid receptorok előfordulása a szervezetben

A CB1-et kezdetben csupán neuronális szövetekben írták le: a központi idegrendszerben, különösen a hippocampusban expresszálódik nagy mennyiségben, de

előfordul perifériás idegekben is. A receptor szerepet játszik a memóriafolyamatokban: a hippocampusban történő hosszú távú potencírozás (long term potentiation, LTP) mechanizmus egyik alapjául szolgálhat a CB1 aktivációja. A receptor gyógyszerekkel történő befolyásolása terápiás jelentőségű különböző betegségek gyógyításában (Fowler, 2005): fájdalomcsillapítóként, hányinger-csillapítóként, étvágygerjesztőként, valamint a sclerosis multiplex kezelésére használják a CB1 agonistákat.

A CB2 legnagyobb mennyiségben az immunrendszerben fordul elő: a legerőteljesebb expresszió a lépben található, de jelentős mennyiségű CB2 mRNS van a leukocytákban (B-sejtek > természetes ölüsejtek > monocyták > polymorphonucleáris neutrophil sejtek > T8 sejtek > T4 sejtek), valamint a mandulákban is (Galiegue és mtsai, 1995). Kisebb mennyiségben detektáltak CB2 mRNS-t a thymusban, csontvelőben, szívben, tüdőben, prostatában, uterusban. Csak napjainkban látszik megdőlni az az elmélet, mely szerint a CB2 nem található meg a központi idegrendszerben: Onaivi és munkatársai megtalálták a kisagyban, valamint a hippocampusban a CB2-t kódoló mRNS-t és kimutatták, hogy a receptornak funkcionális szerepe is van a motoros folyamatok, valamint a viselkedés szabályozásában (Onaivi és mtsai, 2006). Ezen kívül más kutatócsoport is beszámolt CB2-ir jelenlétéről az agy különböző régióiban (Jian-Ping Gong és mtsai, 2006). A CB2 neuronális jelenléte terápiás szempontból is nagyon jelentős lehet, hiszen a receptor szelektív stimulálása különböző neurodegeneratív kórképek illetve gliasejtes tumorok kezelésében is jótékony hatásúnak bizonyult kísérletes körülmények között. Ráadásul a CB2 szelektivitás miatt nem alakultak ki a psychoaktív mellékhatások sem (Fernandez-Ruiz és mtsai, 2007).

A cannabinoid rendszer a bőrben

Napjainkban bebizonyosodott, hogy a cannabinoid receptorok az ideg- illetve az immunrendszeren kívül a bőrben is kifejeződnek. Staender és munkatársai (2005) a CB1 és CB2 receptor expresszióját tanulmányozták a humán bőr különböző szöveti elemeiben. Azt találták, hogy mind az idegrostokban, mind a hízósejtben, macrophagokban, epidermális keratinocytákban, a hajfollikulus epithelialis sejtjeiben, a sebocytákban, valamint a verejtékmirigyekben megtalálható mind a CB1, mind a CB2 receptor. A hízósejtben megfigyelhető CB2 expresszióról számoltak be Facci és munkatársai (1995) is.

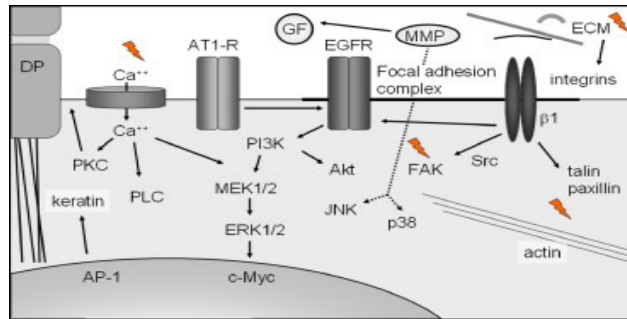
Maccarrone és munkatársai 2003-ban leírták, hogy mind HaCaT, mind NHEK keratinocyták tartalmazzák az AEA metabolizmusában szerepet játszó enzimeket. Így megtalálták a szintézisében résztvevő legfontosabb enzimet, a PLD-t (N-acylphosphatidylethanolamines-hydrolyzing phospholipase D). Ezenkívül kimutatták a sejtmembránon keresztüli transzportot biztosító AMT-t (AEA membrán transzporter), valamint a lebontásban szerepet játszó FAAH-ot (fatty acid amide hydrolase) is.

A receptorok aktiválása tumorellenes hatású lehet melanómában, hiszen cannabinoidok alkalmazása csökkentette a sejtproliferációt és fokozta az apoptotikus folyamatokat (Blazquez és mtsai, 2006). Casanova és munkatársai (2003) leírták, hogy a cannabinoid receptorok stimulálása apoptosist indukált epidermális tumorsejtben, míg az egészséges sejtekre a vegyületeknek nem volt hatása. A CB2 funkcionális szerepét vizsgálva Ibrahim és munkatársai (2004) egy klinikailag nagyon fontos felfedezésre jutottak: a receptor stimulálása csökkenti az akut, gyulladásos és neuropathiás fájdalmat anélkül, hogy központi idegrendszeri mellékhatásokat okozna. A cannabinoid rendszer antinociceptív hatásáról számoltak be Johanek és munkatársai is

(2004): a CB1 receptor stimulálása lokálisan csökkentette a hőhatásra kialakuló hyperalgesiát, ugyanakkor feltehetőleg ez a hatás nem volt szisztémás, vagyis a cannabinoidok lokális alkalmazása hasznos fájdalomcsillapító lehet, hiszen nem fejlődnek ki a jól ismert központi idegrendszeri mellékhatások. A cannabinoidok emellett antipruriceptív hatással is rendelkeznek: a hisztamin által kiváltott viszketést csökkenti a cannabinoid agonista HU-210 alkalmazása (Dvorak és mtsai, 2003).

Mechanikai ingerek hatása a bőrre; mechanoszenzitív csatornák

A mechanikai ingerek érzékelésére számos sejt képes a szervezetben. Így a belsőfül szőrsejtjei, a simaizomsejtek egy csoportja, valamint a bőr Merkel-sejtjei számára az adekvát ingert a mechanikai nyomás fokozódása jelenti. A bőr esetében a mechanikai nyomás fokozódása tapintásérzetet vált ki. Tartós mechanikai hatásra azonban a bőr sejtjeinek hyperproliferációja következik be, amely különböző bőrelváltozásokhoz (hyperkeratosis) vezethet. A klinikai kép változatos lehet, attól függően, hogy mely testrészen és milyen hosszú ideig áll fenn a mechanikai stressz. Enyhébb esetben callus (a talpon, illetve a kézen), clavus (a lábujjak ízületei felett), subepidermális bulla (tenyereken, ujjakon) keletkezik, míg súlyosabb esetben akár decubitus is kialakulhat. Mechanikai hatásra számos jelátviteli folyamat aktiválódik a sejtekben, melynek összefoglalását mutatja be a 7. ábra (Reichelt, 2007).



7. ábra: A mechanotranszdukcióban résztvevő jelátviteli útvonalak keratinocytákban

A 7. ábrán feltüntetett folyamatok közül a leggyorsabban az úgynevezett mechanoszenzitív csatornák (MSC) aktiválódnak. A mechanoszenzitív csatornák egy része a mechanikai stresszhatás fokozódására aktiválódik, más részük ekkor válik inaktívvá. Számukra adekvát inger jelenthet az ún. „ciklikus stressz” (a szív -és simaizomsejtek váltakozó kontrahált és relaxált állapota), a nyíróerő fokozódása (a véráramlás sebességének növekedése), a disztenzió változása (a húgyhólyag falának feszülése), illetve a nyomóerők jelenléte (csont -és porcnövekedés). A mechanoszenzitív csatornák két csoportba oszthatók: az anioncsatornák Cl^- -ra, a kationcsatornák K^+ -ra, illetve Ca^{2+} -ra permeabilisek. Ezáltal a csatornák megnyílása megváltoztathatja a sejtek membránpotenciálját, illetve az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t (Sachs és Morris, 1998; Christensen, 1987; Sackin, 1995). Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megemelkedése számos további jelátviteli folyamatot indíthat el: aktiválhatja a foszfolipáz C (PLC) , illetve a protein kináz C (PKC) enzimeket, valamint elősegítheti a PKC α és δ izoenzimek citoplazmából membránba történő áthelyeződését (Takei és mtsai, 1997). Ezen mechanizmusok a keratinocyták fontos biológiai funkcióit befolyásolják: a proliferációt, illetve a differenciálódást (Kippenberger és mtsai, 2000; Dascalu és mtsai, 2000; Takei és mtsai, 1997; Yano és mtsai, 2004).

A mechanoszenzitív csatornák egy csoportja a sejtterfogot szabályozásában vesz részt (Christensen, 1987; Nilius és Droogmans, 2001). A sejtterfogot megváltoztatásának egyik módja a sejtet körülvevő oldat tonicitásának növelése, illetve csökkentése, mely csökkenti, illetve növeli a sejtterfogot. Ezáltal a fent említett MSC-k aktiválódását/ inaktiválódását okozza, mely változatos jelátviteli folyamatokat, s így biológiai válaszokat indít el a sejtekben.

Élettanilag az MSC-k megnyílásának egyik legjelentősebb hatása a Bayliss-effektus kialakulása. A vér áramlásának fokozódása és ezáltal az érfalra kifejtett mechanikai stresszhatás nyitja a mechanoszenzitív Ca^{2+} -csatornákat, melynek következtében megnő az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ és ennek hatására az érfalsimaizom összehúzódik. Így a véráramlás a mögöttes érterületen a növekvő artériás középnyomás ellenére változatlan marad.

Ugyanakkor nem ismert, hogy a mechanikai stressz milyen irányban változtatja meg a membránpotenciált, illetve a változások hátterében mely áramok aktivációja állhat. Ezenkívül arra vonatkozóan sem találtunk irodalmi adatokat, hogy a PKC rendszer aktivációja befolyásolja-e a fenti folyamatokat, illetve az MSC-k aktiválódása milyen irányban változtatja meg a keratinocyták proliferációját és differenciálódását.

PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

1. Korábbi munkánk során beszámoltunk a TRPV1-nek a humán szőrtüsző biológiai folyamataiban betöltött funkcionális szerepéről. Jelen kísérleteinkben először azt kívántuk vizsgálni, hogy mi a hasonlóság a humán és az egér bőr TRPV1 expressziója között. Ezt követően összehasonlítottuk a hajciklus időbeli változásait a két faj között, valamint (TRPV1 génhányos egerek vizsgálatával) azt elemeztük, hogy egérben hogyan változik a hajciklus TRPV1 hiányában.

2. Kísérleteink következő részében a cannabinoid receptorok (CB) expressziós mintázatát határoztuk meg a szőrtüszőben, valamint vizsgáltuk, hogy változik-e a receptorok expressziós mintázata a hajciklus különböző fázisaiban. Ezek után arra kerestük a választ, hogy a különböző cannabinoid vegyületek alkalmazása hogyan befolyásolja a folliculusok különböző biológiai funkcióit. Ennek során elemeztük az AEA, a 2-AG, illetve a Δ^9 -THC hatását a szőrszál elongációjára, a proliferációs és apoptotikus folyamatok jellegzetességeire, valamint a hajciklus eseményeinek időbeli alakulására. Végezetül azt vizsgáltuk, hogy a humán szőrtüsző növekedési mechanizmusának szabályozásában van-e kapcsolat a TRPV1 és CB rendszerek között.

3. Munkánk utolsó fázisában a mechanoszenzitív csatornák (MSC) aktivációjának hatását vizsgáltuk HaCaT keratinocytákon. Különböző hypotóniás stimulusok alkalmazásakor meghatároztuk a kialakuló membránpotenciál-változások mértékét, valamint azt, hogy ezen módosulások hátterében mely ioncsatornák megnyílása állhat. Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy az MSC-k aktiválódása hogyan szabályozza a sejtek proliferációs és differenciálódási állapotait.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Humán szőrtüszők izolálása és tenyésztése

A funkcionális kísérleteink alapjául szolgáló hajfollikulusokat plasztikai sebészeti operációk során visszamaradt, halántéki tájékról származó hajas fejbőrből izoláltuk, a bőrdarabok többnyire 50-80 éves női páciensektől származtak. A szőrtüszők eltávolítását és tenyésztését Philpott 1994-ben kidolgozott eljárása alapján végeztük. A fejbőrt elsőként kb. 0,5x1 cm-es szeletekre vágtuk, majd a bőr felszínével párhuzamosan eltávolítottuk az epidermist és a dermis nagy részét a dermis-subcutis határának közelében. Ezután a follikulusokat csipesz segítségével izoláltuk a subcutisból, majd az ép szőrtüszőket szelektáltuk. A follikulusok tenyésztése 24-lyukú tenyésztőedényben történt, kiegészített (2 mM L-glutamin, (Invitrogen, Paisley, UK), 10 ng/ml hidrokortizon, (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Németország), 10 µg/ml inzulin (Sigma) és antibiotikum-antimikotikum (Invitrogen)) Williams' E tenyésztőoldatban (Biochrom, Cambridge, UK) 37 °C-on, 5% CO₂-atmoszférában, 7 illetve 9 napon keresztül. A szőrtüszők hossznövekedését a fénymikroszkóp okulárjába beépített mikrométer -skála segítségével követtük nyomon, a szőrtüszőket naponta, egyesével mérve. Adott anyag hatásának vizsgálatát 18-24 follikuluson végeztük el, az adatok statisztikai elemzése Mann-Whitney teszttel történt. A tenyésztés végén a szőrtüszőket foszfát-pufferben (phosphate-buffered saline, PBS) történő mosás után Cryochrom fagyasztó médiumba (Thermo Shandon, Pittsburg, UK) ágyasztuk be, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, végül belőlük 8 µm vastagságú fagyasztott metszeteket készítettünk. A plasztikai sebészeti operációkból kapott bőrdarabok szolgáltak a teljes

bőrt reprezentáló 8 μm vastagságú fagyasztott metszetek készítésére is, melyeket az alább részletezett módon immunhisztokémiai technikák segítségével vizsgáltuk.

HaCaT keratinocyták tenyésztése

A HaCaT keratinocytákat 10% embrionális borjúsavót (Sigma) és antibiotikumokat tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle's tenyésztőoldatban (DMEM, Sigma) tenyésztettük a szőrtüszőknél már említett körülmények között.

A TRPV1 knockout egér

Kísérleteink egy részében B6.129S4 típusú, nőstény TRPV1 knockout egereket használtunk (Jackson Laboratory, Bar Harbor, MA, USA). A mutációt az egér TRPV1-et kódoló 11B3 kromoszómáján lokalizált génben hozták létre, ahol az ötödik transzmembrán domén egy részében, a hatodik transzmembrán domén egészében, valamint a köztük levő hurkot kódoló exonban indukáltak mutációt (Caterina és mtsai, 2000). Az egerek szőrét a háti területről epilálással eltávolítottuk, és így indukáltuk a hajciklus kezdeti stádiumát. A TRPV1 expressziójában bekövetkezett változásokat a morfológiai ciklus 45. napjáig követtük (P1-P45) nyomon. A hát bőrét a ciklus különböző stádiumaiban eltávolítottuk és belőle 8 μM vastagságú, acetone-fixált, fagyasztott metszeteket készítettünk. Kontrollként azonos korú, C57BL/6 vad típusú egereket használtunk. A morfológiai stádiumba való besoroláshoz az összesített hajciklus-pontot számítottuk ki.

Szövetteni és morfológiai vizsgálatok

Az izolált és tenyésztett humán szőrtüszőkből 8 µm vastagságú fagyasztott metszeteket készítettünk, szárítottuk, majd -20°C-on acetonban fixáltuk. A szőrtüszők morfológiai vizsgálatára a metszeten haematoxylin-eozin festést végeztünk. A folliculusokat meghatározott morfológiai kritériumok alapján soroltuk a megfelelő stádiumba (anagén, katagén).

Immunhiszto- és -citokémia

A CB1, illetve CB2 izolált szőrtüszőn való kimutatására, valamint a TRPV1 expressziójának kontroll, illetve knockout egéren való meghatározására a tyramide-substrate amplification (TSA) (Botchkarev és mtsai, 2000; Ito és mtsai, 2004) és az alkalikus foszfatáz alapú ABC (Panteleyev és mtsai, 1999) módszereket használtuk. A TSA eljárás során az endogén peroxidázok gátlását (3% H₂O₂ PBS-ben) követően a nem -specifikus kötődéseket DAKO Protein Block (DAKO) és TNB oldatokkal (TSA kit, PerkinElmer, Boston, MA, USA) blokkoltuk. Az elsődleges CB1, CB2, illetve TRPV1-ellenes antitesttel egy éjszakán át inkubáltuk a metszeteket. Ezután a biotinilált másodlagos kecske/egér/nyúl-ellenes disznó IgG-vel (1:200, DAKO) való 45 perces inkubálás, majd a streptavidin-konjugált torna-peroxidázzal (1:100 TNB pufferben, TSA kit) való jelölés következett. A jelerősítés utolsó lépéseként a metszeteket TRITC-tyramiddal (1:50 Amplification Diluent-ben, TSA kit) inkubáltuk 5 percig, majd magfestést végeztünk (DAPI, 1 µg/ml, Boehringer Mannheim, Mannheim, Németország).

Az immunhisztokémiai vizsgálataink során felhasznált antitestek, azok eredete, alkalmazott hígításuk, valamint az immunhisztokémiai módszerek összefoglalása az **1. táblázat**ban található.

1. táblázat: Az immunhisztokémiai vizsgálatok során felhasznált elsődleges antitestek

<u>Alkalmazott antitest</u>	<u>Eredet</u>	<u>Faj</u>	<u>Epitóp</u>	<u>Alkalmazott hígítás</u>	<u>Alkalmazott módszer</u>
CB1	Santa Cruz BT	kecske	N-terminális vég	1:400 1:40	TSA ABC-AP
CB1	Santa Cruz BT	kecske	C-terminális vég	1:400 1:40	TSA ABC-AP
CB2	Cayman Chemical	nyúl	N-terminális vég	1:400 1:40	TSA ABC-AP
CB2	Santa Cruz BT	kecske	C-terminális vég	1:400 1:40	TSA ABC-AP
Ki-67	DAKO	egér		1:20	Immunfluoreszcens
TRPV1	Santa Cruz BT	kecske	C-terminális vég	1:500 1:50	TSA ABC-AP

ABC: avidin-biotin komplex, AP: alkalikus foszfatáz, TSA: tyramide signal amplification)

Az ABC-módszer alkalmazása során a 10%-os disznó normál szérummal (PBS-ben, DAKO) történő előinkubáció után az elsődleges CB1, CB2 valamint TRPV1-ellenes antitestet egy éjszakán keresztül alkalmaztuk. A biotinilált kecske/egér/nyúl-ellenes, disznóban termeltetett másodlagos antitest (1:200, DAKO) használatát követően streptavidin-alkalikus foszfatáz jelölést használtunk. Az immunhisztokémiai jelölést a

Fast Red (Sigma) segítségével tettük láthatóvá, melyet a hematoxilinnel történő magfestés zárt le.

A tenyésztett szőrtüszőkön a proliferáló és az apoptotikus sejtek egyidejű kimutatására a Ki-67/TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) kettős festést használtuk (Foitzik és mtsai, 2000; Lindner és mtsai, 2000). Az eljárás során az osztódó sejtek jelenlétéről a Ki-67 proliferációs marker immunhisztokémiai kimutatása ad felvilágosítást, az apoptotizált sejtek megjelenítése pedig a DNS-fragmentáció során keletkezett szabad 3' végek jelölésén alapul. A kettős festéshez a fagyasztott metszeteket 1%-os paraformaldehidben és etanol-jégetet 2:1 arányú oldatában fixáltuk. Első lépésként a metszeteket reakciópuffer–terminális deoxinukleotidil transzferáz (TdT) enzim (mindkettő ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit, Intergen, Purchase, NY, USA) 70-30%-os elegyével inkubáltuk 37 °C-on 60 percen keresztül, mely során a TdT enzim a reakciópufferben található digoxigenin jelölt nukleotidokat az apoptotikusan fragmentált DNS 3' OH végeihez kapcsolta. A reakció leállítása és 10%-os kecske normál szérumos (DAKO, PBS-ben) kezelést követően a metszeteket egy éjszakán át inkubáltuk egérben termeltetett Ki-67 ellenes antitesttel (1:20, 2% kecske normál szérum jelenlétében). Utolsó lépésként a digoxigenin-jelölt DNS-fragmentumokhoz FITC-konjugált digoxigenin-ellenes antitestet kapcsoltunk (TUNEL kit), a Ki-67 ellenes antitesthez pedig rodaminnal jelölt kecske-ellenes IgG-t (1:200, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, + 2% kecske normál szérum, DAKO) kötöttünk, végül DAPI-val magfestést végeztünk. A TdT enzim, illetve a Ki-67 ellenes antitest elhagyása szolgált a festés negatív kontrolljaként.

Összehasonlító hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálataink során a festések színintenzitásbeli különbségeinek mérésére az Image Pro Plus 4.5.0 szoftvert (Media

Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) használtuk. A kvantifikálás során csoportonként 18-24 follikulus előre meghatározott, rögzített nagyságú területeinek intenzitását mértük, majd feltüntettük és összehasonlítottuk azok átlagát.

Masson-Fontana festés

A follikulusok melanintartalmának meghatározására Masson-Fontana festést végeztünk. Ennek során a metszeteket etanol- ecetsav 2:1 arányú elegyében 10 percig fixáltuk, majd TBS pufferben történő mosást követően 10%-os ezüstnitrátoldatban 40 percig inkubáltuk 56°C-on, sötétben. Ezt követően 5%-os nátriumtioszulfát oldatban tartottuk a metszeteket 1 percig, végül haematoxilinnel magfestést végeztünk.

Kvantitatív PCR (Q-PCR)

A Q-PCR kivitelezése az ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével, az 5' nukleáz módszer felhasználásával történt. A teljes RNS-t 100-200 darab frissen izolált szőrtüszőből TRIzol reagens (Invitrogen, USA) segítségével vontuk ki a gyártó cég instrukcióit követve. A teljes RNS 3 µg-jából kiindulva 15 U AMV reverz-transzkriptázt (Promega) és 0.025 µg/µl random primert (Promega) felhasználva állítottunk elő cDNS-t. A PCR amplifikációt TaqMan primerek és próbák alkalmazásával végeztük (Assay ID: Hs00275634_m1 a humán CB1 esetében, Assay ID: Hs00361490_m1 humán CB2 esetében), a TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol (Applied Biosystems) alapján. Belső kontrollként a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz szolgált (GAPDH, Assay ID: Hs99999905_m1 humán GAPDH esetében). A CB-receptor specifikus transzkriptumot GAPDH-ra normáltuk, a $\Delta\Delta CT$ módszer segítségével.

A folliculusok endogén cannabinoid tartalmának meghatározása

Frissen izolált, kb. 50 mg tömegű folliculust 7 ng ²H₄-anandamidot tartalmazó, metanol:Tris puffer 1:1 arányú elegyével homogenizáltuk. A homogenizátumhoz kloroform:metanol 1:1 arányú keverékét adtuk hozzá. Centrifugálást és a vizes fázis kétszeres kloroformos tisztítását követően a csapadékot megszártítottuk, majd acetont adtunk hozzá. A kicsapódott proteinekét tovább centrifugáltuk és szárítottuk, majd metanolban felvettük és kromatográfiás eljárás során elválasztottuk az endogén cannabinoidokat. A kromatográfiás méréshez Agilent 1100 sorozatszámú, LC-MSD készüléket használtunk. A készülék az AEA, a ²H₄-AEA és a 2-AG mennyiségét mérte. A szőrtüsző AEA és a 2-AG tartalmának meghatározására fordított lineáris regressziós eljárást alkalmaztunk. A kapott értékeket fmol/mg és pmol/mg nedves szövet mértékegységben adtuk meg.

Kvalitatív és kvantitatív hisztomorfometria

A kontroll és knockout egerek folliculusainak hajciklus-stádiumai közötti különbségeket kvantitatív és kvalitatív hisztomorfometria segítségével határoztuk meg.

A kvantitatív hisztomorfometriai vizsgálatokhoz elegendő számú (kontroll és knockout egérből származó szőrtüszők, minimum 20-20 darab) longitudinálisan metszett folliculus hajciklus-stádiumát határoztuk meg adott morfológiai kritériumok szerint (lásd a bevezetőben az anagén, katagén, telogén folliculusok elkülönítéséről szóló fejezetet). Ennek alapján az anagén fázisú szőrtüszők I-VI-ig, a katagén fázisú szőrtüszők I-VIII-ig terjedő stádiumba sorolhatók, míg a telogén fázist nem különítjük el további stádiumokra.

A kvantitatív meghatározást tovább lehet pontosítani az úgynevezett „kumulatív hajciklus pont” kiszámításával (kvalitatív hisztomorfometria). Ennek során a különböző stádiumban levő follikulusokhoz hozzárendelünk egy pontértéket (például anagén I= 1 pont), és az így kapott értéket megszorozzuk egy stádiumnak megfelelő szorzóval. Ekkor anagén fázisú follikulus esetén 1-6-ig, katagén fázisú esetén 1-8-ig terjedő értéket kapunk.

Alkalmazott oldatok

A HaCaT keratinocyták hipotóniás stressztűrésének vizsgálatára a sejteket a mérések előtt 30 percig szobahőmérsékleten normál Tyrode-oldatban (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 11,8 mM Hepes-NaOH, 1 g/L glükóz, pH=7,4) tartottuk. Ezt követően a sejteket módosított Tyrode-oldatba tettük, amelyben a NaCl tartalom felét Na-glutamáttal helyettesítettük. Különböző hipotóniás oldatok alkalmazásával vizsgáltuk a sejtek stressztűrését, ahol az oldatok ozmolalitása a Na-glutamát felének, illetve egészének eltávolítása után rendre 75%-ra (TY75), illetve 50%-ra (TY50) csökkent. A kalciummentes oldat előállításakor a Tyrode-oldatot 1 mM EGTA-val egészítettük ki és kihagytuk a CaCl₂-ot.

A hipotóniás stressz proliferációra és differenciálódásra kifejtett hatásának vizsgálatokor három különböző tenyésztőoldatot használtunk. A hipotóniás tenyésztőoldat (LS50) esetében a normál tenyésztőoldat térfogatának felét desztillált vízzel pótoltuk. Mivel így az oldat szérumtartalma lecsökkent és ez önmagában is megváltoztathatja a sejtek proliferációját/differenciálódását, ezért kontrollként csökkentett szérumtartalmú médiumot alkalmaztunk (LS): ekkor desztillált víz helyett

Tyrode-oldatot használtunk, így az LS oldat izotóniás maradt, ugyanakkor szérumtartalma a felére csökkent és megegyezett az LS50-ével.

Patch clamp és konvencionális mikroelektródás mérés

A hipotóniás stressz nyugalmi membránpotenciálra, a sejtmembránon átfolyó áramokra, valamint a kloridáramra kifejtett hatását feszültség-clamp technikával, egész-sejt konfigurációban vizsgáltuk. A mérésekhez Axopatch 200A (Axon Instruments, CA, USA) típusú erősítőt használtunk. A 2-3 M Ω ellenállású pipettákat 110 mM K-Aszpartát, 20 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 5 mM HEPES és 2 mM MgATP-tartalmú belső oldattal töltöttük fel, ahol az oldat pH-ját 7.3-ra állítottuk be. A Ca²⁺-aktivált áramok vizsgálatakor 5 mM BAPTA-t alkalmaztunk az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció emelkedésének kivédésére. A passzív elektromos tulajdonságok vizsgálatakor a sejteket 5 mV nagyságú, 40 ms időtartamú impulzussal ingereltük. A tartási potenciált -40 mV-ra állítottuk, a sejtek lineáris kapacitása 20 és 40 pF között változott. Az elektromos jeleket 1 kHz frekvenciával rögzítettük (Digidata 1200, Axon Instruments), majd az elemzést pClamp 6.0.4 szoftver (Axon Instruments) segítségével végeztük.

A transzmembrán potenciálváltozásokat konvencionális mikroelektróda technikával detektáltuk. Ennek során üveg mikroelektródákat töltöttünk fel 3 mM KCl-al, a pipettahegy ellenállása 25 és 30 M Ω között változott. Az elektródákat Axoclamp-2B erősítő bemenetéhez csatlakoztattuk. A jeleket 100 kHz frekvenciával, Digidata 1200 rendszer segítségével rögzítettük.

Western (immuno) blot analízis

Az involukrin, filaggrin és transzglutamináz protein szintű kimutatását a laboratóriumunkban általában alkalmazott protokollnak megfelelően (Bíró és mtsai, 1998a; Boczán és mtsai, 2000; Papp és mtsai, 2003; Lázár és mtsai, 2003) az alábbiak szerint végeztük. A tenyésztett sejteket hideg PBS-ben mostuk, majd lízis-pufferben (20 mM TRIS-HCl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid, 20 μ M leupeptin, pH 7,4 (Sigma)) homogenizáltuk, végül jégen ultrahangos feltárást végeztünk. Az így nyert lizátumok proteintartalmát módosított BCA protein assay-vel (Pierce, Rockford, IL, USA) határoztuk meg. A fehérjetartalmat 2 mg/ml-re állítottuk be (a minta végtérfogatában 5% β -merkaptoetanol, 10% glicerin, 2% SDS, 0,062 M TRIS, 20 mM dithiothreitol, 0,002% brómfenolkék volt; mind a Sigmától), majd 10 perces főzéssel denaturáltuk, végül felhasználásig -20°C -on tároltuk a mintákat. Kísérleteink során SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE), mintánként 20-30 μ g proteint választottunk szét 8%-os gélen 100 V konstans feszültséggel. Ezután a fehérjéket nitrocellulóz membránra (BioRad, Wien, Austria) transzferáltuk, 2x45 percen keresztül, 100 V konstans feszültséggel. A membrán szabad kötőhelyeit 5% sovány tejport tartalmazó PBS-ben (5% tej-PBS) 30 percig blokkoltuk. Ezután a membránokat 5%-os tej-PBS-ben hígított elsődleges involukrin, filaggrin és transzglutamináz-ellenes antitesttel (1:100) inkubáltuk egy éjszakán át. A membránok 30 perces mosását (PBST, 0,1% Tween-20 PBS-ben, Sigma) követően azokat kecskében termeltetett egér-ellenes, másodlagos, torma-peroxidázzal kapcsolt antitesttel (1:1000, BioRad) inkubáltuk 45 percen keresztül. Újabb, PBST-ben elvégzett mosást követően az immunreakciók eredményét kemilumineszcens módszerrel, ECL Western blot detektáló kittel

(Amersham, Little Chalfont, UK) tettük láthatóvá, amit röntgenfilmen rögzítettünk (AGFA, Brussels, Belgium).

Intracelluláris kalciummérés

Az intracelluláris kalciumkoncentráció változásának mérésére a következő protokollt használtuk. A fedőlemezre szélesztett keratinocytákat 5 μM kalcium érzékeny fluoreszcens fura-2 festék acetoximetilészter formájával (fura 2-AM, Invitrogen) 60 percig inkubáltuk 37°C-on. A fura 2-AM-el feltöltött sejteket tartalmazó fedőlemezeket ezután invertáló fluoreszcens mikroszkóp (Diaphot, Nikon, Tokió, Japán) tárgyasztalára helyeztük. Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk kettős monokromátor, valamint on-line kapcsolt számítógép segítségével (PTI Deltascan készülék), majd a fluoreszcens emissziót 510 nm-en detektáltuk 10 Hz-es mintavételi frekvenciát használva egy fotoelektron-sokszorozóval. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban bekövetkezett változásokat Grynkiewicz és munkatársai (1985) által kidolgozott módszerrel vizsgáltuk. Meghatároztuk a 340 (F_{340}) és 380 nm-en (F_{380}) történő gerjesztés hatására emittált fluoreszcenciaintenzitás-hányadosokat ($R = F_{340}/F_{380}$). Felhasználva a disszociációs konstans (K_D), a minimális (R_{\min}) és maximális (R_{\max}) ráció értékeket, valamint az emittált fluoreszcencia hányados értékeit nulla ($F_{380}[0]$) és a festéket szaturáló ($F_{380}[\text{Ca}]$) kalciumkoncentrációnál, a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ az alábbi képlet segítségével volt számolható:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \cdot (F_{380}[0]/F_{380}[\text{Ca}]).$$

Kalibrációs kísérleteinkben a K_D -t 76 nmol/l-nek találtuk $R_{\min} = 0,42$, $R_{\max} = 8,6$ és $F_{380}[0]/F_{380}[\text{Ca}] = 15,3$ értékek mellett.

Az élő sejtszám vizsgálata

A mechanikai stressz, illetve a tenyésztőoldat szérumtartalmának változása befolyásolja az élő sejtszámot. Ezen hatást MTT alapú proliferációs assay segítségével határoztuk meg. A módszer alapja, hogy az élő sejtek mitochondriális dehidrogenáz enzimje az MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium bromid) tetrazolium gyűrűjét hasítja és vízben oldhatalan formában kristályok keletkeznek, melyek mennyisége kolorimetriásan mérhető. A sejteket 96-lyukú multiwell plate-eken 50 μ l DMEM tápoldatban 5000 sejt/well sűrűségben szélesztettük. A plate-eket a tenyésztési körülményeknek megfelelően helyeztük el, s a kitapadást követően a sejteket normál, illetve csökkentett szérumtartalmú oldatban kezdtük el tenyészteni. A kontroll kísérletek során a sejteket 12 napon keresztül a fenti tápoldatokban tenyésztettük. A hypotóniás stressz hatásának tanulmányozása esetén, amennyiben a kiindulási oldat NS volt, a tenyésztés 6. napján lecseréltük LS, LS50-re, míg LS oldat kezdetben történő alkalmazásakor LS50, illetve NS oldatra váltottunk. Az élő sejtszám változásait a 2.,4.,6.,8.,10. és 12. napon mértük le. A sejteket MTT oldattal 3 óráig 37°C-on inkubáltuk, majd az MTT oldat eltávolítása után a well-ekbe MTT szolubilizáló oldatot (81% izopropanol, 9% 1M HCl, 10% Triton X-100) pipettáztunk. 10 perc szobahőmérsékleten való rázatás után 550 nm-en kolorimetriás mérést végeztünk.

Statisztikai elemzések

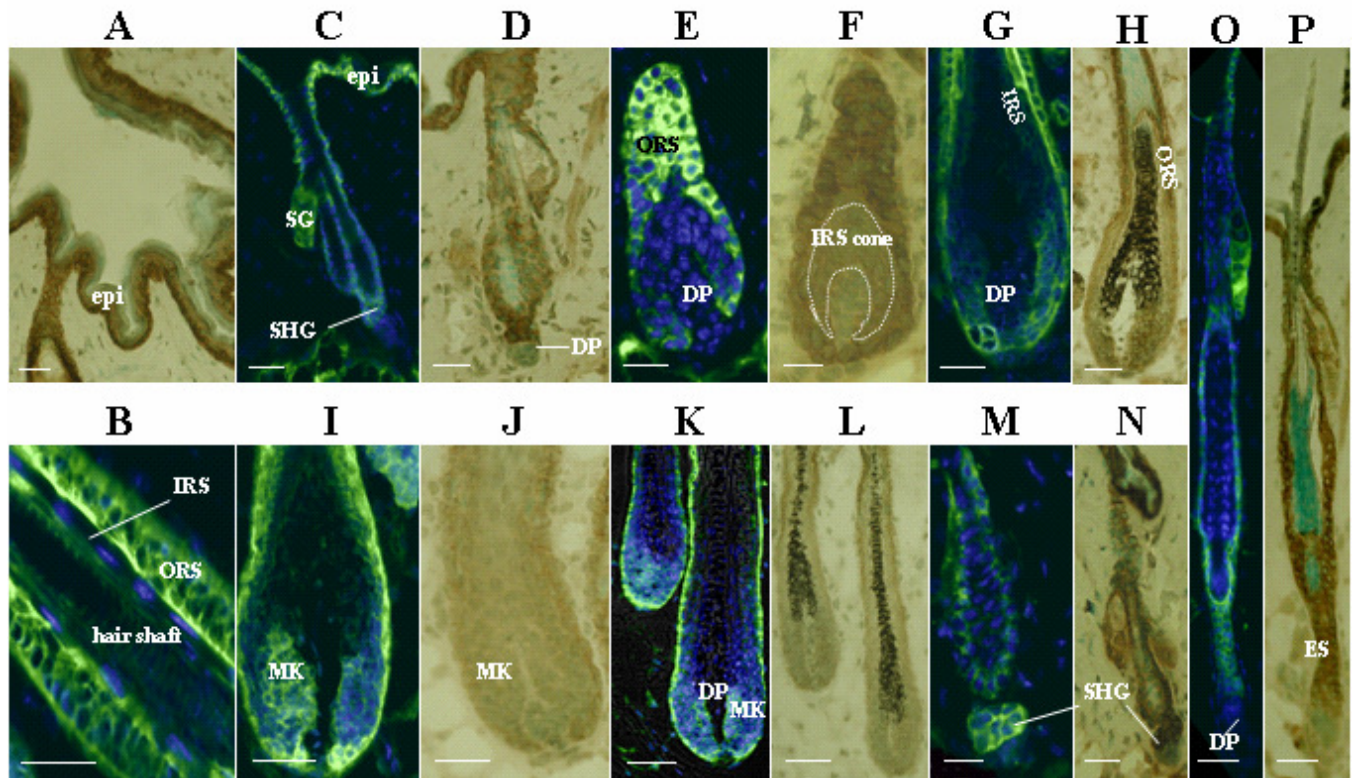
Mérési eredményeinket átlag \pm SEM formában adtuk meg. Az adatok statisztikai kiértékelésére és összehasonlítására 5%-os szignifikancia szinttel dolgozva a Student-féle t-tesztet alkalmaztuk.

EREDMÉNYEK

A TRPV1 szerepe a hajciklus szabályozásában; a hajciklus fázisainak időbeli változása TRPV1 knockout egerekben

A TRPV1 expressziója hajciklus -függő változást mutat egérben

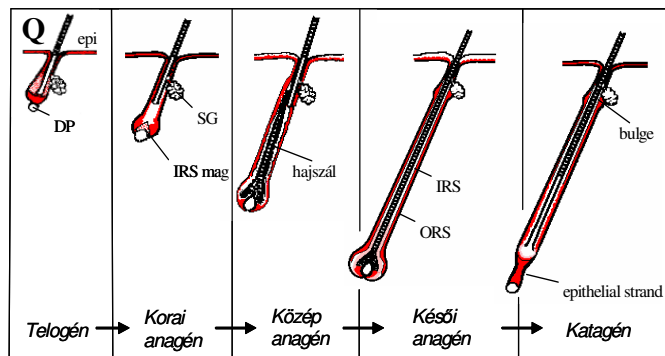
Kísérleteink során először a TRPV1 hajciklus-függő expresszióját vizsgáltuk egér bőrben valamint folliculusban. Hasonlóan a humán eredményekhez (Bodó és mtsai, 2004 és 2005) azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú egerek bőrében, elsősorban a bazális epidermis rétegében, jelentős a TRPV1 expresszió **(8/A ábra)**. A humánhoz hasonló mintázat látható a folliculusban is, hiszen az epithelialis eredetű rétegekben jelentős TRPV1 immunreaktivitást figyeltünk meg, míg a hajszál és a dermális papilla TRPV1 negatívnak bizonyult **(8/B, F, K, G ábra)**. Hasonlóan a humán szőrtüszőben kapott adatokhoz, egérben is a legerőteljesebb TRPV1-ir-t a katagén fázisú folliculusok epithelialis részében **(8/O, P ábra)**, valamint a telogén folliculusok másodlagos hajcsírájában figyeltünk meg **(8/C, D, M, N ábra)**. Az anagén fázisú, legerőteljesebben proliferáló epithelialis réteg csökkent TRPV1 expressziót mutatott, míg az IRS és a disztális, prekortikális mátrix keratinocyták csak alig detektálható TRPV1-ir-t mutattak **(8/B, E, I, L ábra)**. Ez alól csak az anagén VI-os fázisú folliculus asszimmetrikus, lemez alakú mátrix keratinocytáiban megjelenő erőteljesebb TRPV1-ir volt kivétel **(8/I, K ábra)**.



8. ábra: A TRPV1 expresszió változása a hajciklus során egérben

(**A**) TRPV1 immunoreaktivitás az epidermális keratinocytákban. A legerőteljesebb expresszió a bazális rétegben figyelhető meg (epi: epidermis). (**B**) Erőteljes TRPV1-ir a külső gyökérhüvelysejtek (ORS) rétegében. A belső gyökérhüvelysejtekben (IRS) és a hajszálban nincs kimutatható TRPV1 expresszió az anagén fázisú folliculusban. (**C-P**) A TRPV1-ir változása depiláció indukálta ciklus során. (**C-D** és **M-N**) Telogén fázisú szőrtüszők: a legintenzívebb festődést a másodlagos hajcsírában figyeltünk meg (SHG). A dermális papillában (DP) az egész ciklus során nem volt detektálható TRPV1-ir. A faggyúmirigyben (SG) megfigyelhető fluoreszcens festődés nem-specifikus reakció eredménye. (**E-F**) Korai anagén fázisú folliculusok. A legintenzívebb festődés az ORS-ben található, valamivel gyengébb az IRS festődése. (**G-H**) Közép- anagén folliculusok. (**I-L**) Késői anagén folliculusok. TRPV1-ir az ORS keratinocytákban és az aszimmetrikus, lemez alakú mátrix keratinocytákban (MK). Az IRS rétegben csak gyenge TRPV1 festődést tapasztaltunk. (**O-P**) A katagén fázisú folliculusokban a legerőteljesebb expresszió az epithelialis keratinocyták rétegében található. (**A, D, F, H, J, L, N, P**) Peroxidáz alapú ABC módszer DAB szubsztráttal. (**B, C, E, G, I, K, M, O**) TSA technikával történt festés FITC jelöléssel.

Fenti megfigyeléseinket egy sematikus ábraszorozatban foglaltuk össze (**9. ábra**). Az ábrán a TRPV1-ir-t piros színnel jelöltük. Látható, hogy a TRPV1 expressziója fokozódik a katagén fázisú folliculusok epithelialis strand rétegében, az ORS réteg a hajciklus valamennyi fázisában viszonylag erőteljes TRPV1-ir-t mutat. Ugyanakkor az IRS és a disztális, prekortikális mátrix keratinocyták csak halványan expresszálják a TRPV1-et, míg a hajszál és a DP nem mutat TRPV1-ir-t.

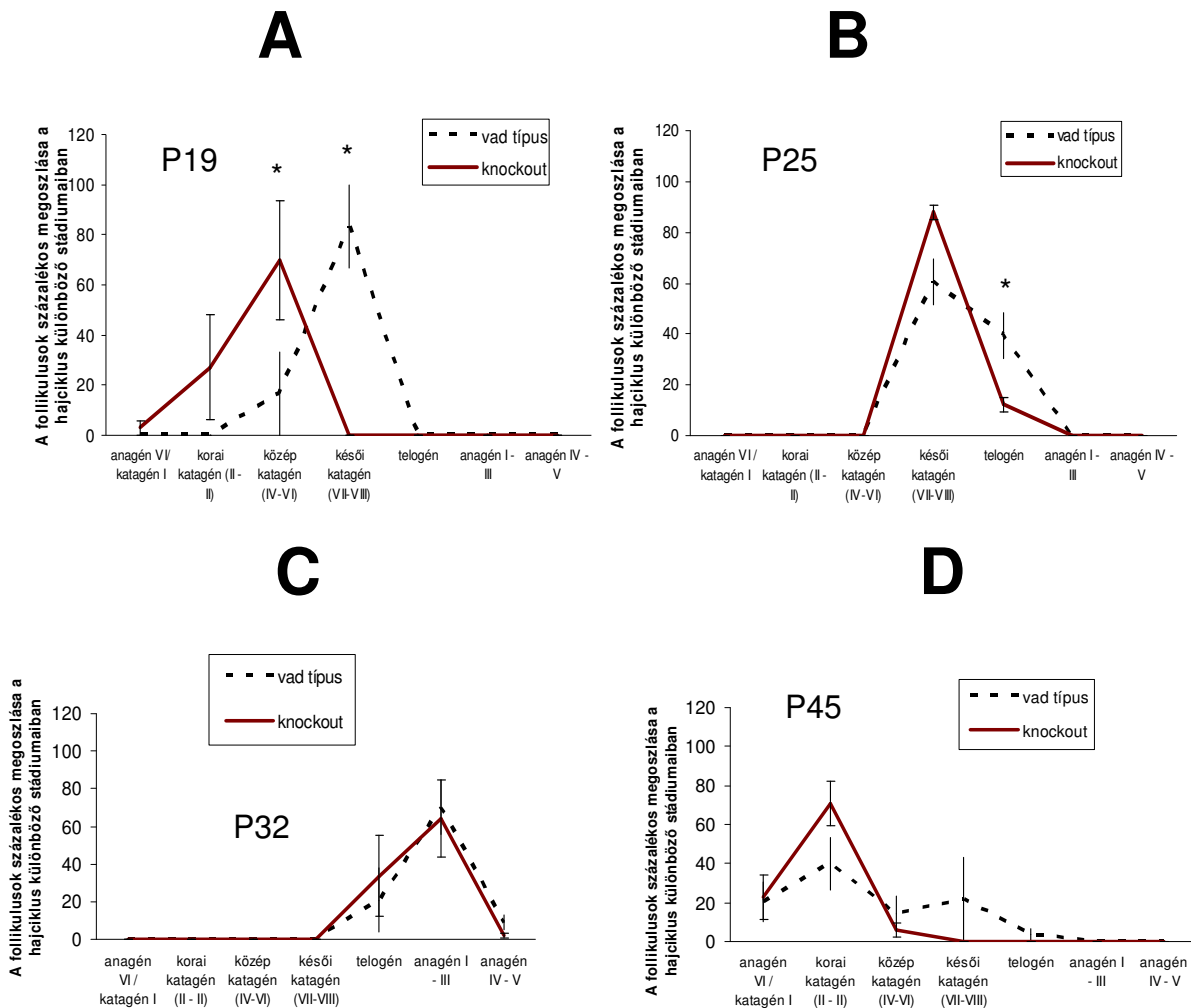


9. ábra: A TRPV1-ir sematikus ábrázolása a ciklus során

A TRPV1 hiánya késlelteti a folliculusok katagén és telogén transzformációját egérben

Ezután kvantitatív hisztomorfometria segítségével összehasonlítottuk a hajciklus időbeli lefolyásában bekövetkező változásokat kontroll, valamint TRPV1 knockout egerekben (**10. ábra**). Azt találtuk, hogy a 19. napig nincs kimutatható makroszkópos, illetve mikroszkópos különbség a vad típusú és a knockout egerek között. Ezt követően azonban azt figyeltük meg, hogy míg a vad típusú egerek folliculusai a 19. napon már beléptek a morfogenezis 8. stádiumába, ami megfelel a katagén transzformációnak, addig a knockout állatok folliculusai ehhez képest szignifikáns késést mutattak (**10/A ábra**). Szintén késést a knockout állatok szőrtüszőinek telogén transzformációja a vad típusúakhoz képest (a ciklus 25. napján, **10/B ábra**). Ugyanakkor az első spontán

anagén fázisba történő átmenetben (a ciklus 32. napja), valamint az ezt követő hajciklusban (a ciklus 45. napja) nem volt szignifikáns különbség a kontroll és a TRPV1-et nem expresszáló állatok follikulusai között (**10/C, D ábra**). Fenti eredményeinket alátámasztottuk a kumulatív hajciklus pont kiszámításával is (nem prezentált adatok).



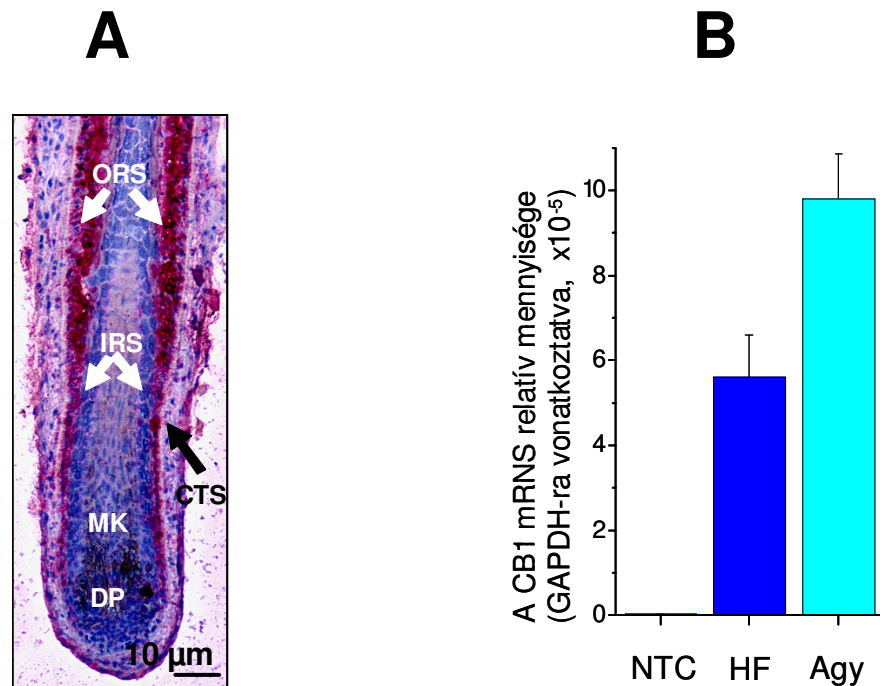
10. ábra: A TRPV1 hiánya eltolódott katagén átalakulást okoz egér follikulusban

A spontán hajfollikulus- ciklus stádiumainak összehasonlítása azonos korú vad típusú és TRPV1 knockout egérben kvantitatív hisztomorfometria segítségével. Csoportonként és időpontonként legalább 3 vad típusú és 3 knockout egeret hasonlítottunk össze. Ezután a follikulusokat meghatározott morfológiai kritériumok szerint besoroltuk a megfelelő hajciklus stádiumba. A TRPV1 knockout egerekben a katagén átalakulás szignifikáns késést mutatott a vad típusú egerekhez képest a ciklus 19. napján (P19) (**A**). Ugyancsak késést mutatott a telogén átalakulás a knockout egerekben a ciklus 25. napján (P25) (**B**). A ciklus 32. (P32) és 45. (P45) napján nem találtunk szignifikáns különbséget a vad típusú és a knockout egerek follikulusainak hajciklus stádiumában (**C, D**). Az adatokat átlag \pm SEM formában tüntettük fel. *: szignifikáns eltérés ($p < 0,05$).

Az AEA szerepe a humán hajfollikulus biológiai folyamatainak szabályozásában

A CB1 mind protein, mind mRNS szinten kifejeződik a humán follikulában

Kísérleteink első szakaszában a CB1 és CB2 receptorok follikuláris expresszióját vizsgáltuk meg. Ennek során jelentős CB1-immunreaktivitást sikerült kimutatni az anagén fázisú szőrtüszőben (**11. ábra**), míg a CB2 jelenlétét nem sikerült kimutatnunk (nem prezentált adat).



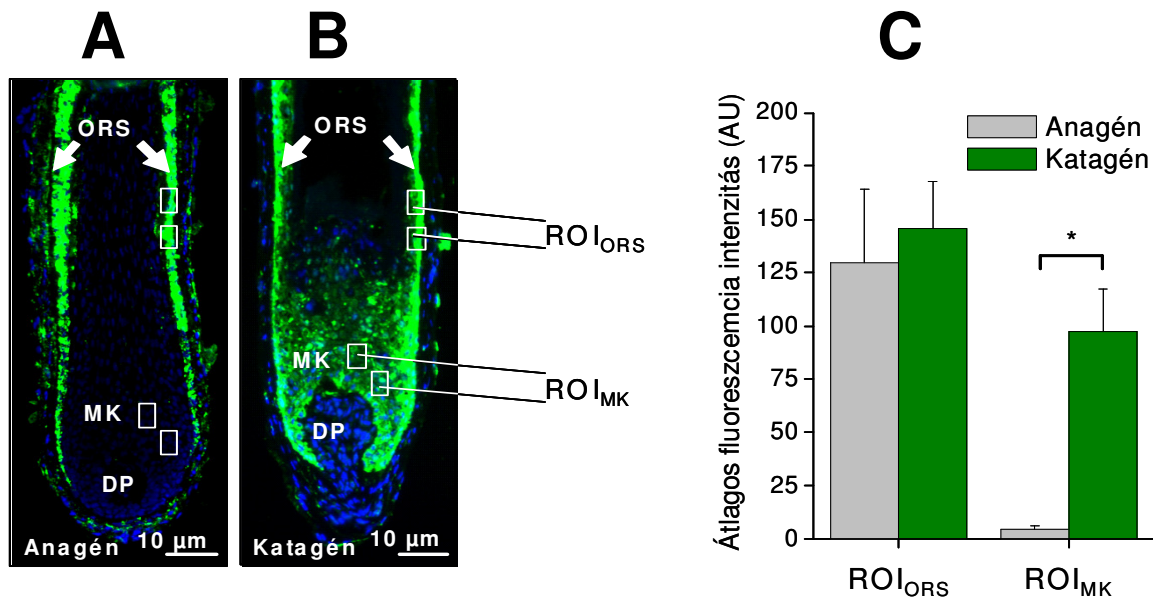
11. ábra: A CB1 protein, illetve mRNS szintű kimutatása tenyésztett humán szőrtüszőben

(**A**) Az anagén fázisú humán szőrtüszőben a külső gyökérhüvely keratinocyták (ORS) rétege erőteljes CB1 pozitivitást mutat, mely a follikulus disztális része felé haladva fokozódik. A belső gyökérhüvely sejtekben (IRS), valamint a follikuláris kötőszöveti rétegben (CTS) az előzőtől gyengébb CB1-ir-t tapasztaltunk. A mátrix keratinocyták (MK), valamint a dermális papilla (DP) CB1 negatívnak bizonyultak. A festés alkalikus foszfatáz technikával készült. (**B**) A CB1 expresszió Q-PCR-al történő kimutatása izolált humán hajfollikulában. A CB1-expressziót az azonos szövetből izolált GAPDH expressziójára vonatkoztattuk. NTC: templát cDNS nélküli (negatív) kontroll; HF: szőrtüsző; pozitív kontrollként humán agyat használtunk. Az értékeket átlag \pm SEM formában adtuk meg, a mérések négyszeri ismétlésével.

A CB1 expressziós mintázatban különbséget találtunk az egyes kompartmentek között: a legintenzívebb festődést az ORS keratinocyták rétegében detektáltunk, az intenzitás a folliculus disztális része felé haladva növekedett. Az ORS-tól kisebb mértékű CB1 expressziót figyeltünk meg az IRS keratinocyták, valamint a CTS rétegében. Ezzel ellentétben a dermális papilla, illetve a mátrix keratinocyták rétege CB1 negatívnak bizonyult. Eredményeinket Q-PCR technika felhasználásával kívántuk alátámasztani, melynek során a CB1-et sikerült mRNS szinten is kimutatni a folliculusban. Ugyanakkor az immunfestéssel összhangban nem találtunk CB2 mRNS-t a szőrtüszőben (nem prezentált adat). Pozitív kontrollként humán agyat használtunk.

A CB1 expresszió katagén fázisban fokozódik

Kísérleteink következő részében arra voltunk kíváncsiak, hogy változik-e a CB1 expresszió a hajciklus fázisaiban. Ennek megválaszolására interferon- γ -val kezeltük a szőrtüszőket, mely egy jól ismert katagén induktor (Ito és mtsai, 2005), majd TSA technikával immunfestést végeztünk mind anagén, mind katagén folliculusokon (**12. ábra**). Azt tapasztaltuk, hogy katagén fázisban fokozódott a CB1 expresszió. Ez különösen a mátrix keratinocytákban volt megfigyelhető, amely azért bír nagy jelentőséggel, mert ebben a régióban anagén fázisban nem tapasztaltunk CB1 immunoreaktivitást. Ezen eredményt támasztotta alá a fluoreszcencia-intenzitás analízise is: míg a FITC-pozitív területeken a fluoreszcens jel intenzitása az ORS keratinocytáknál nem változott jelentősen a katagén transzformáció során, addig a mátrix keratinocytákban ez az érték szignifikáns emelkedést mutatott. A szőrtüsző többi kompartmentjében nem tapasztaltunk változást a CB1-immunreaktivitás (CB1-ir) szintben az anagén fázishoz képest.



12. ábra: A CB1 immunoreaktivitás összehasonlítása anagén és katagén fázisú szőrtüszőben

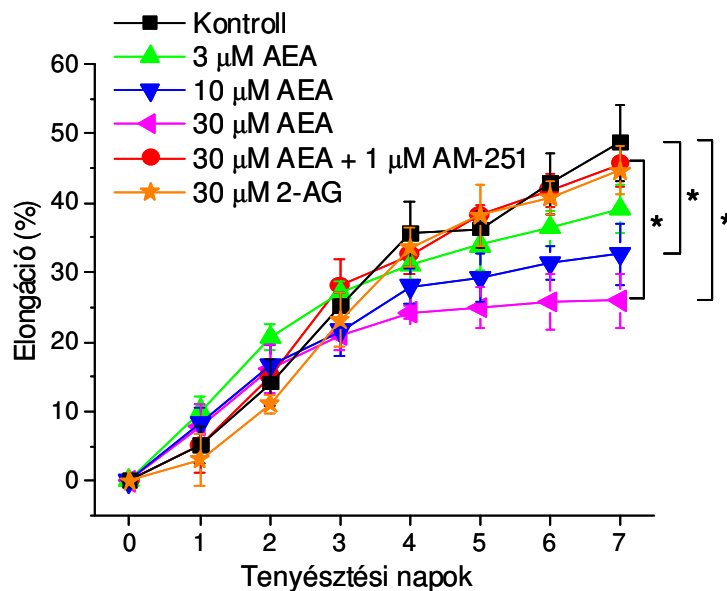
(**A**) CB1 immunoreaktivitás anagén fázisú szőrtüszőben: CB1 pozitív belső gyökérhüvely keratinocyták (ORS) valamint CB1-et nem expresszáló mátrix keratinocyták (MK) és dermális papilla (DP). (**B**) CB1 immunoreaktivitás 1000 IU/ml IFN γ indukálta katagén fázisú follikulusban: CB1 pozitív ORS valamint MK sejtek (a DP katagén fázisban is CB1 negatív maradt). (**C**) CB1-specifikus fluoreszcencia intenzitás anagén (szürke) és katagén (zöld) fázisú szőrtüszők ORS illetve MK sejteiben. A fluoreszcencia intenzitást follikulusonként 5-5 területen (ROI) mértük, egy csoportba 18-24 follikulus tartozott. A festések TSA technikával készültek. Az értékeket átlag \pm SEM formában tüntettük fel, illetve a Student-féle *t*-teszt segítségével értékeltük ki. *: szignifikáns különbség ($p < 0,05$).

Az AEA dóziszfüggően gátolja a follikulusok hossznövekedését

Ezt követően tisztázni kívántuk a molekula funkcionális szerepét. Ennek megválaszolására 7 napon keresztül tenyésztettünk szervkultúrában izolált humán follikulusokat és az endocannabinoid AEA különböző koncentrációjával (3, 10 és 30 μ M) kezeltük őket. A kísérlet során a follikulusok hosszát naponta mértük, a kapott eredményekből növekedési görbét készítettünk, ahol a növekedés mértékét a kezeletlen csoport izolálás napján mérhető átlagos hosszára vonatkoztattuk. Azt tapasztaltuk, hogy az AEA dóziszfüggően csökkentette a hajszál elongációját (**13. ábra**). Már 3 μ M AEA esetében megfigyelhető volt a hossznövekedés gátlása, szignifikáns csökkenést

azonban először 10 μM AEA alkalmazásakor tapasztaltunk, míg 30 μM esetében a hossznövekedés már a kontroll felére csökkent. Annak eldöntésére, hogy a gátlás valóban a CB1 receptoron keresztül történik-e, a CB1 specifikus antagonistá AM-251-et alkalmaztuk. Tapasztalatunk szerint már 1 μM AM-251 hozzáadása is kivédte a 30 μM AEA hossznövekedést gátló hatását, míg az agonista és az antagonistá együttes alkalmazása esetén a folliculusok hossznövekedése megegyezett a kontrollal. Önmagában az AM-251-nek nem volt hatása a szőrtüszők hossznövekedésére.

Kísérleteink folytatásában egy másik cannabinoid vegyület, a 2-arachidonoylglycerol hatását tanulmányoztuk a folliculusok hossznövekedésére. Noha a 2-AG szintén a cannabinoid receptor endogén ligandjai közé tartozik (Sugiura és mtsai, 2006), mégsem volt hatása a folliculusok elongációjára: 30 μM 2-AG alkalmazása nem befolyásolta a növekedést a kontrollhoz képest (14. ábra).

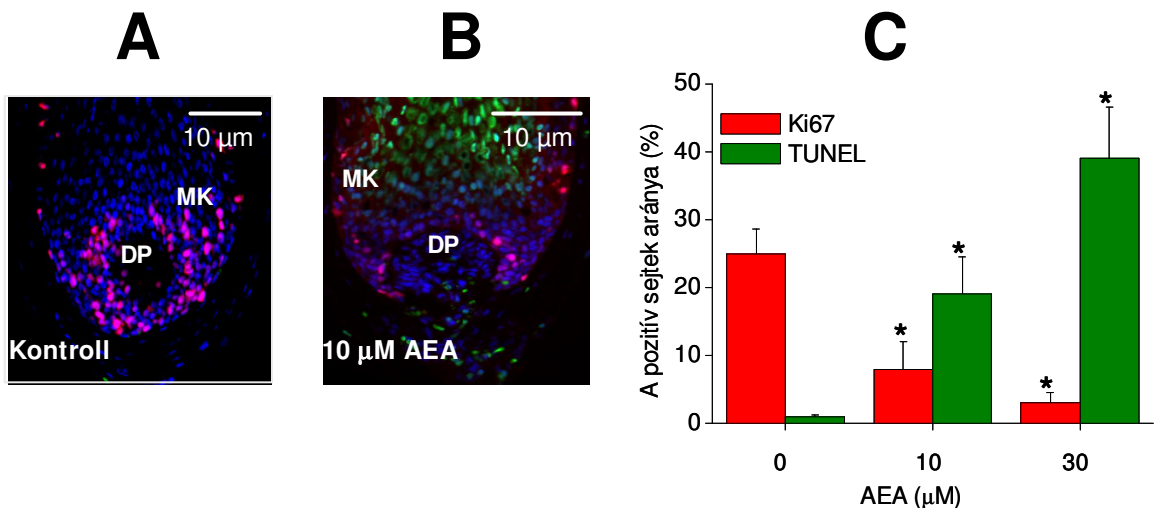


13. ábra: Az AEA dóisfüggően és CB1 specifikusan gátolja a hajszál elongációját

A folliculusokat (csoportonként átlagosan 18) 7 napon keresztül anandamide (AEA) különböző koncentrációjával (3, 10, 30 μM) kezeltük. A hatás specifitásának igazolására CB1 antagonistá AM-251-et (1 μM) alkalmaztuk. A szőrtüszők másik csoportját 2-arachidonoylglycerollal (2-AG, 30 μM) kezeltük. A hajszálakat naponta egyesével mértük, majd a hossznövekedést a kontroll hajszálak izolálás napján mért hosszára vonatkoztattuk. Az értékeket átlag \pm SEM formában tüntettük fel, illetve a Student-féle *t*-teszt segítségével értékeltük ki. *: szignifikáns különbség ($p < 0,05$). A kísérletet háromszor ismételtük meg.

Az AEA gátolja a mátrix keratinocyták proliferációját és apoptosist indukál

Eddigi eredményeink megerősítésére, illetve a hossznövekedés-gátlás sejtbioológiai alapjainak tisztázására megvizsgáltuk a proliferáló, illetve apoptotikus sejtek arányát a follikulusban. Ehhez Ki67-TUNEL festést végeztünk, amely képes mind a proliferáló sejtek (Texas Red-el jelölt Ki67 pozitív sejtek), mind az apoptotikus sejtek (FITC-el jelölt TUNEL-pozitív sejtek) kimutatására. A szörtüszőkből a szervkultúrában történt tenyésztés utolsó napján metszeteket készítettünk és ezeket a follikulusokat használtuk fel további kísérleteinkhez.



14. ábra: A CB1 AEA-val történő aktivációja gátolja a mátrix keratinocyták proliferációját és apoptózist indukál

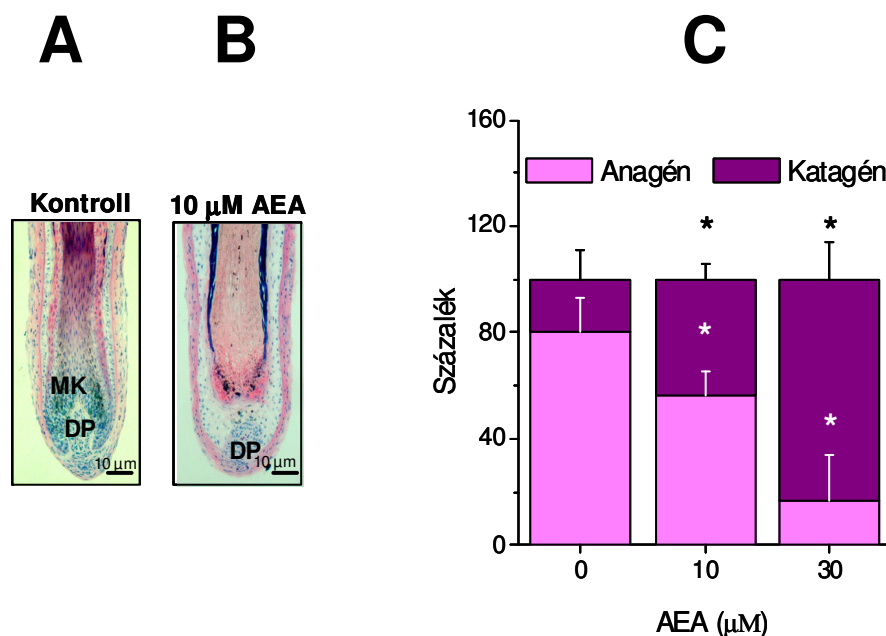
A proliferáció (Ki67, piros) és az apoptózis (TUNEL, zöld) egyidejű jelölése kontroll (A) és 10 μM anandamide (AEA)-kezelt, (B) tenyésztett hajfollikulusokban. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). DP: dermális papilla, MK: mátrix keratinocyták. Eredeti nagyítás: 400x. (C) A Ki-67 és TUNEL-pozitív sejtek százalékos aránya a teljes sejtszámra (DAPI-pozitív sejtek) vonatkoztatva. Az értékeket átlag ± SD formában tüntettük fel, illetve a Student-féle *t*-teszt segítségével értékeltük ki. *: szignifikáns különbség a kezeletlen kontrollhoz hasonlítva ($p < 0,05$). A kísérlet háromszori megismétlése hasonló eredményt adott.

Az eljárással sikerült alátámasztanunk eddigi eredményeinket: az AEA dóziszfüggően növelte az apoptotikus, TUNEL+ sejtek számát, elsősorban a mátrix keratinocyták feletti területen (14. ábra). A proliferáló, Ki67+ sejtek száma ezzel ellentétben szignifikánsan és dóziszfüggően csökkent növekvő koncentrációjú AEA alkalmazásakor. A csökkenés elsősorban az anagén fázisban gyors ütemben proliferáló

mátrix keratinocytákat, valamint a dermális papillát érintette. A 2-AG ezekre a folyamatokra sem volt hatással (nem prezentált adat).

Az AEA katagén transzformációt indukál a folliculusokban

Az apoptotikus sejtek számának fokozódása összhangban van a hajciklusban megfigyelt eseményekkel: 10 μM AEA hatására a folliculusok közel 50 %-a ment át katagén fázisba a 7 napos kezelés végére (szemben a kontroll folliculusokkal, ahol ez az arány kb. 20 % volt, mely a spontán katagén regressziót jelenti), míg 30 μM AEA alkalmazásakor a szőrtüszők 80 %-a mutatott katagén transzformációt (**15. ábra**). Ugyanakkor a 2-AG nem okozott katagén indukciót (nem prezentált adat).



15. ábra: Az AEA katagén transzformációt indukál a tenyésztett szőrtüszőkben

Izolált szőrtüszőket 5 napon keresztül 10, illetve 30 μM anandamiddal kezeltünk, majd a belőlük készült metszeteken (**A, B**) hematoxilin-eosin festést végezve meghatároztuk az anagén, illetve a katagén százalékos arányát (**C**) a kontroll folliculusokhoz képest. Az anagén-katagén elkülönítése az irodalomban meghatározott kritériumok szerint történt (csökkent pigmentáció, elvékonyodott mátrix keratinocytá, MK és leszálló dermális papilla, DP réteg). Eredeti nagyítás: 100x. Az adatokat átlag \pm SEM formában tüntettük fel. *: szignifikáns eltérés a kezeletlen kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

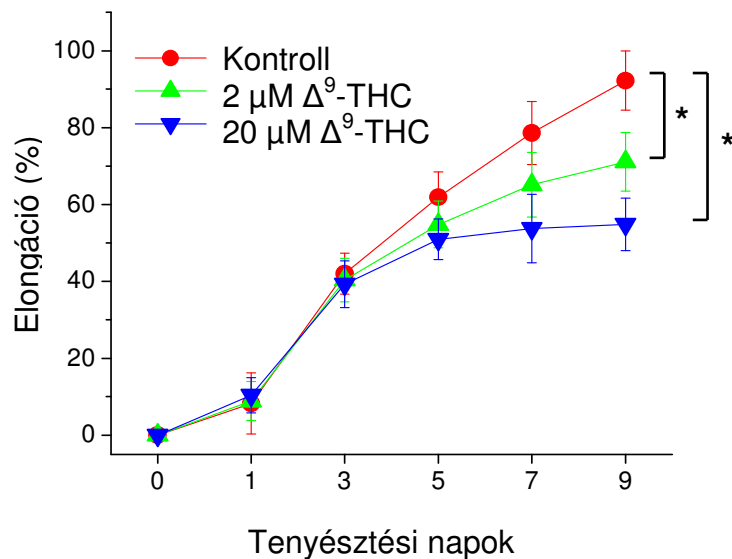
Ez alátámasztja a növekedési görbék eredményeit, hiszen a katagén, azaz regressziós fázisra az apoptotikus folyamatok fokozódása jellemző. Az ennek megfelelő morfológiai jegyek (a bulbus elvékonyodása, a dermális papilla proximális irányba húzódása, a pigmentáció csökkenése) jól megfigyelhetők az AEA- kezelt folliculusokon. Ugyanakkor a hajciklustól független melanintartalmat az AEA kezelés nem befolyásolta (nem prezentált adat).

A humán folliculus endogén AEA-t tartalmaz

A folliculusok endogén cannabinoid tartalmának meghatározására spektrometriás kísérleteket végeztünk, mely során azt tapasztaltuk, hogy a folliculusok jelentős mennyiségű (6.6- 11.2 fmol/mg szövet) AEA-t tartalmaznak. Ez a mennyiség összevethető a szívizomban talált AEA koncentrációval (mintegy 7.7 fmol/mg szövet), mely szövetről ismert, hogy a cannabinoidok befolyásolják a szív működés egyes paramétereit (Pacher és mtsai, 2005). Ugyanakkor a 2-AG szőrtüszőben mérhető koncentrációja csupán mintegy 0.3-0.3 fmol/mg szövetnek adódott.

A Δ^9 -THC dóziszfüggően gátolja a hajszál elongációját

A kapott eredmények után azt kívántuk megvizsgálni, hogy a fenti hatások megismételhetők-e exogén CB agonista alkalmazásával. Ennek megválaszolására először Δ^9 -THC-val, a jól ismert marihuána hatóanyagával kezeltük a folliculusokat és megvizsgáltuk az elongációra gyakorolt hatását. Eredményeink azt mutatták, hogy az endogén agonista AEA-hoz hasonlóan a Δ^9 -THC szintén dóziszfüggően csökkentette a hajszálak hossznövekedését (**16. ábra**).

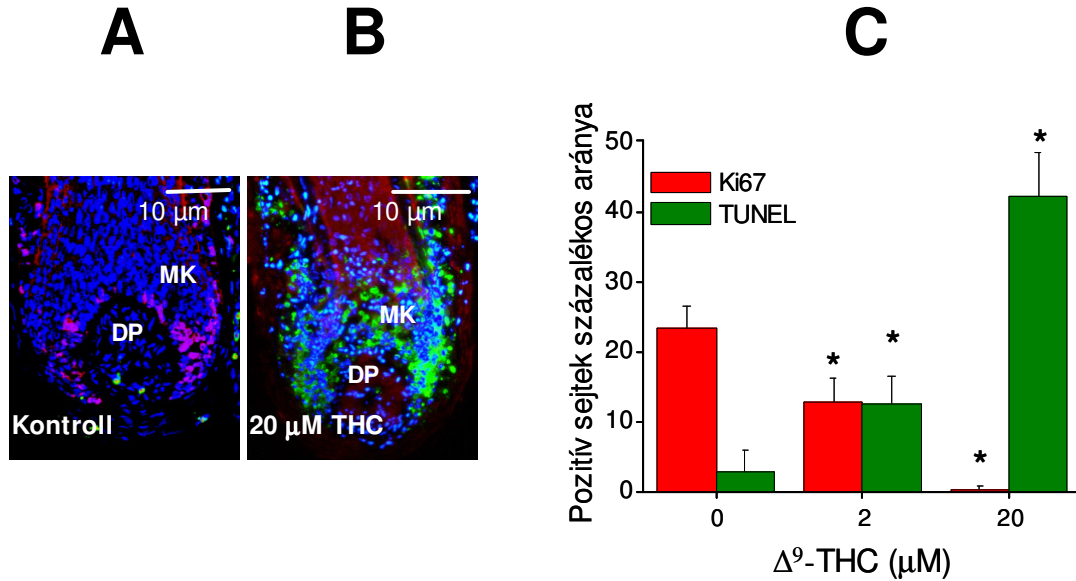


16. ábra: Az exogén cannabinoid Δ^9 -THC alkalmazása dóziszfüggően csökkenti a hajsál elongációját

A hajfollikulusokat (csoportonként átlagosan 18-24) 9 napon keresztül Δ^9 -tetrahydrocannabinol különböző koncentrációjával (2 és 20 μM) kezeltük. A hajsálakat naponta egyesével mértük, majd a hossznövekedést a kontroll hajsálak izolálás napján mért hosszára vonatkoztattuk. Az értékeket átlag \pm SEM formában tüntettük fel, illetve a Student-féle t -teszt segítségével értékeltük ki. *: szignifikáns különbség a kezeletlen kontrollhoz képest ($p < 0,05$). Az eredmények három kísérletben kapott értékek átlagai.

A Δ^9 -THC gátolja a mátrix keratinocyták proliferációját és apoptosist indukál

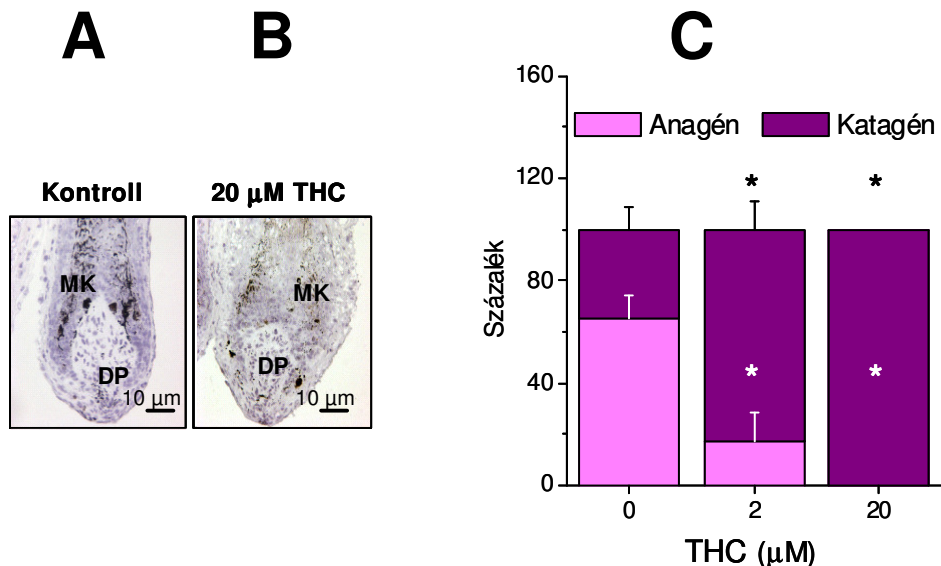
A Δ^9 -THC hossznövekedést gátló hatását támasztják alá a Ki67-TUNEL festés eredményei. Látható, hogy már 2 μM Δ^9 -THC alkalmazása is csökkentette a proliferációt, 20 μM esetén pedig gyakorlatilag nem volt proliferáló sejt a follikulusban. Ezzel összhangban az apoptotikus sejtek aránya a Δ^9 -THC kezelés eredményeképpen dóziszfüggően növekedett (17. ábra).



17. ábra: A Δ^9 -THC gátolja a mátrix keratinocyták proliferációját és apoptózist indukál
A proliferáció (Ki67, piros) és az apoptózis (TUNEL, zöld) egyidejű jelölése kontroll **(A)** és 20 μM Δ^9 -tetrahydrocannabinol-kezelt, **(B)** tenyésztett hajfollikulusokban. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). DP: dermális papilla, MK: mátrix keratinocyták. Eredeti nagyítás: 400x. **(C)** A Ki-67 és TUNEL-pozitív sejtek százalékos aránya a teljes sejtszámra (DAPI-pozitív sejtek) vonatkoztatva. Az értékeket átlag \pm SEM formában tüntettük fel, illetve a Student-féle t -teszt segítségével értékeltük ki. *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$). A kísérlet háromszori megismétlése hasonló eredményt adott.

A Δ^9 -THC katagén transzformációt indukál a follikulusokban

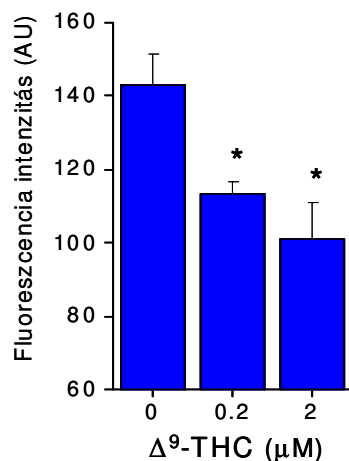
A következőkben megvizsgáltuk, hogy a Δ^9 -THC befolyásolja-e hajciklust, azaz okoz-e katagén indukciót az endogén agonista AEA-hoz hasonlóan? Azt találtuk, hogy a Δ^9 -THC ebben a vonatkozásban is hasonló hatású az AEA-hoz, és már 2 μM Δ^9 -THC is a follikulusok 80 %-ában katagén transzformációt okozott, míg 20 μM Δ^9 -THC alkalmazása esetén valamennyi hajszál a katagén fázisra jellemző morfológiai jegyeket mutatta **(18. ábra)**.



18. ábra: A Δ^9 -THC katagén transzformációt indukál a tenyésztett szőrtüszőkben

Izolált szőrtüszőket 5 napon keresztül 2, illetve 20 μM Δ^9 -tetrahydrocannabinollal kezeltünk, majd a belőlük készült metszeteken (**A**, **B**) hematoxilín-eosin festést végezve meghatároztuk az anagén, illetve a katagén százalékos arányát (**C**) a kontroll folliculusokhoz képest. Az anagén-katagén elkülönítése az irodalomban meghatározott kritériumok szerint történt (csökkent pigmentáció, elvékonyodott mátrix keratinocytá, MK és leszálló dermális papilla, DP réteg). Eredeti nagyítás: 100x. Az adatokat átlag \pm SEM formában tüntettük fel. *: szignifikáns eltérés a kezeletlen kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

Mivel a katagén fázisra jellemző a melanintartalom csökkenése, ezért annak tanulmányozására, hogy mi módon befolyásolja a Δ^9 -THC kezelés a pigmentációt, külön kísérletet végeztünk. Ennek során Δ^9 -THC-vel kezeltük a folliculusokat és azoknak a melanintartalmát vizsgáltuk, amelyek a morfológiai jegyek alapján még bizonyosan nem mutattak katagén átalakulást. A kísérlet eredményeképpen elmondható, hogy ellentétben az AEA-val, a Δ^9 -THC kezelés szignifikánsan és dóziszfüggően lecsökkentette a hajszál melanintartalmát (**19. ábra**).



19. ábra: A Δ^9 -THC kezelés dóziszfüggően csökkenti a hajfollikulus melanintartalmát

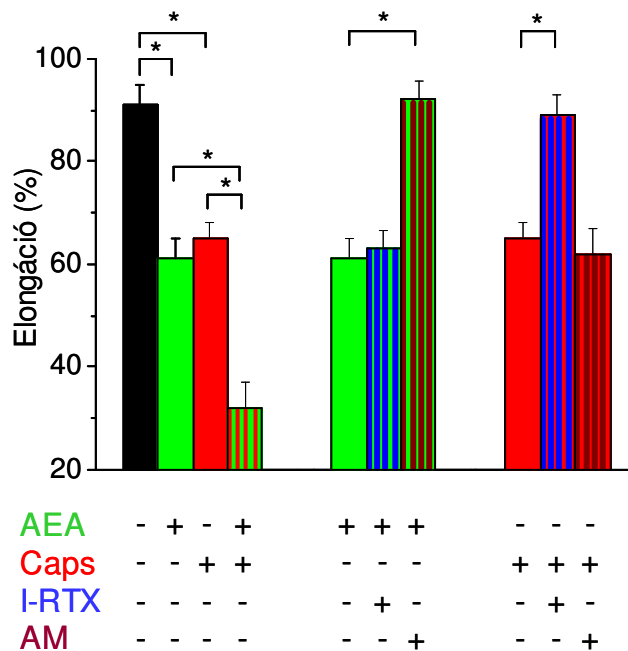
A follikulusokat 5 napon keresztül kezeltük 0,2 illetve 2 μM Δ^9 -THC-vel. Azon follikulusok esetében, melyek a morfológiai jegyek alapján nem mutattak katagén transzformációt, a bulbus területén meghatároztuk a melanintartalmat. Egy follikulus esetében 5 ROI-ban mértük a melanintartalmat. Egy kezelési csoportba 18-24 follikulus tartozott. Az adatokat átlag \pm SEM formában tüntettük fel. *: szignifikáns eltérés a kezeletlen kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

Az AEA és a capsaicin együttes alkalmazása szinergista módon csökkenti a hajszál elongációját

Irodalmi adatokból ismert, hogy az AEA nem csupán a cannabinoid receptoroknak, hanem a TRPV1-nek is agonistája (van der Stelt és Di Marzo, 2005; Felder és mtsai, 2006). Mivel ezek az adatok elsősorban idegrendszeri kutatások eredményeit tartalmazzák, ezért kíváncsiak voltunk arra, vajon a bőrben van-e kapcsolat a vanilloid és a cannabinoid rendszer között? A kérdés megválaszolásához humán szőrtüszőket kezeltünk CB1 és TRPV1 agonisták és antagonisták különféle kombinációjával.

Az izolált szőrtüszőket 7 napon keresztül kezeltük 10 μM anandamiddal, 10 μM capsaicinnal, 50 nM iodo-resiniferatoxinnal, illetve 1 μM AM-251-el. Látható, hogy az AEA szignifikánsan csökkentette a hajszál elongációját. Ezt a hatást a CB1 antagonistá AM-251 alkalmazása kivédte, míg a TRPV1 antagonistá I-RTX ebben a tekintetben

hatástalannak bizonyult. A capsaicin önmagában történő alkalmazása az AEA-hoz hasonló mértékben csökkentette a folliculus hossznövekedését. Ez a hatás TRPV1 specifikus antagonistá I-RTX alkalmazásával kivédhető volt, míg a CB1 specifikus AM-251 nem befolyásolta a capsaicin gátló hatását. A két molekula (AEA és capsaicin) együttes adagolása szinergistának bizonyult, hiszen egyidejű jelenlétük a külön-külön történő alkalmazáshoz képest nagyobb mértékben csökkentette az elongációt (20. ábra).

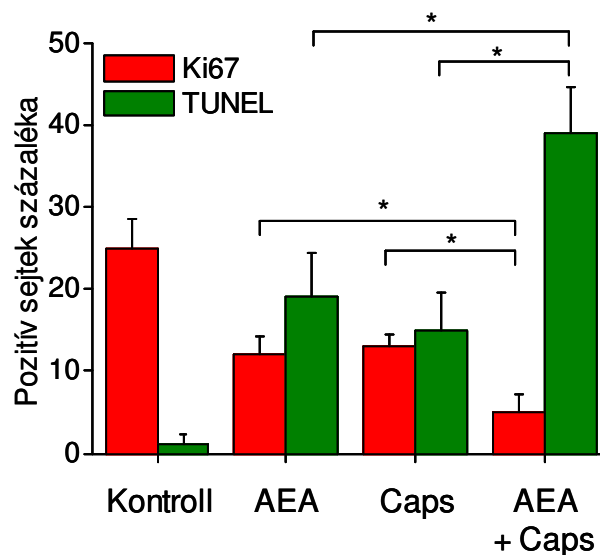


20. ábra: Az AEA hajszázelongációt gátló hatását CB1-en keresztül hozza létre

Izolált szőrtüszőket 7 napon keresztül kezeltünk 10 μ M AEA-val, 10 μ M capsaicinnel (Kapsz), 50 nM I-RTX-el, 1 μ M AM-251-el, illetve a fenti molekulák kombinációjával. A fenti molekulák elongációra gyakorolt hatását a kezeletlen folliculusokra vonatkoztattuk. Egy csoportba 18-24 folliculus tartozott. Az értékeket átlag \pm SE formában tüntettük fel, illetve a Student-féle *t*-teszt segítségével értékeltük ki. *: szignifikáns különbség a kezeletlen kontrollhoz képest (fekete színnel jelölve) ($p < 0,05$).

Az AEA és a capsaicin együttes alkalmazása szinergista módon gátolja a mátrix keratinocyták proliferációját és apoptosist indukál

Eredményeinket alátámasztottak a Ki67/TUNEL festés eredményei is. A 21. ábra jól mutatja, hogy mind az AEA, mind a capsaicin a kontrollhoz képest szignifikánsan csökkentette a proliferáló, Ki67 pozitív sejtek számát, ugyanakkor növelte az apoptotikus, TUNEL pozitív sejtek arányát a kontrollhoz képest. Az AEA és a capsaicin egymást erősítő hatása itt is megfigyelhető, alátámasztva ezzel a folliculus elongációját gátló hatásuk additivitását (21. ábra).



21. ábra: Az AEA és a capsaicin együttes alkalmazása additívnek bizonyult a sejtproliferáció gátlásában illetve az apoptózis indukálásában

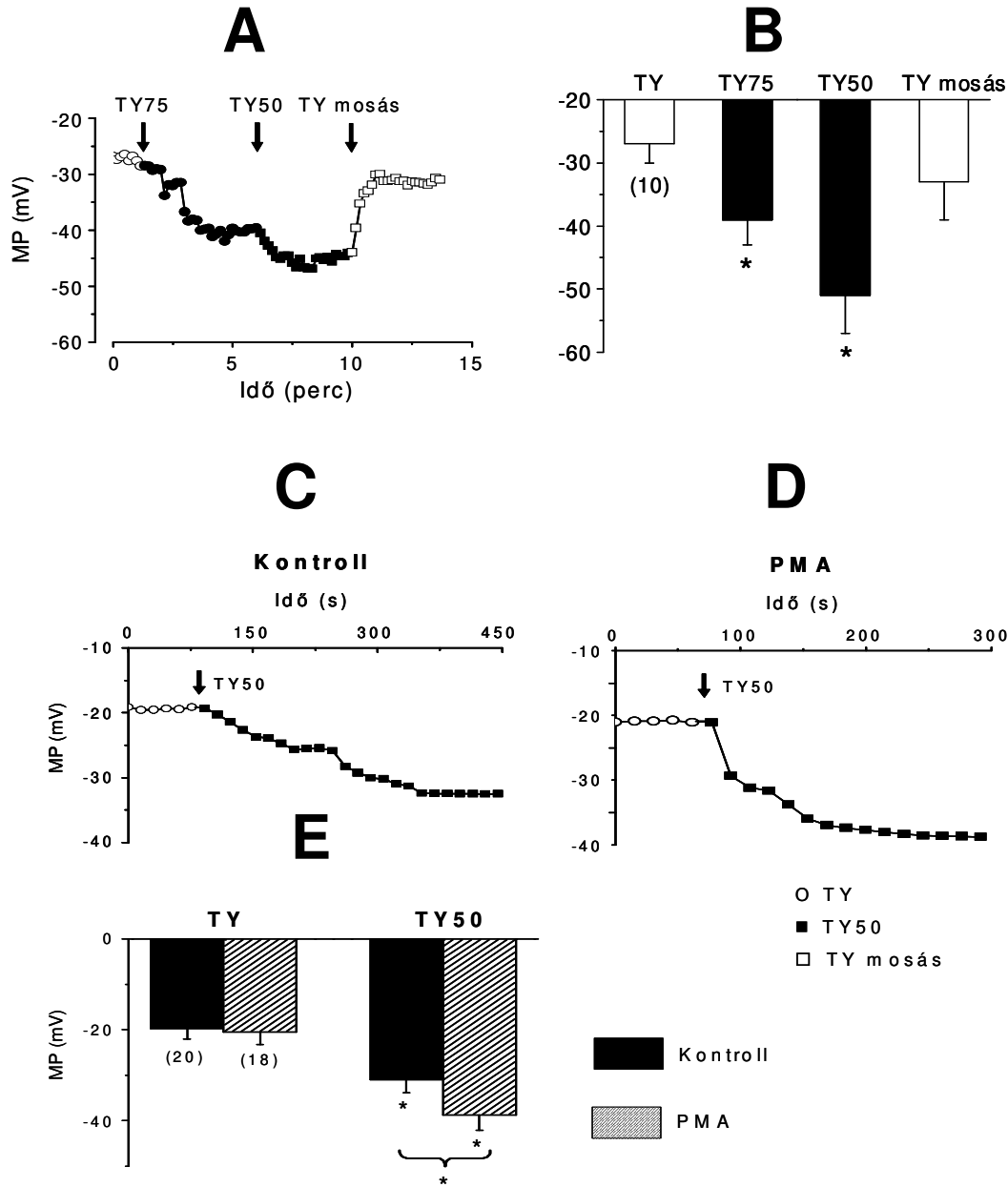
A Ki-67 és TUNEL-pozitív sejtek százalékos aránya a teljes sejtszámra (DAPI-pozitív sejtek) vonatkoztatva. A folliculusokat 10 μ M AEA-val, 10 μ M capsaicinnel, illetve a kettő kombinációjával 7 napon keresztül kezeltük. Az értékeket átlag \pm SEM formában tüntettük fel, illetve a Student-féle *t*-teszt segítségével értékeltük ki. *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$). A kísérlet háromszori megisméltése hasonló eredményt adott.

Stretch-aktivált csatornák szerepe a keratinocyták proliferációjában és membránpotenciáljának szabályozásában

Hypotóniás stressz alkalmazása lecsökkenti a keratinocyták nyugalmi membránpotenciálját

Kísérleteink kezdetén arra voltunk kíváncsiak, hogy a mechanikai stressz megváltoztatja-e a keratinocyták nyugalmi membránpotenciálját. Ennek eldöntésére kontroll, valamint csökkentett tonicitású Tyrode oldatokkal (TY75 és TY50) perfundáltuk a sejteket és konvencionális mikorelektroda technikával mértük a sejtek membránpotenciál változását (**22. ábra**). Hypotóniás oldatok használatakor a membránpotenciál a kontrollhoz képest negatívabb értéken stabilizálódott. A keratinocytákat ismét normál tonicitású, módosított Tyrode oldattal perfundálva a sejtek membránpotenciálja depolarizációs irányba változott (**22/A ábra**). Az eredmények számszerű értékeléséből látható (**22/B ábra**), hogy a kiindulási membránpotenciálhoz (-27 ± 3 mV) képest a TY75 oldat alkalmazása 12 ± 4 mV, míg a TY50 oldat perfundáltatása 24 ± 9 mV hyperpolarizációt okozott. Visszatérve a normál Tyrode oldathoz a membránpotenciál értéke 33 ± 6 mV-on stabilizálódott, vagyis a kiindulási értékhez képest negatívabb maradt.

Hasonló eredményeket kaptunk a patch-clamp technika teljes sejtes konfigurációjának alkalmazásakor is (**22/C ábra**). A nyugalmi membránpotenciál értéke ilyen körülmények között, módosított Tyrode oldatban -19 mV \pm 2 mV-nak adódott. TY50 oldatra történő átváltás esetén a membrán hyperpolarizálódott, és 5 perces perfundálást követően -31 mV \pm 3 mV értéken stabilizálódott.



22. ábra: Hypotóniás stressz alkalmazása lecsökkenti a keratinocyták nyugalmi membránpotenciálját

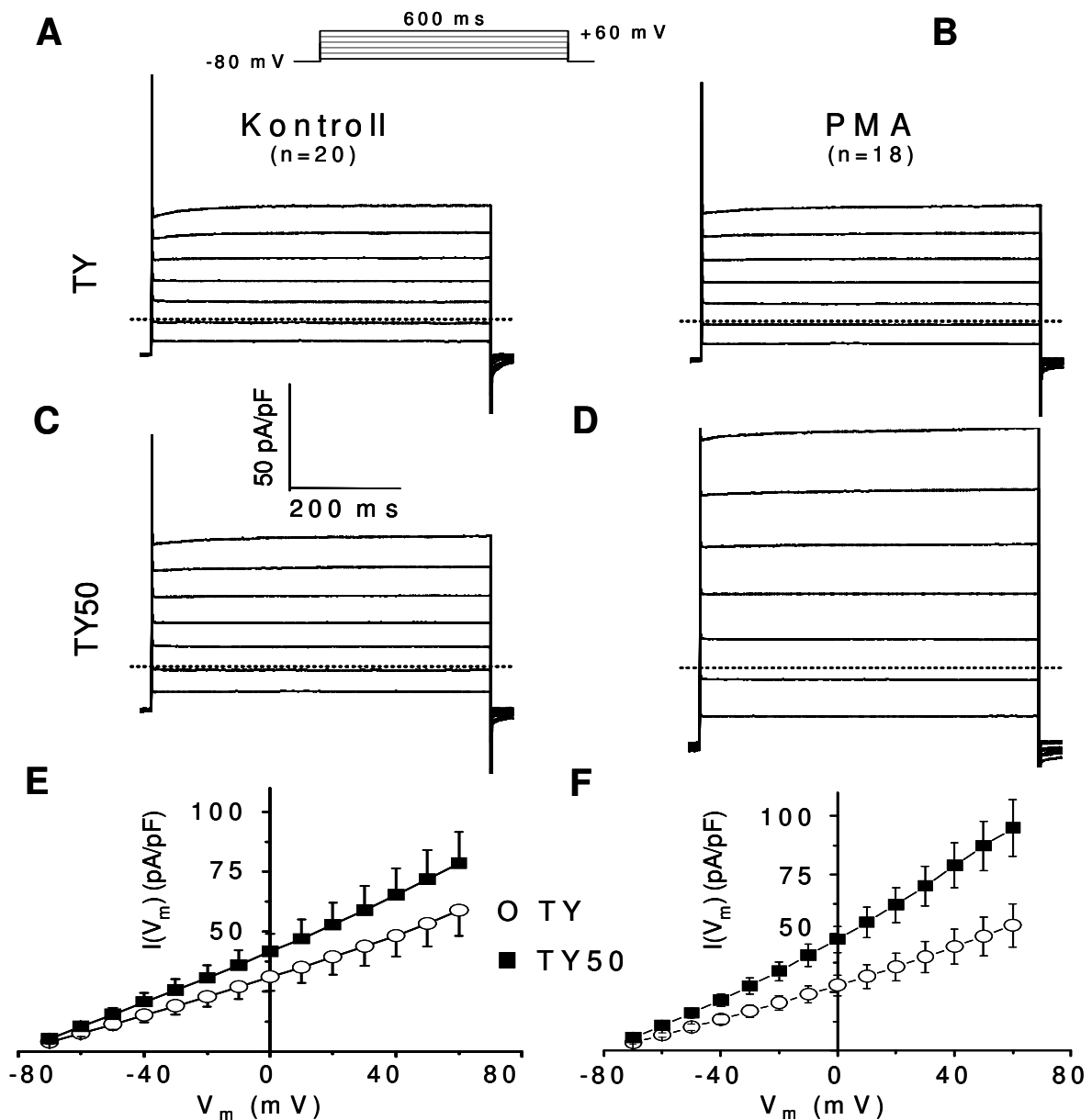
Kísérleteinkben a perfundáló oldat tonicitását háromnegyedére, majd felére csökkentettük (TY75 és TY50). A membránpotenciál változását konvencionális mikroelektroda technikával rögzítettük, az ábrán minden pont tíz másodpercig tartó mérés átlagát jelöli (A). Kontrollként módosított Tyrode oldatot alkalmaztunk. A membránpotenciál értékének átlagos változását 10 sejten történt mérés eredményeiből számoltuk (B). A mintavételezési frekvencia értéke 1 kHz volt. *: szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest ($p < 0,05$). A méréseket megismételtük patch-clamp technika teljes sejt konfigurációjának alkalmazásával is (C). A sejteket phorbol-12-myristate-13-acetáttal (PMA) 12 órán keresztül inkubáltuk, majd normál tonicitású kontroll (TY), illetve felére csökkentett tonicitású oldattal (TY50) perfundáltuk. A $G\Omega$ nagyságú seal létrehozása után mértük a membránpotenciált kontroll (C) valamint PMA előkezelt (D) sejteken. Az átlagos membránpotenciál -változás értékét 20 kontroll, illetve 18 PMA -kezelt sejt adataiból számítottuk ki (E). *: szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest ($p < 0,05$)

Mind irodalmi adatok (Bollag és mtsai, 1993; Le Panse és mtsai, 1994), mind laboratóriumunkban korábban elvégzett kísérletek eredményei (Papp és mtsai, 2003) azt mutatták, hogy a PKC izoenzimek jelentős szerepet játszanak a keratinocyták proliferációjában és differenciálódásában. A továbbiakban ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy ezen enzimek aktiválása befolyásolja-e az ozmotikus stresszre adott választ, és ezen keresztül van-e hatása a sejtek differenciálódására? A sejteket phorbol-12-myristate-13-acetáttal (PMA), a PKC izoenzimek általánosan használt aktivátorával 12 órán keresztül kezeltük, majd konvencionális mikroelektróda technikával megmértük a sejtek membránpotenciál változását. A nyugalmi membránpotenciál értéke PMA-val kezelt sejtekben nem mutatott eltérést a kontrollhoz képest (-20 ± 4 mV) (**22/D,E ábra**). TY50 alkalmazásakor azonban azt tapasztaltuk, hogy a hyperpolarizáció értéke a PMA-val kezelt sejtek esetében mintegy -39 ± 3 mV-nak adódott, ami szignifikánsan nagyobb mértékű hyperpolarizációt jelent, mint kontroll sejtek esetében.

A PMA előkezelés fokozza a hypotóniás oldat által kiváltott membránáramot

A következő kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a megfigyelt membránpotenciál-változások háttérében milyen membránáramok állnak. Ennek eldöntésére a patch-clamp technika teljes sejtes konfigurációját alkalmaztuk (**23. ábra**). A sejtek membránpotenciálját kezdetben -40 mV-ra állítottuk be, majd a membránt rövid ideig -80 mV-ra hyperpolarizáltuk. Ezt követően különböző nagyságú, 600 ms-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. Először kontroll (**23/A ábra**), illetve PMA-val előkezelt sejteken (**23/B ábra**), normál tonicitású tenyésztőoldatban mértük a membránon átfolyó áramot, és nem tapasztaltunk különbséget a két csoport között. Ezt követően hypotóniás

oldatba (TY50) helyeztük a sejteket, és a fent említett méréseket megismételtük kontroll **(23/C ábra)**, valamint PMA-val előkezelt **(23/D ábra)** keratinocytákon. Az áram-feszültség karakterisztika kiszámításánál az áramértékeket a depolarizáló tesztimpulzus végénél mért értékekből határoztuk meg **(23/E és F ábrák)**. Hypotóniás oldat alkalmazásakor megnőtt a membránon átfolyó áram nagysága, amely változás kifejezettebb volt a PMA-val előkezelt sejteken **(23F ábra)**, mint kontroll keratinocytákon **(23/E ábra)**. Annak eldöntésére, hogy milyen ionáram lehet felelős a megfigyelt különbségekért a két csoportban, további méréseket végeztünk. Irodalmi adatokból ismert, hogy a hypotóniás stressz kloridáramot indukál keratinocytákon (Rugolo és mtsai, 1992), ezért méréseinket kloridmentes oldatban kezdtük el, hogy megvizsgáljuk ezen ionáram szerepét **(24. ábra)**. A kloridion elvonása kis mértékben, de nem szignifikánsan depolarizálta a membránt (-14 ± 3 mV) **(24/B ábra)** a kontroll állapothoz képest **(lásd 22/E ábra)**. A kloridionmentes, hypotóniás oldat alkalmazása -5 ± 1 mV-tal hyperpolarizálta a membránt, ami szignifikánsan kisebb mértékű membránpotenciál-változás volt, mint ahogy azt a kloridiont tartalmazó oldat esetében tapasztaltuk (-20 ± 4 mV, **22/E ábra**). Ezen eredménnyel összhangban az áram-feszültség karakterisztika elemzéséből látható, hogy a kloridion elvonása lecsökkentette az egyes membránpotenciál-értékekhez tartozó áramértékeket **(24/A ábra)** a kontrollhoz képest **(lásd 23/E ábra)**.

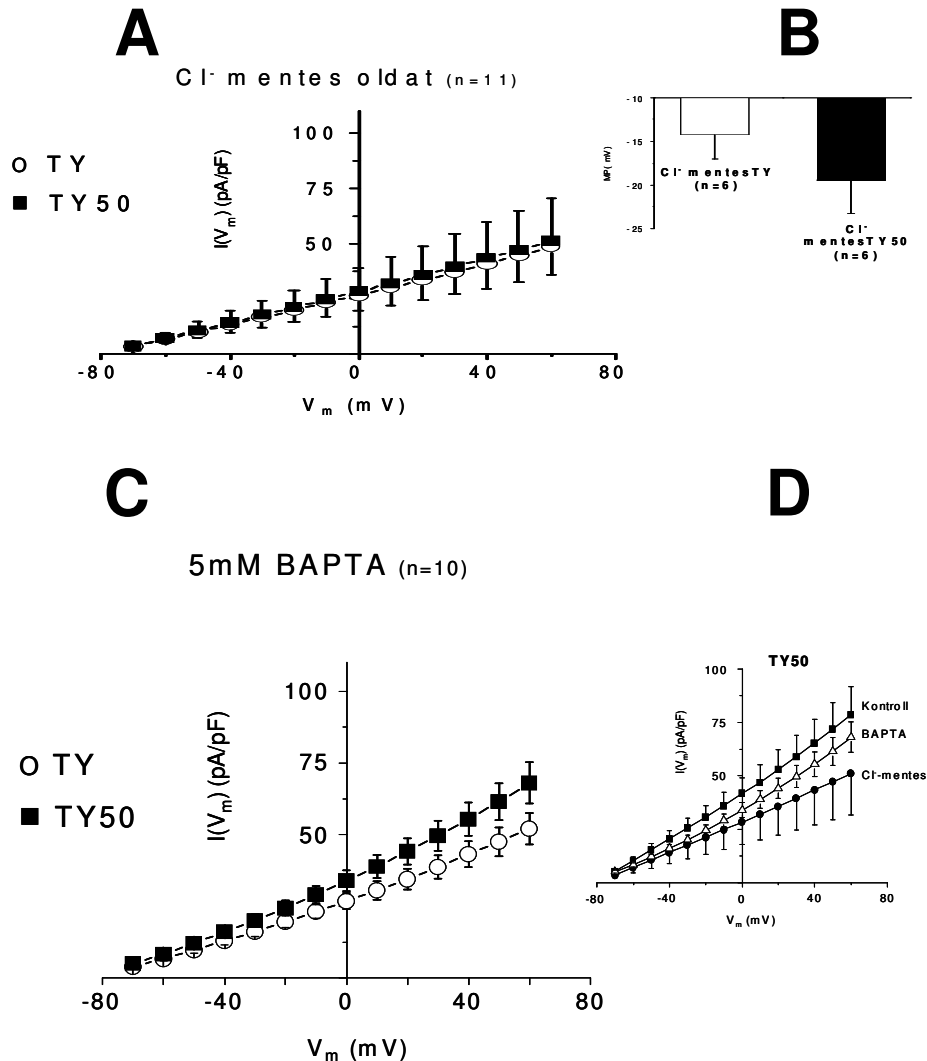


23. ábra: A PMA előkezelés fokozza a hypotonias oldat által kiváltott membránáramot

A sejtek kezdeti membránpotenciálját -80 mV-ra állítottuk be és 600 ms-ig egyre növekvő depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. A sejteket normál tonicitású, módosított Tyrode oldattal (TY) perfundáltuk és így mértük a membránon átfolyó áramot kontroll (A), valamint PMA előkezelt (B) sejteken. Megvizsgáltuk a felére csökkentett tonicitású oldat (TY50) hatását az áramokra kontroll (C) illetve PMA előkezelt (D) keratinocytákon. Az áram-feszültség karakterisztikát az áramamplitúdók átlagértékeiből számoltuk ki, az értékeket a depolarizáló impulzus végén mértük (E: áram- feszültség karakterisztika meghatározása kontroll, illetve PMA előkezelt (F) sejteknél).

A stressz- indukálta áram nagyságát a kloridion elvonása csökkenti, ugyanakkor az extracelluláris Ca^{2+} pufferelese nem változtatja meg jelentősen

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése részt vesz-e az előbb leírt kloridáram aktiválásában. Ennek eldöntésére méréseinket 5 mM BAPTA-t tartalmazó pipetta oldattal végeztük, amely egy jól ismert Ca^{2+} puffer (24. ábra).



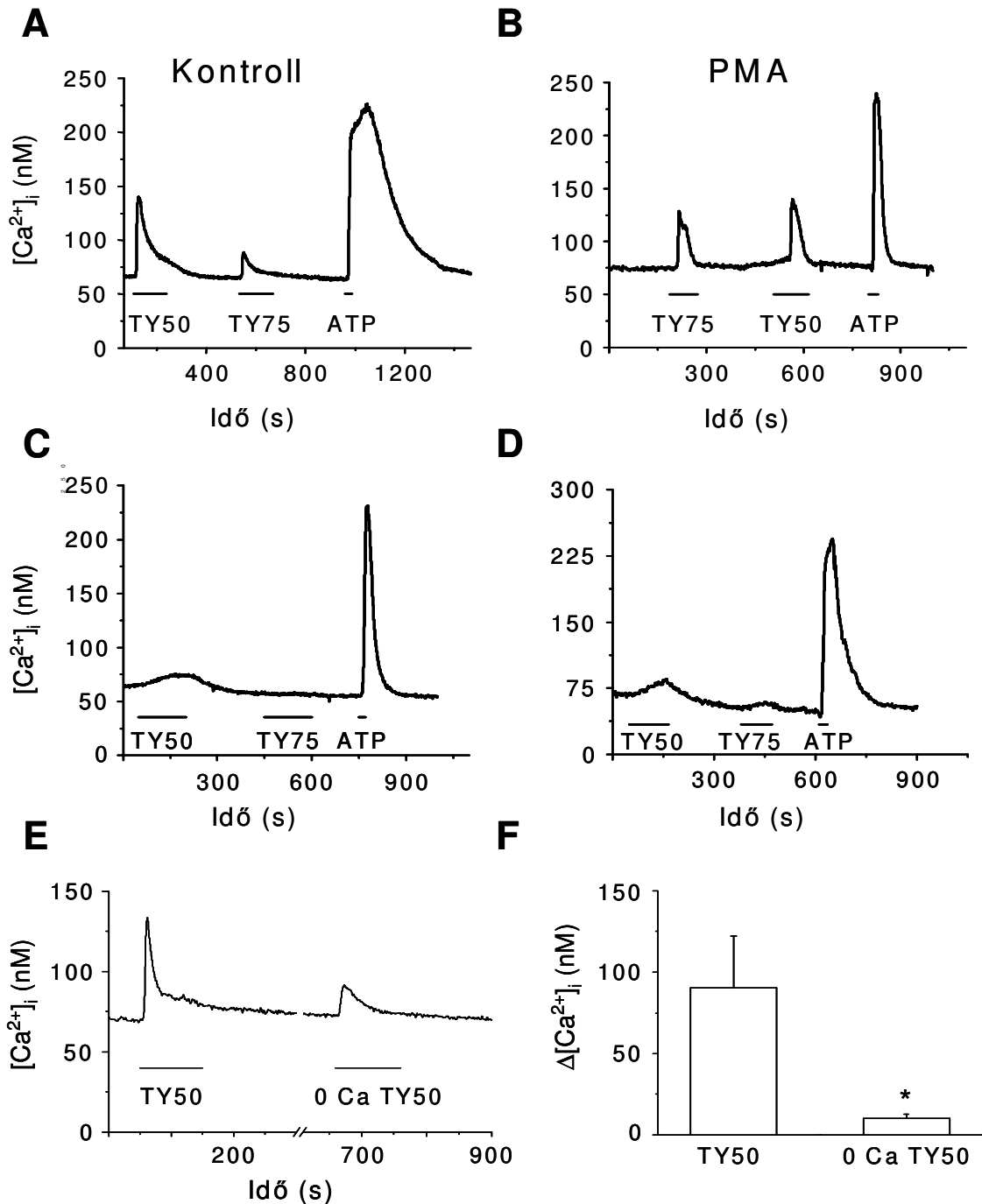
24. ábra: A stressz- indukálta áram nagyságát a kloridion elvonása csökkenti, ugyanakkor az extracelluláris Ca^{2+} pufferelese nem változtatja meg jelentősen

A sejtek kezdeti membránpotenciálját -80 mV-ra állítottuk be és 600 ms-ig depolarizáló (-40 mV) impulzust alkalmaztunk. Az áram- feszültség karakterisztikát kloridmentes, izo-és hypotóniás oldatokban vizsgáltuk (A). Az átlagos membránpotenciál értékeket izo- illetve hypotóniás, kloridmentes oldatban a B ábrán tüntettük fel. Kontroll és hypotóniás oldatban mért kloridáram nagysága különböző membránpotenciálértékeken. A pipettaoldatban 5 mM BAPTA-t alkalmaztunk az intracelluláris Ca^{2+} megkötésére (C). A kis ábrán levő áram-feszültség karakterisztika mérések hypotóniás oldatban, 5 mM BAPTA jelenlétében, valamint kloridmentes oldatban történtek (D)

Eredményeink azt mutatták, hogy a BAPTA alkalmazása nem védte ki a hypotóniás stressz által okozott áramnövekedést **(24/C ábra)**. Az áram-feszültség karakterisztika eredményeit egy grafikonon ábrázolva látható, hogy hypotóniás oldatban a kontrollhoz képest a kloridion elvonása nagyobb mértékben csökkentette az egyes membránpotenciál-értékekhez tartozó áram nagyságát, mint az extracelluláris Ca^{2+} az oldatból (BAPTA alkalmazása) **(24/D ábra)**. Kísérleteink eredményeiből arra következtettünk, hogy az ozmotikus stressz okozta sejtválaszokban mechanoszenzitív kloridcsatornák vesznek részt, melyek működése lényeges kalciumfüggést nem mutat.

Hypotóniás oldat alkalmazása $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedést okoz kontroll valamint PMA előkezelt keratinocytákon

Mivel a mechanoszenzitív csatornák aktivációja gyakran jár együtt az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedésével, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy a hypotóniás stressz okoz-e változást a keratinocyták $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jában. Kontrollként az ATP stimulusra kialakuló Ca^{2+} -választ alkalmaztuk, és vizsgáltuk a különböző mértékben hypotóniás oldatok (TY75 és TY50) hatását **(25. ábra)**. Morfológiai jegyeik alapján két típusú Ca^{2+} választ tudtunk megkülönböztetni: a „tranziens”, azaz gyorsan kialakuló és lecsengő $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedést **(25/A ábra)**, valamint a „lassú” választ, amely a hypotóniás oldat alkalmazása alatt végig megfigyelhető volt **(25/C ábra)**. A „tranziens” típusú választ mindkét oldat alkalmazása esetén sikerült kiváltani, TY50 használatakor azonban nagyobb volt a tranziensek amplitúdója (91 ± 3 nM), mint TY75 esetében (65 ± 4 nM). Ugyanakkor „lassú” típusú választ csupán TY50 oldat alkalmazásával tudtunk kiváltani (az amplitúdó értéke $12,4 \pm 4$ -nek adódott).



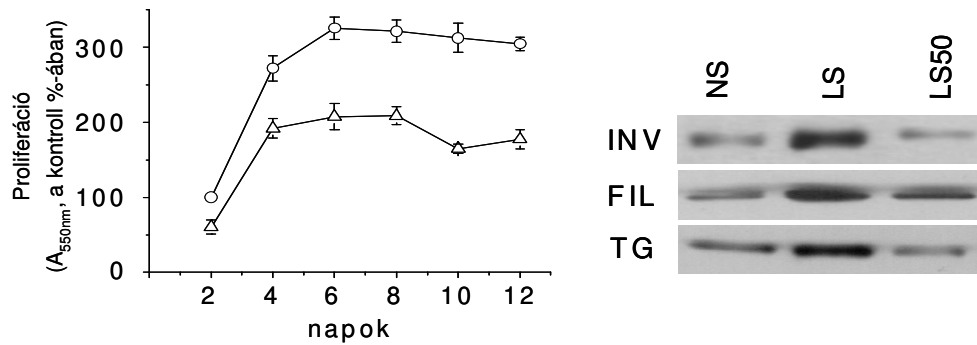
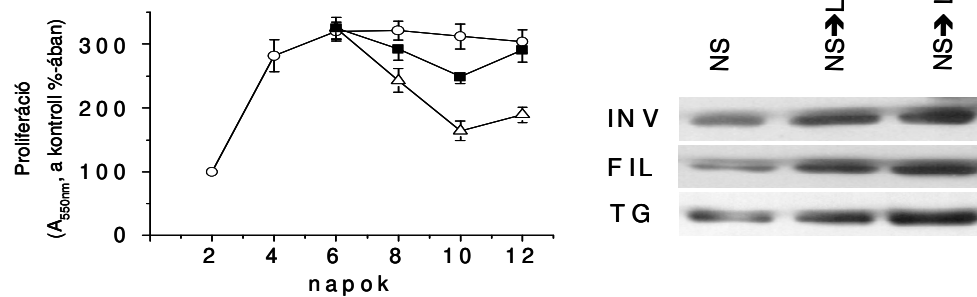
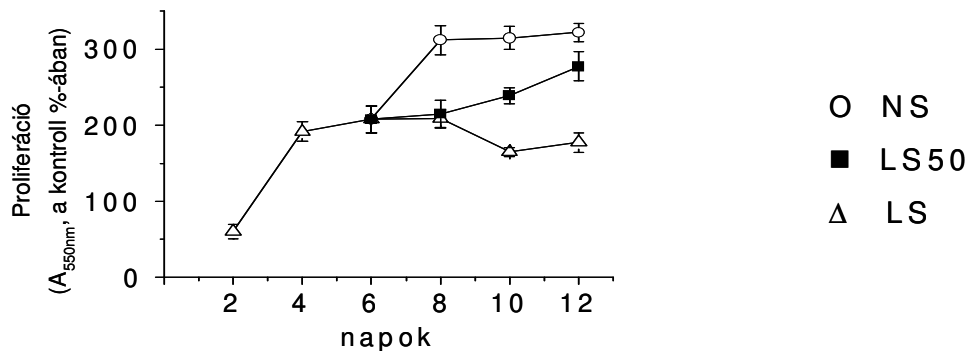
25. ábra: Hypotóniás oldat alkalmazása [Ca²⁺]_i-emelkedést okoz kontroll valamint PMA előkezelt keratinocytákon

Hypotóniás stressz (TY50 és TY75 oldatok alkalmazása) által kiváltott Ca²⁺-tranziensek kontroll (**A**, **C**), illetve PMA-kezelt sejteken (**B**, **D**). Hypotóniás oldatban kialakuló Ca²⁺-tranziensek nagysága extracelluláris Ca²⁺ jelenlétében és hiányában (**E**). Az „X” tengelyen ábrázolt időskálában jelenlevő megszakítás a Ca²⁺-mentes oldatban történő mosást jelöli. Az extracelluláris Ca²⁺ elvonásának hatása a tranziensek amplitúdójára hypotóniás oldatban (**F**)

Kísérleteinket megismételtük 12 órás PMA előkezelést követően is. A hypotóniás stressz ebben az esetben is „tranziens” **(25/B ábra)** illetve „lassú” típusú $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést okozott **(25/D ábra)**. A PMA előkezelt sejteken a „tranziens” válasz amplitúdója nagyobb volt, mint a kontroll keratinocytákon (nem prezentált adat), bár ez a különbség nem adódott szignifikánsnak. PMA előkezelt sejteken már a TY75 oldat is képes volt „lassú” választ kiváltani. Az ATP által kiváltott tranziensek paraméterei (amplitúdó, felszálló szár meredeksége, félrelaxáció ideje) hasonlóak voltak kontroll és PMA-kezelt sejtek esetében. Mind kontroll, mind pedig a PMA előkezelt sejtekben a kialakult Ca^{2+} -válasz nagysága erőteljesen függött az $[Ca^{2+}]_e$ -tól: Ca^{2+} -mentes oldatban szignifikánsan csökkent a hypotóniás stressz hatására kialakult tranziens amplitúdója ($14,2 \pm 4$ nM) az 1,8 nM Ca^{2+} tartalmú oldathoz ($90,6 \pm 27$ nM) képest **(25/E, F ábra)**.

A tenyésztőoldat szérumtartalmának, valamint tonicitásának változása befolyásolja a HaCaT keratinocyták proliferációját és differenciálódását

Kísérleteink következő részében megvizsgáltuk, hogy a mechanikai stressz hogyan befolyásolja a keratinocyták proliferációját és differenciálódását. Ennek meghatározásához a tenyésztés során változtattuk az oldat szérumtartalmát- illetve tonicitását. Ismert, hogy a tenyésztőoldat szérumtartalma befolyásolja a sejtek proliferációját és differenciálódását (Zellmer és Reissig, 2002), így kísérleteink során olyan oldatokkal dolgoztunk, hogy a szérumtartalom megváltozása ne járjon együtt a tonicitás változásával.

A**B****C**

26. ábra: A tenyésztőoldat szérumszertartalmának, valamint tonicitásának változása befolyásolja a HaCaT keratinocyták proliferációját és differenciálódását

Hypotóniás stressz, illetve alacsony szérumszertartalmú tenyésztőoldat alkalmazásának hatása a keratinocyták proliferációjára valamint differenciálódására. A sejteket normál (NS), illetve alacsony (LS) szérumszertartalmú oldatokban tenyésztettük és MTT assay segítségével mértük az élő sejt szám változását (A). A pontok három különböző kísérlet átlagértékeit jelölik (\pm SE). A szérumszertartalom, illetve a tonicitás változásának hatását a differenciálódási markerekre Western blot technika segítségével határoztuk meg a tenyésztés 10. napján (A). A fenti kísérleteket megismételtük olyan körülmények között, amikor a tenyésztőoldat szérumszertartalmát a 6. napon hirtelen lecsökkentettük, illetve átváltottuk alacsony szérumszertartalmú, hypotóniás oldatra (B). Kísérleteink folytatásában a sejteket kezdetben alacsony szérumszertartalmú oldatban tenyésztettük, majd a 6. napon átváltottuk alacsony szérumszertartalmú, hypotóniás, illetve normál szérumszertartalmú oldatra (C).

Alacsony szérumszámú, izotóniás oldatban csökkent az élő sejtek száma a kontrollhoz képest (**26/A ábra**, MTT assay). Ugyanakkor a sejtek differenciálódása ezen körülmények között fokozódott, amint azt a differenciálódási marker involucrin, fillagrin és transzglutamináz szintjének növekedése mutatta (**26/A ábra**, Western blot). Amennyiben a sejteket alacsony szérumszámú, hypotóniás oldatban tenyésztettük, a differenciálódási markerek szintje kismértékben változott a kontrollhoz (normál szérumszámú, normotóniás oldat) képest.

Normál szérumszámú (NS) oldatból alacsony szérumszámúra (LS) történő váltáskor lecsökkent az élő sejtek száma és ezzel párhuzamosan megemelkedett a differenciálódási markerek szintje (**26/B ábra**). Amennyiben a sejteket NS oldatból LS50- be (alacsony szérumszámú, hypotóniás tenyésztőoldat) tettük át, akkor az élő sejtek számának csökkenése és a differenciálódási markerek szintjének növekedése jelentősen kisebb volt, mint a fent említett kísérletekben.

Abban az esetben, ha a tenyésztőmédiüm a kísérlet kezdetétől fogva alacsony szérumszámú volt, mind a hypotóniás stressz, mind a normál szérumszámra való visszatérés növelte az élő sejtek számát (**26/C ábra**).

Összességében tehát elmondható, hogy a hirtelen hypotóniás stresszhatás fokozza az élő sejtek számát és csökkenti a differenciálódás mértékét. Feltételezhető tehát, hogy valószínűleg nem a folyamatos mechanikai stresszhatás, hanem inkább a terhelés hirtelen változása okozza azon hyperproliferatív eltéréseket, amelyek esetenként klinikailag is jelentkező tünetekben nyilvánulhatnak meg.

MEGBESZÉLÉS

A hajciklus időbeli „eltolódása” TRPV1 knockout egerekben

Napjainkban egyre több közlemény számol be arról, hogy a TRPV1, a szenzoros idegrendszeren kívül, számos perifériás szövet- és sejtípusban is kifejeződik. Ezen eredményekhez kapcsolódva, jelen kísérleteinkben először írtuk le a TRPV1 expresszióját egér bőr és szőrtüsző többféle nem-neuronális sejtfeleségén. Bebizonyosodott az is, hogy az epidermalis és follikuláris kifejeződési mintázat nagyban hasonlít a humán bőrben megfigyeltékhez (Denda és mtsai, 2001; Inoue és mtsai, 2002; Southall és mtsai, 2003; Ständer és mtsai, 2004; Bodó és mtsai, 2004 és 2005). Ugyancsak hasonlóságnak mutatkozott, hogy a TRPV1 expressziója egér bőrben is jelentős mértékben függ a hajciklus stádiumaitól (azaz katagénben fokozódott).

A TRPV1 funkcionális szerepe jól vizsgálható kontroll és TRPV1 knockout állatok összehasonlításával. Kísérleteink tanulsága szerint a hajciklus fázisainak időtartamában lényeges különbség volt megfigyelhető a kontroll és a knockout állatok között: a TRPV1-et nem expresszáló állatok szőrtüszőinek fejlődése jelentős késést mutatott a vad típusúakhoz képest. Ez az eredmény ugyancsak összhangban van korábbi, a tenyésztett humán szőrtüszők vizsgálatokor nyert adatainkkal, miszerint a TRPV1 capsaicinnel történő aktivációja elősegíti az anagén- katagén átalakulást (Bodó és mtsai, 2005). Ezen eredmények azzal magyarázhatóak, hogy a TRPV1 aktivációja – csökkentve a szőrszál elongációját és a mátrix keratinocyták proliferációját, valamint apoptózist indukálva – katagén transzformációhoz vezet (mely fázisra a regresszió és az apoptotikus folyamatok beindulása jellemző) (Paus, 1998). Úgy tűnik tehát, hogy

(legalább is a TRPV1-mediált folyamatok vonatkozásában) az egér bőr és szőrtüsző vizsgálata jó modellként egészítheti ki a humán folliculus vizsgálatát célzó kísérleteket (Nakamura és mtsai, 2001; Stenn és Paus, 2001).

Eredményeink potenciális klinikai jelentőséggel is bírnak. Eszerint a TRPV1 farmakológiai aktiválása csökkentheti a bőr és a szőrtüsző sejteinek osztódását. Ezáltal különféle vanilloid agonisták hatásosan alkalmazhatók egyes bőrgyógyászati betegségek, így pl. a fokozott szőrnövekedéssel járó kórképekben (pl. hirsutismus). Hasonló logikát követve, a csökkent szőr- illetve hajnövekedéssel, illetve fokozott hajhullással járó állapotokban (pl. alopecia, effluvium) TRPV1 antagonistáknak lehet terápiás haszna.

A cannabinoid rendszer szerepe a humán szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában

A legújabb kutatások szerint a bőr és függelékei nem csupán barrier szerepet töltenek be, hanem felfoghatóak egy nem szokványos neuro-immuno-endokrin rendszernek is (Slominski és Wortsman, 2000). Ennek mintegy „bizonyítékként” kísérleteinkben kimutattuk, hogy az endocannabinoid AEA (mely eredményeink szerint önmagában a folliculusokban is termelődik) és a jól ismert exogén cannabinoid Δ^9 -THC számos biológiai funkciót befolyásol a humán szőrtüszőben. Így mindkét molekula – valószínűsíthetően CB1-mediálta útvonalon keresztül – csökkenti a hajszál elongációját és fokozott apoptózissal járó katagén transzformációt indukál. Így a cannabinoid rendszer aktivációjakor a humán szőrtüszőben bekövetkező változások összhangban vannak azokkal a kutatásokkal, melyekben az AEA apoptotikus hatásáról számoltak be különböző szövetekben (pl. prostata) (Pisanti és mtsai, 2006).

Kísérleteink során kimutattuk azt, hogy a humán szőrtüszőben a CB1 mind protein, mind pedig mRNS szinten kifejeződik, valamint, hogy expressziója a katagén fázisban fokozódik. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a humán follikulus mind forrása, mind pedig célpontja az endocannabinoid AEA-nak, mely így a hajciklus egyik újonnan leírt negatív regulátoraként funkcionál. Érdekes módon a másik endocannabinoid, a 2-AG csak igen alacsony koncentrációban volt megtalálható a szőrtüszőben. Ennek magyarázataként feltételezzük, hogy a follikulusban magas a 2-AG lebontásában szerepet játszó enzimek kifejeződése (Di Marzo és mtsai, 2004; Piomelli, 2005; Pacher és mtsai, 2006).

Korábbi irodalmi adatok bemutatták, hogy az AEA celluláris hatásait CB1, CB2 és/vagy (a szőrtüszőben ugyancsak proliferáció-gátlást okozó) TRPV1 mediálta útvonalon keresztül hozza létre (azaz mind endocannabinoid, mind endovanilloid funkciókkal rendelkezhet) (DiMarzo és mtsai, 2002 és 2004; Piomelli, 2005; Pacher és mtsai, 2006; Felder és mtsai, 2006). Ezért munkánk egyik fontos célja volt meghatározni azt is, hogy az endocannabinoidok mely receptor(ok)on fejtik ki hatásukat. Az AEA elongációt csökkentő hatását teljes mértékben kivédte a CB1 specifikus antagonistá AM-251, ugyanakkor a TRPV1 antagonistá hatástalannak bizonyult. Feltételezhető tehát, hogy az AEA hatásait kizárólag a CB1 aktivációját keresztül fejtik ki. Az AEA és a TRPV1 agonista capsaicin együttes alkalmazásakor megfigyelt additív hatás tovább erősítette a fenti hipotézist. Elmondható tehát, hogy a szoros kapcsolatban levő, endogén cannabinoid és a vanilloid rendszerek egymástól függetlenül (de egymást „segítve”) befolyásolják a szőrtüszők biológiai funkcióit. Ezt a feltételezést tovább erősítik azon fent bemutatott eredményeink, melyek szerint a TRPV1 knockout

egerekben a folliculus morfogenezise során szignifikánsan késik a katagén fázis kialakulása a vad típusú állatokhoz képest.

Habár kísérletes eredményeink szerint a szőrtüsző képes az endocannabinoidok termelésére (lehetőséget teremtve a folliculus folyamatainak parakrin-autokrin szabályozására), meglepő, hogy a CB1 antagonistá AM-251 önmagában nem befolyásolta a szőrszál elongációját. Ugyanakkor irodalmi adatokból tudjuk (DiMarzo és mtsai, 2004; Piomelli, 2005; Pacher és mtsai, 2006), hogy az endocannabinoidok szintje változhat különböző, pl. gyulladásos bőrbetegségekben. Mivel ezen kórképekkel gyakran jár együtt hajhullás (Paus és mtsai, 2003; Paus és mtsai, 2005), ezért feltételezhető, hogy az endocannabinoidok expressziója fokozódik. Mivel a CB1 antagonisták kivédtek a cannabinoidok elongációt gátló hatását, ezért a hajhullással járó betegségek kezelésében a CB1 antagonistáknak jelentős terápiás szerepe lehet (akár TRPV1 antagonistákkal együtt alkalmazva). Ehhez hasonlóan, ugyancsak pl. vanilloid agonistákkal kombinálva, a fokozott szőrnövekedéssel járó betegségek gyógyításában a cannabinoid agonisták lokális alkalmazásának lehet nagy jelentősége.

A mechanoszenzitív csatornák aktivációjának hatása keratinocyták elektrofiziológiai sajátságaira, proliferációjára és differenciálódására

A mechanoszenzitív csatornák vizsgálatakor kapott eredményeink azt mutatták, hogy az oldat tonicitásának csökkentése egyre negatívabb értékek felé "tolta el" a sejtek membránpotenciálját. Ez a hatás arra enged következtetni, hogy a keratinocyták felszínén mechanoszenzitív anion- (negatív töltésű ionok beáramlása → hyperpolarizáció) vagy kationcsatornák (pozitív töltésű ionok kiáramlása → hyperpolarizáció) találhatóak. Az extracelluláris Cl⁻ elvonása szignifikánsan csökkentette

a hyperpolarizáció mértékét, ezért a tapasztalt membránpotenciálváltozás hátterében részben Cl^- -csatornák megnyílása és Cl^- beáramlása valószínűsíthető, ami megerősíti a korábbi irodalmi adatokat (Rugolo és mtsai, 1992).

A mechanoszenzitív csatornák másik típusát a nem-specifikus kationcsatornák alkotják. Ezek egy része elsősorban Ca^{2+} -ra permeabilis, így megnyílásuk megnöveli az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t. Mivel Ca^{2+} -mentes körülmények között a hypotóniás oldatok által kiváltott kalciumtranziensek amplitúdója szignifikánsan csökkent, ezért feltételezhető, hogy az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedése a membránban jelenlévő MSC-k megnyílásának és ezáltal az extracelluláris Ca^{2+} beáramlásának a következménye. Megvizsgáltuk azt is, hogy az általunk regisztrált Cl^- -áram megjelenése az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedésének a következménye. Mivel a Ca^{2+} -kelátor BAPTA jelenlétében elvégzett kísérletek eredményei nem mutattak jelentős eltérést a normál Ca^{2+} tartalmú oldathoz képest, ezért valószínű, hogy a Cl^- -csatornák aktivációja független az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tól.

Az osmotikus stressz, valamint az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megváltozása a sejtek proliferációját és differenciálódását is befolyásolja (Walker és mtsai, 2006). Ismert, hogy a fent említett folyamatokban a PKC izoenzimek is jelentős szerepet játszanak (Papp és mtsai, 2003). Kísérleteinkből az a következtetés vonható le, hogy a PKC rendszer aktivációja valószínűleg a mechanoszenzitív csatornák foszforilációja révén növelte a csatornák megnyílási valószínűségét, ezáltal nagyobb amplitúdójú Cl^- illetve Ca^{2+} -áramot indukál a keratinocytákon.

A kísérleteinkben alkalmazott hypotóniás oldat jól modellezi a sejteket érő mechanikai stresszhatást, mely által okozott keratinocytá- hyperproliferáció régóta ismert jelenség a bőrgyógyászatban (bőrkeményedés). Kísérletes eredményeink alapján elmondható, hogy a hirtelen hypotóniás stresszhatás fokozza az élő sejtszámot és

csökkenti a differenciálódás mértékét keratinocytákban. Feltételezhető tehát, hogy valószínűleg nem a folyamatos mechanikai stresszhatás, hanem inkább a terhelés hirtelen változása okozza azon hyperproliferatív eltéréseket, amelyek esetenként klinikailag is jelentkező tünetekben nyilvánulhatnak meg. Ez összhangban van más kutatócsoportok tapasztalataival, akik szintén azt találták, hogy a periódikus mechanikai terhelés okozza a sejtek hyperproliferációját (Takei és mtsai, 1997).

Összességében kísérleteinkből az a következtetés vonható le, hogy az ozmolaritás megváltozása, mint egyfajta mechanikai stressz, a keratinocyták hyperproliferációját és de-differenciálódását okozhatja. Ezen változásokat részben Cl^- -ra permeabilis MSC-k megnyílása alakítja ki, de a hosszútávú hatásokért az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megváltozása is felelős lehet.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben különféle jelátviteli mechanizmusok szerepét vizsgáltuk a bőr és függelékei biológiai folyamatainak szabályozásában. Munkánk során először írtuk le a transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) expresszióját egér bőr és szőrtüsző nem-neuronális sejtjein. Bemutattuk, hogy a TRPV1 kifejeződése egér bőrben (hasonlóan korábbi humán adatainkhoz) jelentős mértékben függ a hajciklus stádiumaitól. Megállapítottuk, hogy a TRPV1 génhányos állatok szőrtüszőinek fejlődése jelentős késést mutat a vad típusú egerekhez képest. Mindezen adatok a TRPV1-kapcsolt jelátviteli folyamatok gátló szerepére utalnak a szőrtüsző növekedésének szabályozásában. A cannabinoid rendszer tanulmányozása során kimutattuk, hogy a humán szőrtüsző jelentős mennyiségű endocannabinoid anandamidot (AEA) termel. Bebizonyosodott az is, hogy AEA és a jól ismert exogén cannabinoid Δ^9 -THC – valószínűsíthetően cannabinoid receptor-1 mediálta útvonalon keresztül – csökkenti a hajszál elongációját és a mátrix keratinocyták proliferációját, valamint fokozott apoptózissal járó katagén transzformációt indukál. Bemutattuk, hogy a szoros kapcsolatban levő, endogén cannabinoid és a vanilloid rendszerek egymástól függetlenül (de egymást additív módon „segítve”) befolyásolják a szőrtüszők biológiai funkcióit. Végezetül a mechanoszenzitív csatornák (MSC) szabályozó szerepét vizsgáltuk humán keratinocytákon. Megállapítottuk, hogy az ozmolaritás (főként hirtelen) megváltozása, mint egyfajta mechanikai stressz, a keratinocyták hyperproliferációját és de-differenciálódását okozhatja. Ezen változásokat részben Cl^- -ra permeabilis (és PKC szabályozott) MSC-k megnyílása alakítja ki, de a hosszútávú hatásokért az intracelluláris kalciumkoncentráció megváltozása is felelős lehet.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ács G, Palkovits M, Blumberg PM. Specific binding of [3H] resiniferatoxin by human and rat preoptic area, locus ceruleus, medial hypothalamus, reticular formation and ventral thalamus membrane preparations. *Life Sci.* 1996; **59**:1899-1908
- Ahsan MK, Urano Y, Kato S, Oura H, Arase S. Immunohistochemical localization of thyroid hormone nuclear receptors in human hair follicles and in vitro effect of L-triiodothyronine on cultured cells of hair follicles and skin. *J Med Invest* 1998; **44**:179-84
- Amantini C, Mosca M, Luccarini R, Perfumi M, Morrone S, Piccoli M, Santoni G. Distinct thymocyte subsets express the vanilloid receptor VR1 that mediates capsaicin-induced apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 2004; **11**:1342-1356
- Arck PC, Handjiski B, Peters EM, Peter AS, Hagen E, Fischer A, Klapp BF, Paus R. Stress inhibits hair growth in mice by induction of premature catagen development and deleterious perifollicular inflammatory events via neuropeptide substance P-dependent pathways. *Am J Pathol* 2003; **162**:803-14
- Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Barg J, Mechoulam R, Vogel Z. The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett.* 1995; **375**:143-7
- Benham CD, Davis JB, Randall AD. Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology* 2002; **42**:873-888
- Bevan SJ, Docherty RJ, Wood J. Cellular mechanisms of the action of capsaicin. In *Capsaicin in the study of pain.* (Wood J ed) 1993; 27-44, Academic Press, New York
- Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ. Vanilloid receptor expression suggests a sensory

- role for urinary bladder epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; **98**:13396-13401
- Bíró T, Ács G, Modarres S, Blumberg PM. Recent advances in understanding of vanilloid receptors: A therapeutic target for treatment of pain and inflammation in skin. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 1997; **2**:56-60
- Bíró T, Brodie C, Modarres S, Lewin NE, Ács P, Blumberg PM. Specific vanilloid responses in C6 rat glioma cells. *Mol. Brain Res.* 1998a; **56**:89-98
- Bíró T, Maurer M, Modarres S, Lewin NE, Brodie C, Acs G, Acs P, Paus R, Blumberg PM. Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood*. 1998b; **91**:1332-1340
- Bíró T, Tóth BI, Marincsák R, Dobrosi N, Géczy T, Paus R. TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch. *Biochim Biophys Acta*. 2007; **1772**:1004-21
- Blazquez C, Carracedo A, Barrado L, Real PJ, Fernandez-Luna JL, Velasco G, Malumbres M, Guzman M. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J*. 2006; **20**:2633-5
- Boczán J, Boros S, Mechler F, Kovács L, Bíró T. Differential expressions of protein kinase C isozymes during proliferation and differentiation of human skeletal muscle cells in vitro. *Acta Neuropathol*. 2000; **99**:96-104
- Bodó E, Bíró T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Toth IB, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Kovacs L, Paus R. A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signalling in human hair growth control. *Am J Pathol*. 2005; **166**:985-98
- Bodó E, Kovács I, Telek A, Varga A, Paus R, Kovács L, Bíró T. Vanilloid receptor-1 (VR1) is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin. *J Invest Dermatol*. 2004; **123**:410-3
- Bollag W B, Ducote J, Harmon C S. Effects of the selective protein kinase C inhibitor, Ro 31-7549, on the proliferation of cultured mouse epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol*. 1993; **100**:240-246

- Botchkarev VA, Eichmüller S, Johansson O, Paus R. Hair cycle-dependent plasticity of skin and hair follicle innervation in normal murine skin. *J. Comp. Neurol.* 1997; **386**:379-395
- Botchkarev VA, Botchkareva NV, Albers KM, van der Veen C, Lewin GR, Paus R. Neurotrophin-3 involvement in the regulation of hair follicle morphogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 1998a; **111**:279-285
- Botchkarev VA, Welker P, Albers KM, Botchkareva NV, Metz M, Lewin GR, Bulfone-Paus S, Peters EM, Lindner G, Paus R. A new role for neurotrophin-3 involvement in the regulation of hair follicle regression (catagen). *Am. J. Pathol.* 1998b; **153**:785-799
- Botchkarev VA, Botchkareva NV, Albers KM, Chen LH, Welker P, Paus R. A role for p75 neurotrophin receptor in the control of apoptosis-driven hair follicle regression. *FASEB J.* 2000; **14**:1931-1942
- Botchkareva NV, Botchkarev VA, Chen LH, Lindner G, Paus R. A role for p75 neurotrophin receptor in the control of hair follicle morphogenesis. *Dev. Biol.* 1999; **216**:135-53
- Botchkareva NV, Khlgatian M, Longley BJ, Botchkarev VA, Gilchrist BA. SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. *FASEB J.* 2001; **15**:645-658
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem.* 1996; **237**:704-11
- Boukamp P, Rule T, Petrussevska, Dirk Breitkreutz, Jürgen Hornung, Alex Markham and Norbert E. Fusenig. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *The Journal of Cell Biology* 1988; **106**: 761-771

- Casanova ML, Blazquez C, Martinez-Palacio J, Villanueva C, Fernandez-Acenero MJ, Huffman JW, Jorcano JL, Guzman M. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest.* 2003; **111**:43-50
- Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Ann. Rev. Neurosci.* 2001; **24**:487-517
- Caterina MJ, A. Leffler, A.B. Malmberg, W.J. Martin, J. Trafton, K.R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A.I. Basbaum, D. Julius. Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. *Science* 2000; **288**: 306-312
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin-receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; **389**:816-824
- Chanda S, Robinette CL, Couse JF, Smart RC. 17 β -estradiol and ICI-182780 regulate the hair follicle cycle in mice through an estrogen receptor-alpha pathway. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000; **15**:2205-2214
- Chase HB. Growth of the hair. *Physiol. Rev.* 1954; **34**:113-126
- Chitano P, Di Blasi P, Lucchini RE, Calabro F, Saetta M, Maestelli P, Fabbri LM, Mapp CE. The effects of toluene diisocyanate and of capsaicin on human bronchial smooth muscle in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; **270**:163-173
- Christensen O. Mediation of cell volume regulation by Ca²⁺ influx through stretch-activated channels. *Nature* 1987; **330**:66-668
- Dascalu A, Matithyou A, Oron Y, Korenstein R. A hyperosmotic stimulus elevates intracellular calcium and inhibits proliferation of a human keratinocyte cell line. *J Invest Dermatol* 2000; **115**: 714–718.
- Dawber R (ed). *Diseases of the hair and scalp.* 1997; 606-625. Blackwell Science, Oxford

- Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A, Matsunaga K. Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem. Biophys. Commun.* 2001; **285**:1250-1252
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; **258**:1946-9
- Di Marzo V, Blumberg PM, Szállási Á. Endovanilloid signaling in pain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002; **12**:372–379
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004; **3**:7712-7784
- Di Marzo V, De Petrocellis L. Plant, synthetic and endogenous cannabinoids in medicine. *Ann. Rev. of Medicine* 2005; **57**:553-574
- Dvorak M, Watkinson A, McGlone F, Rukwied R. Histamine induced responses are attenuated by a cannabinoid receptor agonist in human skin. *Inflamm Res.* 2003; **52**:238-45
- Ellis JL, Sham JSK, Udem BJ. Tachikinin-independent effects of capsaicin on smooth muscle in human isolated bronchi. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1997; **155**:751-755
- Estep KG, D'Ambra TE, Olefirowicz EM, Bell MR, Eissenstat MA, Haycock DA, Ward SJ. Conformationally restrained aminoalkylindoles: potent, stereoselective ligands at the cannabinoid binding site. *NIDA Res Monogr.* 1990; **105**: 427-8
- Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Procl Natl Acad Sci USA* 1995; **92**:3376-80
- Felder CC, Dickason-Chesterfield AK, Moore SA. Cannabinoids biology: the search for new therapeutic targets. *Mol. Interv.* 2006; **6**:149-61

- Fernandez-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolon RM, Ramos JA, Guzman M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci.* 2007; **28**:39-45
- Foitzik K, Lindner G, Müller-Röver S, Maurer M, Botchkareva N, Botchkarev V, Handjiski B, Metz M, Hibino T, Soma T, Dotto GP, Paus R. Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta 1 in vivo. *FASEB J.* 2000; **14**:752-760
- Foitzik K, Paus R, Dortschman T, Dotto GP. The TGF-beta2 isoform is both required and sufficient inducer of murine hair follicle morphogenesis. *Dev Biol.* 1999; **212**:278-289
- Fowler CJ. Pharmacological properties and therapeutic possibilities for drugs acting upon endocannabinoid receptors. *Curr. Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005; **4**: 685-96
- Fride E. Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior. *Curr. Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005; **4**: 633-42
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G and Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J. Biochem.* 1995; **232**: 54-61
- Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM, Ferrer-Montiel A: Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**:32552-32558
- Gilliam AC, Kremer IB, Yoshida Y, Stevens SR, Tootell E, Teunissen MB, Hammerberg C, Cooper KD. Human hair follicle: a reservoir of CD40+ B7-deficient Langerhans cells that populate epidermis after UVB exposure. *J. Invest. Dermatol.* 1998; **110**:422-427
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 1985; **260**:3440-50

- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur. J. Neurosci.* 1999; **11**:946-958
- Hardy M. The secret life of hair follicle. *Trends. Genet.* 1992; **8**:55-61
- Hébert JM, Rosenquist T, Götz J, Martin GR. FGF5 as a regulator of the human hair growth cycle: evidence targeted and spontaneous mutations. *Cell* 1994; **78**:1017-1025
- Holzer P. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.* 1991; **43**:143-200
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R and Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharm. Reviews.* 2002; **54**: 161-202
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; **97**:6155-6160
- Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht P, Rice F, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah T, Mata H, Malan T. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; **102**:3093-3098
- Inoue K, Koizumi, Fuziwara S, Denda S, Inoue K, Denda M. Functional vanilloid receptor in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; **291**:124-129
- Ito T, Ito N, Bettermann A, Tokura Y, Takigawa M, Paus R. Collapse and restoration of MHC class-I-dependent immune privilege: exploiting the human hair follicle as a model. *Am. J. Pathol.* 2004; **164**:623-634

- Ito T, Ito N, Saathoff M, Bettermann A, Takigawa M, Paus R. Interferon-gamma is a potent inducer of catagen-like changes in cultured human anagen hair follicles. *Br J Dermatol.* 2005; **152**:623-31
- Jahoda CAB, Reynolds AJ. Dermal-epidermal interactions: adult follicle-derived cell populations and hair growth. *Dermatol. Clin.* 1996; **14**:573-584
- Jahoda CAB, Whitehouse J, Reynolds AJ, Hole N. Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp. Dermatol.* 2003; **12**:849-859
- Jahoda CAB. Cellular and developmental aspects of androgenetic alopecia. *Exp. Dermatol.* 1998; **7**:235-48
- Jancsó N. Role of the nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bull. Millard Fillmore Hosp.* 1960; **7**:53-77
- Jancsó N: Desensitization with capsaicin and related acylamides as a tool for studying functional pain receptors. *In Pharmacology of pain.* Lim RKS (ed), 1968; 33-55, Pergamon Press, Oxford.
- Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J, Jancsó N. Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structure by capsaicin in rats. *J. Physiol.* 1970; **208**:449-459
- Jian-Ping Gong, Emmanuel S. Onaivi, Hiroki Ishiguro, Quing-Rong Liu, Patricia A. Tagliaferro, Alicia Brusco and George R. Uhl. Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Research Report.* 2006; **1071**:10-23
- Johanek LM, Simone DA. Activation of peripheral cannabinoid receptors attenuates cutaneous hyperalgesia produced by a heat injury. *Pain*; **109**:432-42
- Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; **97**:8134-8139
- Kedei N, Szabó T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**:28613-28619

- Kwak J, Wang MH, Hwang SW, Kim TY, Lee SY, Oh U. Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains. *J. Neurosci.* 2000; **20**:8298-8304
- Kippenberger S, Bernd A, Loitsch S et al. Signaling of mechanical stretch in human keratinocytes via MAP kinases. *J Invest Dermatol* 2000; **114**:408–412.
- Lai J-P, Douglas SD, Ho W-Z. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J. Neuroimmunol.* 1998; **86**:80-86
- Langbein L, Rogers MA, Praetzel S, Aoki N, Winter H, Schweizer J. A novel epithelial keratin, hK6irs, is expressed differentially in all layers of the inner root sheath including specialized huxley cells (Fügelzellen) of the human hair follicle. *J. Invest. Dermatol.* 2002; **118**:789-799
- Langbein L, Rogers MA, Winter H, Praetzel S, Beckhaus U, Rackwitz HR, Schweizer J. The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**:19874-19884
- Langbein L, Rogers MA, Winter H, Praetzel S, Schweizer J. The catalog of human hair keratins. II. Expression of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and II keratins. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**:35123-35132
- Lázár J, Szabó T, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T: Distinct features of recombinant rat vanilloid receptor-1 expressed in various expression systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; **60**:2228-2240
- Lazzeri M, Vannucchi MG, Zardo C, Spinelli M, Beneforti P, Turini D, Faussone-Pellegrini MS. Immunohistochemical Evidence of Vanilloid Receptor 1 in Normal Human Urinary Bladder. *Eur. Urol.* 2004; **46**:792-798
- Le Panse R, Coulomb B, Mitev V, Bouchard B, Lebreton C, Dubertret L. Differential modulation of human fibroblast and keratinocyte growth by the protein kinase C inhibitor GF 109203X. *Mol. Pharmacol.* 1994; **46**:445–451

- Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Ling G, van der Veen C, Paus R. Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am. J. Pathol.* 1997; **151**:1601-1617
- Lindner G, Menrad A, Gherardi E, Merlino G, Welker P, Hadjiski B, Roloff B, Paus. Involvement of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling. *FASEB J.* 2000; **14**:319-332
- Lundberg JM: Capsaicin-sensitive sensory nerves in the airways-implications for protective reflexes and disease. *Capsaicin in the Study of Pain* (Wood JN ed) 1993;219-238, Academic Press, New York
- Maccarrone M, Di Rienzo M, Battista N, Gasperi V, Guerrieri P, Rossi A, Finazzi-Agro A. The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. *J Biol Chem.* 2003; **278**:33896-903
- Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J.* 2006; **8**:E298-306
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;**346**: 561-4
- Mimeault M, Pommery N, Hénichart JP. New advances on prostate carcinogenesis and therapies: involvement of EGF-EGFR transduction system. *Prostate* 2003; **21**:1-14
- Montagna W, Parakkal FP (eds). *The Structure and Function of the Skin.* 1974; Academic Press, New York
- Montagna W, Ellis RA: *The biology of Hair Growth.* 1958; Academic Press, New York
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; **365**:61-5

- Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmuller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS, Paus R. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J. Invest. Dermatol.* 2001; **117**:3-15
- Müller-Röver S, Rossiter H, Lindner G, Peters EM, Kupper TS, Paus R. Hair follicle apoptosis and Bcl-2. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 1999; 4:272-277
- Nakamura M, Sundberg JP, Paus R. Mutant laboratory mice with abnormalities in hair follicle morphogenesis, cycling, and/or structure: annotated tables. *Exp Dermatol.* 2001; **10**:369-90
- Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* 2001; **81**:1415-1459
- Oh HS, Smart RC. An estrogen receptor mediated pathway regulates the telogen-anagen hair follicle transition and influences epidermal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; **93**:12525-12530
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasent L, Uhl GR. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; **1074**:514-36
- Ost D, Roskams T, Van Der Aa F, De Ridder D. Topography of the vanilloid receptor in the human bladder: more than just the nerve fibers. *J. Urol.* 2002; **168**:293-297
- Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 2006; **58**:389-462
- Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Liu J, Harvey-White J, Brassai A, Jarai Z, Cravatt B F, Kunos G. Hemodynamic profile, responsiveness to anandamide, and baroreflex sensitivity of mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; **289**:H533-541
- Panteleyev AA, Jahoda CAB, Christiano AM. Hair follicle predetermination. *J. Cell. Sci.* 2001; **114**:3419-3431

- Panteleyev AA, Botchkareva NV, Sundberg JP, Christiano AM, Paus R. The role of the hairless (hr) gene in the regulation of hair follicle catagen transformation. *Am. J. Pathol.* 1999; **155**:159-171
- Papp H, Czifra G, Lazar J, Gonczi M, Csernoch L, Kovacs L, Biro T. Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 2003; **12**:811–824
- Partsch G, Matucci-Cerinic M. Capsaicin stimulates the migration of human polymorphonuclear cells (PMN) in vitro. *Life. Sci.* 1993; **53**:PL309-PL314
- Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *N. Engl. J. Med.* 1999; **341**:491-497
- Paus R. Principles of hair cycle control. *J. Dermatol.* 1998; **25**:793-802
- Paus R, Peters EM, Eichmüller S, Botchkarev VA. Neural mechanisms of hair growth control. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 1997; **2**:61-68
- Paus R, Schmelz M, Bíró T, Steinhoff M. Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy. *J. Clin. Invest.* 2006; **116**:1174-86
- Paus R, Stenn KS, Link RE. Telogen skin contains an inhibitor of hair growth. *Br. J. Dermatol.* 1990; **122**:777-784
- Paus, R., Ito, N., Takigawa, M., Ito, T. The hair follicle and immune privilege. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2003; **8**:188-194
- Paus, R., Nickoloff, B. J., Ito, T. A 'hairy' privilege. *Trends Immunol.* 2005; **26**:32-40
- Paus R, Heinzelmann T, Schultz KD, Furkert J, Fechner K, Czarnetzki BM. Hair growth induction by substance P. *Lab. Invest.* 1994a; **71**:134-140
- Paus R, Maurer M, Slominski A, Carnetzki BM. Mast cell involvement in murine hair growth. *Dev. Biol.* 1994b; **163**:230-240
- Pertwee RG. Pharmacology of Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors. *Pharmacol Ther.* 1997; **74**:129-80

- Peters EM, Botchkarev VA, Müller-Röver S, Moll I, Rice FL, Paus R. Developmental timing of hair follicle and dorsal skin innervation in mice. *J. Comp. Neurol.* 2002; **448**:28-52
- Peters EM, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Tobin DJ, Paus R. Hair-cycle-associated remodeling of the peptidergic innervation of murine skin, and hair growth modulation by neuropeptides. *J. Invest. Dermatol.* 2001; **116**:236-245
- Philpott MP, Sanders DA, Bowen J, Kealey T. Effect of interleukins, colony-stimulating factor and tumour necrosis factor-alpha in alopecia areata. *Br. J. Dermatol.* 1996; **135**:942-948
- Philpott MP, Sanders DA, Kealey T. Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles: IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 1994a; **102**:857-861
- Philpott MP, Sanders DA, Westgate GE, Kealey T. Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle biology. *J. Dermatol. Sci.* 1994b; S55-72
- Piomelli D. The endocannabinoid system: a drug discovery perspective. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2005; **6**:672-679
- Premkumar LS: Interaction between vanilloid receptors and purinergic metabotropic receptors: pain perception and beyond. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; **98**:6537-6539
- Powel BC, Rogers GE. The role of keratin proteins and their genes in the growth, structure and properties of hair. *In Formation and Structure of Hair* (Joles P, Zahn H, Höcker H eds), 1997; 59-148, Birkhäuser, Basel
- Rácz I, Török I, Horváth A. Gyakorlati bőrgyógyászat. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 1994
- Randall VA, Hibberts NA, Thornton MJ, Merrick AE, Hamada K, Kato S, Jenner TJ, de Oliveira I, Messenger AG. Do androgens influence hair growth by altering the paracrine factors secreted by dermal papilla cells? *Eur. J. Dermatol.* 2001; **11**:315-320

- Reichelt J. Mechanotransduction of keratinocytes in culture and in the epidermis. *Eur J Cell Biol.* 2007
- Reynolds AJ, Lawrence C, Cserhalmi-Friedman PB, Christiano AM, Jahoda CA.: Transgender induction of hair follicles. *Nature.* 1999; **402**:33-34
- Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Shire D, Bouaboula M, Oustric D, Barth F, Casellas P, Ferrara P, Le Fur G. Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; **278**:871-8
- Rugolo M, Mastrocola T, De Luca M, Romeo G, Galiotta L J V. A volume-sensitive chloride conductance revealed in cultured human keratinocytes by $^{36}\text{Cl}^-$ efflux and whole-cell patch clamp recording. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1112**:39–44.
- Sachs F, Morris C E. Mechanosensitive ion channels in nonspecialized cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1998; **132**:1–77.
- Sackin H. Mechanosensitive channels. *Annu Rev. Physiol.* 1995; **57**:333-353
- Sasamura T, Sasaki M, Tohda C, Kuraishi Y. Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport.* 1998; **9**:2045-2048
- Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the Skin. *Endocrine Reviews* 2000; **21**: 457-487
- Soma T, Tsuji Y, Hibino T. Involvement of transforming growth factor beta2 in catagen induction during the human hair cycle. *J. Invest. Dermatol.* 2002; **118**:65-68
- Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; **304**:217-222
- Staender S, Schmelz M, Metze D, Luger T, Rukwied R. Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibres and adnexal structures in human skin. *J. Dermatol. Sci.* 2005; **38**: 177-88
- Stenn K, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol. Rev.* 2001; **81**: 449-494

- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res.* 2006; **45**:405-46
- Szallasi A. Autoradiographic visualization and pharmacological characterization of vanilloid (capsaicin) receptor in several species, including man. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* 1995; **629**:1-68
- Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 1999; **51**:159-212
- Szentágothai J, Réthelyi M. Funkcionális Anatómia. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2002
- Szolcsányi J, Joó F, Jancsó-Gábor A. Mitochondrial changes in preoptic neurones after capsaicin desensitization of the hypothalamic thermodetectors in rats. *Nature* 1971; **299**:116-117
- Szolcsányi J. Capsaicin type pungent agents producing pyrexia. In *Handbook of experimental pharmacology* (Milton AS ed) 1982; **60**, 437-478, Springer, Berlin
- Szolcsányi J. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J. Physiol. (Paris)* 1977; **73**:251-259
- Takei T, Han O, Ikeda M, Male P, Mills I, Sumpio BE. Cyclic strain stimulates isoform-specific PKC activation and translocation in cultured human keratinocytes. *J Cell Biochem* 1997; **67**:327-37
- Takei T, Rivas-Gotz C, Delling C A et al. Effect of strain on human keratinocytes in vitro. *J Cell Physiol* 1997b; **173**:64–72
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only follicle but also the epidermis. *Cell* 2000; **102**:451-462
- Thornton MJ. The biological actions of estrogens on skin. *Exp. Dermatol.* 2002; **11**:487-502

- Tobin DJ, Paus R. Graying gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit. *Exp. Geront.* 2001; **36**:29-54
- Tobin D, Gunin A, Magerl M, Paus R. Plasticity and cytokinetic dynamics of the hair follicle mesenchyme during the hair growth cycle: implications for growth control and hair follicle transformations. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2003; **8**:80-86
- Tobin DJ, Hagen E, Botchkarev VA, Paus R. Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)? *J. Invest. Dermatol.* 1998; **110**:902-907
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998; **21**:531-543
- Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; **98**:6951-6956
- Tresh LT. Isolation of capsaicin. *Pharm. J.* 1846; **6**:941
- van der Stelt M, Di Marzo V. Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2005; **77**:111-22
- Wahl P, Foged C, Tullin S, Thomsen C. Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.* 2001; **59**:9-15
- Walker D, Sun T, MacNeil S, Smallwood R. Modeling the effect of exogenous calcium on keratinocyte and HaCaT cell proliferation and differentiation using an agent-based computational paradigm. *Tissue Eng.* 2006; **12**:2301-9
- Welch JM, Simon SA, Reinhart PH. The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; **97**:13889-13894
- Winter J, Dray A, Wood JN, Yeats JC, Bevan S. Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: a potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Res.* 1990; **520**:131-140

- Wood JN, Winter J, James IF, Rang HP, Yeats J, Bevan S. Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J. Neurosci.* 1988; **8**:3208-3220
- Yano K, Brown LF, Detmar M. Control of hair follicle growth and size by VEGF-mediated angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 2001; **107**:409-417
- Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K. Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2004; **122**:783-90
- Zellmer S, Reissig D. Isolation, cultivation, and differentiation of normal human epidermal keratinocytes in serum-free medium. *Methods Mol. Biol.* 2002, **188**:179-84

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Itt szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak az egyetemi doktori értekezést megalapozó kísérletek elvégzésében.

Elsőként **Dr. Kovács László** és **Dr. Csernoch László** professzor uraknak, a DE OEC Élettani Intézet igazgatóinak, akik lehetővé tették számomra, hogy az Élettani Intézetben végezzem kísérleteimet.

Szeretném megköszönni **Dr. Bíró Tamás**nak, témavezetőmnek munkám során nyújtott támogatását, tapasztalatát és megértését.

Szintén köszönettel tartozom **Dr. Ralf Paus**nak, a Hamburgi Egyetem Dermatológiai Klinika professzorának optimizmusáért és meglátásaiért.

Köszönet továbbá a velem együtt dolgozó kollégáimnak, elsősorban **Bodó Enikő**nek, **Dobrosi Nórá**nak és **Gönczi Mónika**nak, akik rengeteg segítséget nyújtottak a kísérletek elvégzésében. Köszönettel tartozom továbbá **Géczy Tamás**nak, **Borbíró István**nak, **Tóth István Balázs**nak, valamint **Birte Tychsen**nek.

A nélkülözhetetlen technikai segítségért hálával tartozom **Gundula Pilnitz-Stolze**, **Silvia Wegerich**, **Monika Dietrich** és **Dr. Vargáné Kiss Ibolya** asszisztensnőknek.

És mindenekeelőtt köszönettel tartozom a családomnak és a barátaimnak, akik támogatása nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

KÖZLEMÉNYEK

AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

- 1) Bíró T, Bodó E, **Telek A**, Géczy T, Tychsen B, Kovács L, Paus R: Hair cycle control by vanilloid receptor-1 (TRPV1): evidence from TRPV1 knockout mice. *J Invest Dermatol.* 2006; **126**:1909-1912. **IF: 4,535**
- 2) **Telek A**, Bíró T, Bodó E, Tóth IB, Borbíró I, Kunos G, Paus R: Inhibition of human hair follicle growth by endo- and exocannabinoids. *FASEB J.* 2007; **21**:3534-3541. **IF: 6,721**
- 3) Gönczy M, Szentandrassy N, Fülöp L, **Telek A**, Szigeti GP, Magyar J, Bíró T, Nánási PP, Csernoch L: Hypotonic stress influence the membrane potential and alter the proliferation of keratinocytes in vitro. *Exp Dermatol.* 2007; **16**:302-310. **IF: 2,449**

TOVÁBBI IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

- 4) Bodó E, Kovács I, **Telek A**, Varga A, Paus R, Kovács L, Bíró T. Vanilloid receptor-1 (VR1) is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin. *J Invest Dermatol.* 2004; **123**:410-413. **IF: 4,238**
- 5) Bodó E, Bíró T, **Telek A**, Czifra G, Griger Z, Tóth BI, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Kovács L, Paus R: 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**:985-998. **IF: 5,796**
- 6) Gönczi M, **Telek A**, Czifra G, Balogh A, Blumberg PM, Bíró T, Csernoch L: Altered calcium handling following the recombinant overexpression of protein kinase C isoforms in HaCaT cells. *Exp Dermatol.* 2007; (közlésre elfogadva) **IF: 2,449**

- 7) Józsa T, Dienes B, **Telek A**, Hargitai Z, Pór Á, Kiss Cs: Differential expression of androgen and estrogen receptors of appendix testis in patients with descended and undescended Testes. *Int J Urol.* 2007; (közlésre elfogadva) **IF: 0,692**
- 8) Rusznák Z, Bakondi G, Kosztka L, Pocsai K, Dienes B, Fodor J, **Telek A**, Gönczi M, Szűcs G, Csernoch L: Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and non-malignant human cells. *Virchows Arch.* 2007; (közlésre elfogadva) **IF:2,251**

A közlemények összesített impakt faktora: 29,131

IDÉZHETŐ ELŐADÁSKIVONATOK:

- 1) Bodó E, Bíró T, **Telek A**, Czifra G, Griger Z, Tóth IB, Lázár J, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Pertile P, Kovács L, Paus R: A “hot twist” to hair biology – Involvement of vanilloid receptor-1 (VR1) signalling in human hair growth control. *Exp Dermatol.* 2004; **13**:581
- 2) Bíró T, **Telek A**, Dajnoki A, Bodó E, Funk W, Kovács L, Paus R: Functional cannabinoid receptor-1 expression in human skin and hair follicle - a novel endogenously active player in skin and hair biology. *J Invest Dermatol.* 2005; **124**:A103-A103 617 Suppl. S
- 3) **Telek A**, Bíró T, Bodó E, Liotiri S, Tychsen B, Paus R: Functional involvement of vanilloid receptor-1 signaling in murine hair follicle cycling. *J Invest Dermatol.* 2005; **125**:A86-A86 507 Suppl. S
- 4) Bíró T, **Telek A**, Dajnoki A, Bodó E, Funk W, Kovács L, Paus R: Functional cannabinoid receptor-1 expression in human skin and hair follicle – A novel player in skin and hair biology. *J Invest Dermatol.* 2005; **125**:A86-A86 508 Suppl. S

- 5) Bíró T, Dajnoki A, **Telek A**, Bodó E, Tóth IB, Szöllősi A, Paus R, Kovács L: Human epidermal keratinocytes display a functional endocannabinoid/endovanilloid system and show novel signaling interactions between vanilloid receptor-1 and cannabinoid receptor-1. *Exp Dermatol.* 2006; **15**:254-254
- 6) Bíró T, Dajnoki A, **Telek A**, Bodó E, Dobrosi N, Tóth IB, Paus R: The endocannabinoid/endovanilloid anandamide regulates proliferation and apoptosis of human keratinocytes via novel signaling interactions between vanilloid receptor-1 (TRPV1) and cannabinoid receptor-1 (CB1). *J Invest Dermatol.* 2006; **126**:95-95 Suppl