

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Lisztes Erika

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2019

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Lisztes Erika
okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
Dr. Szűts Viktória, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK,
Élettani Intézet
2018. április 25. 10 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Gyulai Rolland, az MTA doktora
Dr. Miskeiné Dr. Kapitány Anikó, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Gyulai Rolland, az MTA doktora
Miskeiné Dr. Kapitány Anikó, PhD
Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
Dr. Szűts Viktória, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme
2019. december 5. 13 óra

BEVEZETÉS

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

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

A koffein napjaink egyik legismertebb alkaloid vegyülete, mely ismertségét elsősorban kulináris élvezeteket nyújtó természetes forrásának, a kávécserjének

(*Coffea arabica*, *Coffea canephora*) köszönheti, és a legszélesebb körben felhasznált természetes, farmakológiailag aktív vegyületek közé tartozik a világon. Komplex biológiai aktivitásának köszönhetően manapság egyre népszerűbbé válik egyes kozmetikai termékekben való alkalmazása, melynek kulcsa abban rejlik, hogy hidrofil karakterisztikájának köszönhetően képes a bőr barrieren keresztüli penetrációra, melyben a szőracsatorna, illetve tágabb értelemben maguk a HF-k is potenciális penetrációs útvonalként szolgálhatnak. A koffein szőrnövekedésre kifejtett „pozitív” hatása abban rejlik, hogy a férfias típusú hajhullásban fokozott tesztoszteron (TST) szint által telogén fázisban „megragadt” HF-k újbóli anagén fázisba lépésének indukálásában játszik szerepet. Ezen nyomvonalon elindulva kísérleteink során szerettünk volna mélyebb betekintést nyerni a koffein hajciklust reguláló hatásába humán HF-kön; vizsgálatainkat HF-eredetű ORS keratinociták bevonásával terjesztettük ki.

CÉLKITŰZÉS

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

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

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Humán szőrtüszők izolálása, tenyésztése, elongációjának nyomon követése

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

A HF-k izolálását és tenyésztését a Michael Philpott által kidolgozott eljárás szerint végeztük. Röviden: a hajas fejbőr feldarabolását (0,5 x 1 cm) követően, határozott vágást ejtettünk a dermo-szubkutikuláris határon és az epidermisz valamint a dermisz eltávolítását követően a HF-eket csipesz segítségével kiemeltük a szubkutiszból. Ezt követően az ép, anagén VI-os növekedési fázisban levő HF-eket hármával tenyésztettük 5 napon keresztül 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú atmoszférában. Az izolált HF-k fenntartása Williams' E médiumban történt kiegészítve 2 mM L-glutaminnal, 10 ng/ml hidrokortizonnal, 10 mg/ml inzulinnal, és antibiotikummal. A tenyésztő médium cseréje minden második napon történt, míg a kezeléseket naponta végeztük. A HF-k hossznövekedésének detektálását naponta végeztük egyesével, a fénymikroszkóp okulárjába épített mikrométer segítségével. Az analizálás során az első nap mért hosszából kivontuk az adott napon mért hosszt, majd ezt a különbséget normalizáltuk az első napon mért értékre. Az utolsó mérési napon a HF-eket kriomédiumban fagyasztottuk folyékony nitrogén felhasználásával. További feldolgozás céljából 6 µm-es metszeteket készítettünk, melyek tárolása -80°C-on történt.

Humán szőrtüsző-eredetű külső gyökérhüvely keratinociták izolálása és tenyésztése

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

A HF-eket, csoportonként 20-30 darabot, csipesz segítségével távolítottuk el a hajas fejbőrrel, majd Ca^{2+} - és Mg^{2+} -mentes foszfát puffer oldattal történő alapos mosást követően 0,1% tripszin-0,2% EDTA keverékével emésztettük egy órán keresztül $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Az emésztőoldat inaktiválása 10 (v/v)% embrionális borjúsérumot tartalmazó oldattal történt. A sejteket 1000 fordulat/perc-el centrifugáltuk 8 percen keresztül, majd az így nyert ORS keratinocitákat osztódásában gátolt humán dermális fibroblaszt (FB) tápláló rétegre szélesztettük. Az ORS keratinociták tenyésztése Ham's F12 és Dulbecco's Modified Eagle's médiumok 1:3 arányú keverékében történt, kiegészítve az alábbi anyagokkal: 10 (v/v)% Fetal Clone II, 0,1 nM koleratoxin, 5 $\mu\text{g/ml}$ inzulin, 0,4 $\mu\text{g/ml}$ hidrokortizon, 2,43 $\mu\text{g/ml}$ adenin, 2 nM trijód-tironin, 10 ng/ml epidermális növekedési faktor, 1 mM aszkorbil-2-foszfát, 100 IU/ml penicillin G, valamint 25 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin. A tenyésztést 5% CO_2 tartalmú, párasított légtérben, 37°C -on végeztük. A tápoldatot kétnaponta lecseréltük, és a sejteket a 70-80%-os konfluencia szint elérésekor passzáltuk, megelőzve ezzel a tenyészetek konfluencia-indukált differenciálódását.

Sejtproliferáció vizsgálata ORS keratinocitákon

A sejtek proliferációjának nyomon követése végett egy, a DNS tartalom meghatározásán alapuló fluoreszcens kimutatási eljárást, CyQUANT assay-t használtunk. Az ORS keratinocitákat 10 000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük osztódásukban gátolt FB tápláló rétegre (900 sejt/lyuk) 96 lyukú fekete falú,

áttetsző aljú lemezekre, majd elvégeztük a megfelelő kezeléseket, négy ismétléssel. Ezt követően eltávolítottuk a felülúszót, majd a lemezt -80 °C-ra helyeztük. A felolvasztást követően a gyártó protokollja szerint elkészített munkareagenssel inkubáltuk a sejteket, majd a fluoreszcencia intenzitását FlexStation II 384 spektrofluorométer segítségével detektáltuk.

Apoptotikus folyamatok vizsgálata ORS keratinocitákon

Az apoptózis egyik korai jelének tekintjük a mitokondriális membrán potenciál csökkenését, melynek nyomon követését kísérleteink során MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit segítségével végeztünk a gyártó utasításainak megfelelően. Az ORS keratinocitákat 10 000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük fluoreszcencia detektálásához alkalmas 96 lyukú lemezekre melyekre előzőleg osztódásában gátolt FB-okat (900 sejt/lyuk) szélesztettünk. A fluoreszcencia detektálása a 630 nm-en történő gerjesztést követően 670 nm-en történt FlexStation II 384 készülék segítségével.

Nekrotikus folyamatok nyomon követése ORS keratinocitákon

A nekrozissal jellemezhető sejthalál detektálására SYTOX Green nukleinsav jelölő festéket alkalmaztunk. A festék sajátosságai közé tartozik, hogy méreténél fogva nem képes átjutni az ép sejtmembránon, ezzel ellentétben a dezintegrált membránnal rendelkező sejtek DNS-éhez kötődni képes, jelentős fluoreszcencia intenzitásbeli növekedést eredményezvén. Az ORS keratinociták szélesztése a fentiekkel azonosan történt, a fluoreszcencia meghatározása FlexStation II 384 készüléket alkalmaztunk 490 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhossz mellett.

Génexpressziós változások vizsgálata

Kísérleteink során a különböző gének expressziós változásait reverz transzkripciót követő kvantitatív, „valós idejű” polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) vizsgáltuk. Az ORS keratinocitákból TRIzol reagens segítségével izolált

teljes RNS 1 µg-jából kiindulva High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et alkalmazva cDNS-t állítottunk elő. A lehetséges genomi szennyezések elkerülése végett a reverz transzkripciót megelőzően minden esetben DNase I kezelést alkalmaztunk, melyet a gyártó utasításainak megfelelően hajtottunk végre. Az így előállított cDNS-ből az RT-qPCR kísérleteinket ABI Prism 7000, valamint Stratagene MxPro3005P QPCR System készülékek segítségével végeztük az 5'-nukleáz módszer felhasználásával, specifikus TaqMan primerek és próbák felhasználásával.

A citokinfelszabadulás vizsgálata (ELISA)

Az ORS keratinociták által, különböző kezelések hatására termelt és felszabadult citokinek meghatározásához a sejtek felülúszóját összegyűjtöttük, majd a felszabadult transzformáló növekedési faktor-β2 (TGF-β2) és inzulin-szerű növekedési faktor-1 (IGF-1) mennyiségét specifikus, a gyártó által antitesttel előre bevont ELISA kitéket felhasználva határoztuk meg, követve a gyártó protokollját.

Immunfluoreszcens jelölések

Az adenzin receptorok kimutatása

Kísérleteink során mind a négy ADOR altípus kimutatását elvégeztük HF-kön és ORS keratinocitákon egyaránt indirekt fluoreszcens immunjelölés segítségével. Fixálást követően a metszetekt az adott ADOR altípusra specifikus elsődleges antitesttel inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Ezt követően Alexa Fluor 488 fluoreszcens festékkel konjugált kecskében termeltetett nyúl ellenes másodlagos antitesttel inkubáltuk a mintákat, a sejtmagok jelölése 4',-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) segítségével történt. Végül a metszeteink fedése Fluoromount-G médiummal történt. Az antitestek hígítására minden esetben speciális oldatot (DCS) alkalmaztunk.

Ki67 proliferációs marker kimutatása ORS keratinocitákon

A sejteket fedőlemezre szélesztettük, majd a megfelelő konfluencia elérését követően elvégeztük a szükséges kezeléseket. Acetonos fixálást követően a fedőlemezeket egérben termeltetett Ki67 ellenes elsődleges antitesttel inkubáltuk egy éjszakán keresztül, majd rodaminnal konjugált másodlagos antitestet alkalmaztunk. A sejtmagok festésére DAPI-t használtunk végül a fedés Fluoromont G-vel történt.

Proliferáló és apoptotizáló sejtek együttes jelölése HF-kön

Annak érdekében, hogy a HF-kön végzett kezeléseink életképességre gyakorolt hatását elemezni tudjuk Ki67/TUNEL kofestést alkalmaztunk. A Ki67 nukleáris antigén a sejtproliferáció egyik jellegzetes markere míg a TUNEL assay az apoptotizáló sejtek azonosítására szolgáló eljárás, melynek alapja a fragmentálódott DNS szálak szabad 3'-OH végeinek enzimatiszikus jelölése módosított nukleotidokkal. Kriosztát segítségével készített HF metszeteink fixálását követően terminális deoxinukleotid transzferáz (TdT) enzim, valamint a digoxigeninnel jelölt nukleotidokat tartalmazó reakció puffer elegyével inkubáltuk metszeteinket 60 percen keresztül, majd a reakció leállítását követően Ki67 monoklonális egérben termeltetett elsődleges antitest jelölést alkalmaztunk egy éjszakán keresztül. Ezt követően a fluoreszcensen jelölt digoxigenin antitesttel inkubáltuk metszeteinket azon DNS fragmentumok jelölésére, melyek 3' hidroxil csoportjához a TdT enzim hozzákapcsolta a digoxigenin jelölt nukleotidokat. A Ki67 antitesttel jelölt sejtek láthatóvá tételének érdekében Alexa Fluor 568 kecskében termeltetett másodlagos antitestet alkalmaztunk. A sejtmagok jelölésére DAPI-t használtunk, majd a kész metszeteinket Fluoromont G-vel fedtük le.

TGF- β 2 és IGF-1 immunfluoreszcencia kimutatása HF-kön

A hajciklus regulátor markerek kimutatására tiramid szubsztrát amplifikációs (TSA) módszert alkalmaztunk. A fagyasztott natív metszeteket fixáltuk, majd az

endogén peroxidázok gátlása érdekében 3%-os H₂O₂ -ot alkalmaztunk 15 percig. Az aspecifikus kötőhelyek blokkolása 2%-os kecske (TGF-β2) illetve nyúl (IGF-1) szérummal történt. A metszetek egy éjszakán keresztül inkubálódtak a megfelelő elsődleges antitesttel: poliklonális nyúlban termeltetett TGF-β2 elleni immunoglobulin-G (IgG) vagy poliklonális kecskében termeltetett IGF-1 ellenes IgG. Az inkubációt követően a másodlagos, biotin jelölt, kecskében termeltetett nyúl-ellenes IgG-al (TGF-β2 kimutatás), vagy nyúlban termeltetett kecske-ellenes IgG-al (IGF-1 kimutatás). Ezt követően tiramid jelölést alkalmaztunk az alábbiak szerint: metszeteinket tormaperoxidáz-konjugált sztreptavidinnal jelöltük 30 percen keresztül, majd 5 percen keresztül inkubáltuk a fluoreszceinnel jelölt tiramid reagenssel, TGF-β2 jelölés esetén. Az IGF-1 kimutatása során rodamin jelölt tiramid reagenssel történt az inkubáció. Utolsó lépésként lemezeinket DAPI-val festettük és Fluoromount-G médiummal fedtük.

„DP Stalk” vagy másnéven „DP szár” analízis

Ezen kvantitatív módszer azon a megfigyelésen alapszik, hogy a tenyésztett HF-k DP-jából FB-ok migrálnak a kötőszövetes burok (CTS) proximális vége felé a katagén fázisban. Kísérleteink során a HF-eket fagyasztva metszést követően DAPI-val festettük és a DP szár területére illesztett azonos méretű négyzet által meghatározott referencia tartományon belül megszámláltuk a sejtmagokat.

Hisztomorfometriai analízis

A HF-eket fagyasztva metszést, majd hematoxilin-eozin (HE) festést követően az irodalomban jól körülhatárolt, adott hajciklus fázisra jellemző morfológiai jegyeik alapján csoportokba soroltuk, majd a csoportok százalékos összetételét ábrázoltuk.

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

Ezen értékelési módszer szerint a HF-khöz egy adott értéket rendelünk, a hisztomorfometriai jegyeik alapján besorolt hajciklus fázisának megfelelően. Az

így kapott értékeket összeadjuk, majd az egy kezelési csoporton belüli értékek összegét elosztjuk az elemszámmal.

Statisztikai analízis

A kapott eredményeket a kontroll csoport százalékában adtuk meg. Hibasávkban az eredmények standard hibájának átlagát (SEM) tüntettük fel, szintén a kontroll százalékában kifejezve. Az átlagok különbségét összetartozó minták esetén páros t – próbával, kettőnél több csoport esetén pedig egyszempontos variancia analízissel (ANOVA), valamint Bonferoni és Dunett *post hoc* tesztekkel vizsgáltuk. A különböző kezelési csoportokban a HF-k eloszlását páronként vetettük össze Fisher-féle egzakt teszt alkalmazásával SPSS 20.0 statisztikai szoftver segítségével. Szignifikánsnak a 0,05 szignifikancia szint alatti különbségeket fogadtuk el ($p < 0,05$).

EREDMÉNYEK

1. Az adenzin hajciklusra gyakorolt hatásainak áttekintése

Az adenzin fokozza a HF-k növekedését, a mátrix keratinociták (MK) proliferációját és anagén fázist hosszabító hatással bír

Kísérleteink során a HF-eket 50 és 100 μM adenzinnal kezeltük, majd hossznövekedésüket nyomon követtük. Vizsgálataink szerint a kontroll csoporthoz képest mindkét koncentrációban alkalmazva az adenzin kezelés képes volt szignifikánsan fokozni a HF-k elongációját.

A látottak háttérében álló folyamatok alaposabb megismerése érdekében a HF-eket az elongációs vizsgálatok befejeztével, lefagyasztottuk, majd metszeteket készítettünk immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzéséhez. Vizsgálataink szerint az adenzin kezelés szignifikánsan és dózisfüggő módon fokozta a Ki67 pozitív, proliferáló sejtek számát a HF-k bulbusában.

Következő lépésként elvégeztük a HF-kből készült metszetek HE festést követő hisztomorfometriai analízisét. A fentiekkel jó összhangban azt tapasztaltuk, hogy a 100 μM koncentrációban alkalmazott adenzin kezelés hatására a HF-k nagyobb arányban maradtak anagén fázisban, azaz gátlódott a katagén fázisba történő átmenetük. Ezen megfigyelést követően a továbbiakban az adenzin katagén fázist gátló és egyúttal proliferációt elősegítő hatását vizsgáltuk a jól ismert katagén-induktor TGF- β 2 jelenlétében.

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

Kísérleteink során elsőként a follikulusok hossznövekedését vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az önmagában alkalmazott TGF- β 2 szignifikánsan csökkentette a HF-k elongációját, 100 μM koncentrációjú adenzin szimultán alkalmazása azonban képes volt kivédeni ezt a gátló hatást. Annak érdekében, hogy meggyőződjünk az adenzin hatásának specifikusságáról, a kísérletet

elvégeztük az általános ADOR antagonistá CGS15943 jelenlétében is, és azt tapasztaltuk, hogy ebben az esetben az adenzin hatástalannak bizonyult.

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

A következőkben hisztomorfometriai hajciklus analízis elvégzésével vizsgáltuk tovább az adenzin hatásait. Önmagában alkalmazva a TGF- β 2 jelentős katagén tranzíciót váltott ki. Az adenzin képes volt szignifikáns mértékben csökkenteni a TGF- β 2 hatását mind a közép- mind pedig a késői katagén fázisban lévő HF-k esetén, mindemellett fokozta az anagén és korai katagén fázisú folliculusok arányát. A CGS15943 itt is felfüggesztette az adenzin hatását, hiszen a HF-k százalékos eloszlása szinte teljes mértékben megegyezik a kizárólag TGF- β 2-vel kezelt csoport esetén látottakkal. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy az adenzin, valamint tágabb értelemben az adenzin receptorokon keresztüli szignalizáció, a katagén fázis kialakulásának meggátolásával és az anagén hajciklus fázis fenntartásával szerepet játszik a szőrnövekedés szabályozásában.

Eredményeink további megerősítése végett elvégeztük a HF-k úgynevezett „DP stalk” („DP szár”) analízisét, melynek eredménye az eddigiekkel

összhangban azt mutatta, hogy adenzin kezelés hatékonyan (és ADOR függő módon) ellensúlyozta a TGF- β 2 katagén indukciós hatását.

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

A háttérben zajló szignalizációs folyamatok alaposabb felderítése érdekében megvizsgáltuk az egyes ADOR altípusok kifejeződését humán HF-kön. Az anagén follikulusokból teljes mRNS izolálását követő reverz transzkripció során három különböző donorból állítottunk elő cDNS-t. Ezt követően Q-PCR technika alkalmazásával kimutattuk, hogy mind a négy ADOR altípus (A_1 , A_{2A} , A_{2B} és A_3) kifejeződik HF-kön, és közülük (legalábbis mRNS szinten) az A_{2B} a domináns izoforma.

Annak érdekében, hogy az ADOR-ok protein szintű jelenlétéről és lokalizációjáról pontosabb információt szerezzünk, humán anagén HF-kből fagyasztva metszés során nyert metszeteinken immunhisztokémiai kimutatást végeztünk. Megállapítottuk, hogy – bár a különböző receptor altípusok eltérő expressziós mintázatot mutatnak - mind a négy receptor kifejeződik fehérje szinten humán HF-kön.

Mivel az ORS keratinociták rétege minden adenzin receptor izotípus kifejeződésének tekintetében pozitivitást mutatott, és ezen sejtek fontos szerepet töltenek be a hajciklus szabályozásában, vizsgálatainkat HF-kből izolált primer ORS keratinocita tenyészeteken folytattuk tovább.

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

Az adenzin lehetséges hatásmechanizmusának vizsgálata

Miután eddigi kísérleteink meggyőzően demonstrálták az adenzin hajciklusra gyakorolt hatását fontosnak tartottuk, hogy betekintést nyerhessünk a

háttérben meghúzódó hatásmechanizmusba. Az ORS sejteket adenzinnal kezeltük CGS15943-mal (ADOR pán-antagonista) vagy MRS1754-gyel (szelektív A_{2B} antagonista) kombináltan. Ezt követően RT-qPCR technika alkalmazásával vizsgáltuk egyes negatív, illetve pozitív hajciklus regulátor génekre gyakorolt hatását a fent említett kezeléseknek. Eredményeink szerint az adenzin csökkentette a katagén induktor TGF- β 2 és epidermális növekedési faktor (EGF) expresszióját míg az anagén fázist fenntartó és pigmentációt fokozó őssejt faktor (SCF), illetve inzulin-szerű növekedési faktor-1 receptor (IGF1R) expressziója növekedést mutatott. Ezen eredmények jó összhangban vannak a korábban tapasztaltakkal, és bepillantást engednek azon komplex folyamatokba, amelyek az adenzin-kezelés hajciklusra gyakorolt hatásainak kialakulásához vezetnek. Fontos kiemelni, hogy az adenzinnal egyidejűleg alkalmazott pán-antagonista CGS15943 képes volt ezt kivédeni, tehát az adenzin által kiváltott expressziós változások adenzinreceptor-függő módon alakultak ki. Tekintettel arra, hogy az adenzin receptorok közül az A_{2B} mutatta a legmagasabb mRNS-szintű expressziót, kísérleteinket a szelektív A_{2B} receptor antagonista MRS1754 jelenlétében is elvégeztük, és azt tapasztaltuk, hogy az expressziós változások az előzőleg bemutatott, CGS15943 jelenlétében tapasztalt változásokat követik, mely nagymértékben valószínűsíti, hogy az adenzin esetünkben A_{2B} receptoron keresztül fejti ki hatását.

2. A koffein hajciklusra gyakorolt hatásainak vizsgálata

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

Eredményeink szerint a férfi donorokból származó HF-k esetében a koffein TST-al együttesen alkalmazva képes volt felfüggeszteni a TST HF-kre kifejtett szőrnövekedést gátló és MK-kra gyakorolt anti-proliferatív hatását. Tekintettel arra, hogy a szőrnövekedés zavaraival járó problémák nemcsak a férfiakat érintik, kísérleteinket női donorok bevonásával egészítettük ki. Vizsgálataink szerint a TST kezelés önmagában alkalmazva csökkentette a HF-k elongációját, viszont a különböző koncentrációjú koffeinnel történő kezelés ezt szignifikáns mértékben képes volt ellensúlyozni.

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

Kísérleteink folytatásaként mélyebb betekintést szeretnénk volna nyerni a koffein HF-kre gyakorolt celluláris hatásaiba. Első lépésként azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a MK-k proliferációját. Ennek során HF szervkultúrákon alkalmaztunk TST kezelést önmagában, illetve koffeinnel kombináltan, majd mintáinkat Ki67-TUNEL kombinált festéssel jelöltük. Megállapítottuk, hogy 0,001%-os koncentrációban alkalmazva a koffein képes volt szignifikáns mértékben növelni a Ki67 pozitív sejtek számát, mind a kontroll, mind pedig a TST-nal kezelt csoportokhoz képest férfi donorok esetén. Női donorok esetén azt tapasztaltuk, hogy a TST kezelésre sokkal érzékenyebben reagáltak, mivel az nagymértékben csökkentette a proliferáló MK-k számát. Ezen hatás részben ellensúlyozhatónak bizonyult 0,0005%-ban alkalmazva a koffeint nagyjából 30%-ra növelte a Ki67 pozitivitást mutató sejtek arányát, ami már nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoport értékétől.

A koffein fokozza a tenyésztett ORS keratinociták proliferációját

Miután megállapítottuk, hogy a koffein HF szervkultúrában alkalmazva fokozza a MK-k proliferációját, szeretnénk volna behatóbban is megvizsgálni a celluláris hatásait, ezért férfi donorokból származó primer ORS keratinocita tenyészetet alkalmazva folytattuk vizsgálatainkat. Az ORS keratinociták proliferációs vizsgálatánál fluoreszcens CyQUANT-assay-t alkalmaztunk. Eredményeink szerint a koffein szignifikánsan fokozta a sejtek proliferációját. Ez a hatás a 24 órás vizsgálatoknál bizonyult a legkifejezettebbnek, ahol a kontroll csoporthoz képest 160%-os növekményt láttunk.

Proliferációs vizsgálataink eredményeinek független megerősítésére Ki67-specifikus immuncitokémiai festést alkalmaztunk. Az adatok kvantitatív analízisének elvégzését követően megállapítottuk, hogy a 24 órás koffein kezelés dóziszfüggő módon, szignifikánsan növelte a Ki67 immunpozitivitást mutató ORS keratinociták arányát.

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

Ismert, hogy katagén indukáló hatásának kialakulása során a TGF- β 2 a HF-k több sejtpopulációjában (ideértve az ORS keratinocitákat is) sejthalálfolyamatokat indít be. Ezen tulajdonságára építettük következő kísérleteinket, melyekben arra a kérdésre szeretnénk volna választ kapni, hogy a koffein, a már megismert proliferációt indukáló hatása mellett vajon képes-e ellensúlyozni a sejthalálfolyamatok beindulását/lezajlását az ORS keratinocitákban. A kombinált DiIC₁(5)-SYTOX Green jelölés tanúsága szerint a koffeint önmagában alkalmazva nem tapasztaltunk jelentős eltérést, míg a TGF- β 2 jelentősen csökkentette a mitokondriális membránpotenciállal korreláló DiIC₁(5), és fokozta a sejtmembrán dezintegrációt jelző SYTOX Green jelét, azaz korai sejthalálfolyamatokat indított el. Koffein kezelést alkalmazva azonban ezek a változások kivédhetőnek bizonyultak. Kísérleteinket a TGF- β 2 mellett az ismert katagén-induktor endokannabinoid anandamiddal (AEA) is megismételtük és a

fentiekkel jó összhangban lévő eredményeket kaptunk. A koffein itt is dóziszfüggő módon protektív hatással bírt, csakúgy, mint ahogyan az, az alkalmazott pozitív kontrollok (IGF-1 és keratinocita növekedési faktor [KGF]) esetében is megfigyelhető.

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

A koffein celluláris hatásainak vizsgálata után a hajciklusra gyakorolt hatásait követtük nyomon. A HF-ök TST és koffein kezelését követően HE festést és hisztomorfometriai analízist végeztünk. Megállapítottuk, hogy a TST férfiaknál 20%-kal csökkentette az anagén VI fázisban lévő HF-k arányát a kontroll csoporthoz képest. A koffeinnel történő együttes alkalmazás során ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy az anagén fázisban lévő HF-k aránya feltűnő növekményt mutatott, és egészen 70%-ig emelkedett. Hasonló, bár kevésbé kifejezett változásokat tapasztaltunk női donorok esetében is, azaz a TST katagént indukáló hatását a koffein különböző koncentrációi képesek voltak részlegesen visszafordítani. Ezen eredményeket férfi donorok esetében sikerült egyértelműen alátámasztanunk a hajciklus pontszám (HCP) vizsgálatával: a TST kezelés fokozta a HCP értékét, míg (férfi donorok esetén) a koffeinnel egyidejű alkalmazása az érték normalizálódását eredményezte, ellenben a női donorok esetén a koffein hatástalannak bizonyult.

A koffeinkezelés differenciálisan befolyásolja a hajciklus-modulátor TGF- β 2 és IGF-1 intrafollikuláris kifejeződését férfi és női donoroktól származó HF-k esetén

Miután kimutattuk, hogy a koffein férfi donorok HF-i esetén képes a TST katagén fázist indukáló hatását felfüggeszteni, kísérleteink középpontjába a hajciklus szabályozásában kiemelkedő fontosságú pro-anagén (IGF-1) és pro-katagén (TGF- β 2) faktorok vizsgálatát állítottuk. Első lépésként a TST-nal és koffeinnel kezelt, majd fagyasztott HF-kből származó metszeteken elvégeztük a

hajciklus regulátorok immunhisztokémiai kimutatását. A TGF- β 2 expressziója az ORS réteg mellett a belső gyökérhüvely keratinociták (IRS) Henle-rétegének sejtjeiben is megfigyelhető volt. Amint az várható volt, férfi donoroktól származó HF-k esetén TST kezelés hatására a katagén fázist indukáló TGF- β 2 kifejeződése szignifikáns mértékben fokozódott, míg eddigi eredményeinkkel teljes összhangban a koffeinnel történő együttes kezelés hatására, a TGF- β 2 intrafollikuláris protein expressziója normalizálódott, tehát a koffein képes volt kivédeni a TST TGF- β 2 kifejeződést indukáló hatását. Női donorokból származó HF-kön elvégezve a kísérletet némileg eltérő eredményre jutottunk, hiszen a TST kezelés nem fokozta a TGF- β 2 kifejeződését, viszont a koffeinnel történő együttes kezelés a kontroll csoporthoz képest is jelentősen csökkentette az expressziót.

A következő lépésben az IGF-1 expressziójának változását követtük nyomon a fentebb leírt kísérletes rendszerben. Eredményeink szerint az IGF-1 fehérje kifejeződése mind az ORS, mind pedig az IRS rétegben megfigyelhető volt. Férfi donoroknál a TST kezelés hatására csökkenő intrafollikuláris kifejeződést nemcsak ellensúlyozta a koffein alkalmazása, de szignifikáns növekedést látunk a kontroll csoporthoz képest is. Női donorok esetén ezzel szemben a TST kezelés hatásai jelentős donorfüggést mutattak, viszont a koffein önmagában alkalmazva szignifikáns növekedést eredményezett az IGF-1 expressziós szintjében.

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

A TGF- β 2 és IGF-1 sejtszintű kifejeződésének vizsgálatára ismét a primer ORS keratinocita kultúrákat használtunk. A specifikus mRNS szakaszok kifejeződésének vizsgálatára RT-qPCR-t, míg a felszabaduló molekulák fehérje szintű vizsgálatára ELISA módszert alkalmaztunk. A sejtek felülúszójában a TGF- β 2 vizsgálata során megállapítottuk, hogy a pozitív kontrollként alkalmazott pro-katagén isotretinoin szignifikánsan fokozta a detektálható mennyiségét míg a

koffein hatására 120 órás kezelést követően szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a TGF- β 2 felszabadulásában.

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

MEGBESZÉLÉS

A haj- és szőrnövekedés rendellenességei emberek millióinak életét nehezítik meg világszerte. A populáció jelentős százalékanak hajvesztéséért az androgen alopecia (AGA) tehető felelőssé férfiakat és nőket érintve egyaránt. A folyamat molekuláris hátterében a patogenetikailag predisponált HF-k dihidrotesztoszteronnal (DHT) szembeni fokozott érzékenysége áll. Terápiáját illetően a legelterjedtebben alkalmazott 5- α -reduktáz enzim (5-AR) gátló Finasterid vagy Dutaszterid és a topikálisan alkalmazható Minoxidil mellett alacsony frekvenciájú lézeres beavatkozást, mezoterápiát és hajtranszplantációt is alkalmaznak több-kevesebb sikerrel. Az új farmakológiai terápia szerek fejlesztése lassú ütemben halad. A csak részleteiben ismert patofiziológia, az ebből adódóan még napjainkban is kiforratlan terápia, valamint az egyre élesebben megfogalmazódó társadalmi igényeknek megfelelően világszerte számos kutatócsoport tesz erőfeszítéseket a szőrnövekedés biológiájának jobb megismerésére. Ezen indíttatásból kísérleteink első szakaszában az adenzin, második szakaszában pedig a koffein HF-re és ORS keratinocytyákra gyakorolt közvetlen és ezáltal a hajciklus moduláló közvetett hatását vizsgáltuk.

Az adenzin, mint potenciális hajciklus szabályozó molekula

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

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

Irodalmi adatok alapján egerek bajuszából nyert HF szervkultúrákon végzett kísérletek szerint az adenzin anagén fázist fenntartó szereppel bír, valamint fokozza az intrafollikuláris sejtek cisztein felvételét, mely a proliferáló sejtek egyik jellegzetes markere. Eddigi eredményeink alapján az adenzin hatása a humán és az egér HF-kön alapvetően hasonlóknak bizonyult.

A hajciklus szabályozásában részt vevő molekulák és receptoraik széles körű dokumentációnak örvendenek az irodalomban a HF számos mezenchimális és

epiteliális kompartmentjén, kiterjedt parakrin szabályozó rendszert lefedvén a hajciklus regulálása szempontjából. A parakrin szabályozó körök modulációja effektív terápiás megoldásokkal kecsegtethet a hajnövekedés problémáit illetően, ezért kísérleteink következő lépéseként azt vizsgáltuk, hogy az adenzin kezelés hogyan befolyásolja a potenciális, hajciklust szabályozni képes molekulák kifejeződését ORS keratinocitákon.

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

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

Következő lépésként ORS keratinocita sejt kultúrákon végeztünk adenzin kezelést és eredményeink szerint az adenzin fokozta mind az anagén fázis inicializálásában szerepet játszó IGF-1R, mind pedig az anagén fázishoz kapcsolódó pigmentációért felelős SCF kifejeződését. Emellett csökkentette a jól ismert katagén-induktor TGF- β 2 és EGF kifejeződését. Mindezen eredmények azt sugallják, hogy az adenzin anagén fázist- és hajnövekedést támogató hatásainak

mediálásában az ORS keratinocitáknak jelentős szerepe van a HF egyes sejtcsoportjainak mezenchimális-epiteliális parakrin kommunikációja révén.

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

A koffein, mint potenciális hajciklus szabályozó molekula

A koffein hajnövekedésre gyakorolt hatása a korábban társszerzőink munkássága nyomán, irodalmi adatok alapján ismeretes: a koffein az AGA-ban fokozott TST szint által telogén fázisban „megragadt” HF-k, újbóli anagén fázisba lépésének indukálásában játszik szerepet. Emellett egyre növekszik azon klinikai tanulmányok száma, melyek a koffein önmagában, vagy más szerekkel kombinációban történő alkalmazásának hatékonyságát írják le az AGA-ban megjelenő hajvesztéssel szemben.

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

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

A mögöttes intarfollikuláris folyamatok alaposabb megismerése érdekében immunfluoreszcens jelöléseket végeztünk és azt találtuk, hogy a koffein kezelés

képes volt szignifikánsan fokozni a proliferáló MK-ák számát, ellensúlyozva ezzel a TST hatását mind női, mind pedig férfi donorok esetén. Hisztomorfometriai analízist követően megállapítottuk, hogy – a MK-ák proliferációját fokozó hatása mellett – a koffein képes kivédeni a TST katagén fázist indukáló hatását, hiszen a koffeinnel együttesen alkalmazott TST kezelés esetén az anagén hajciklus fázisban lévő HF-k aránya nem mutatott csökkenést a kontroll csoporthoz képest.

Kísérleteinket primer ORS keratinocita sejt kultúra bevonásával kiterjesztve, különböző metodikai módszerek révén megmutattuk, hogy a koffein kezelés hatására a sejtek fokozott proliferációval, valamint csökkent apoptotikus rátával válaszoltak, még a katagén induktor TGF- β 2 és AEA jelenlétében is. Ezen eredményeink összhangban állnak a korábbi, egereken végzett kísérletek eredményeivel, miszerint a vaszkuláris sima izom sejteken a koffein fokozta a sejtek proliferációját, csökkentette az apoptózist és a reaktív oxigén gyökök felszabadulását. Emellett képes volt felfüggeszteni a TST proliferációt gátló hatását humán epidermális keratinocitákon, valamint képes helyreállítani a TST által károsított bőr barrier funkciókat humán vizsgálatokon alapuló *in vivo* tanulmányok szerint.

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

Vizsgálataink során mikrodisszektált HF szervkultúrán immunfluoreszcens jelölést alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy a koffein hatékonyan ellensúlyozta férfiaknál a TST által indukált TGF- β 2 protein szintű kifejeződésének fokozódását, míg nőknél, habár a TST általi indukáló hatás elmaradt,

szignifikánsan csökkentette a TGF- β 2 kifejeződését. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a TST mindkét nemben katagén fázist indukáló hatással bírt, a TGF- β 2 kifejeződésének mértékét önmagában azonban csak férfiaknál fokozta, nőknél ez a hatás elmaradt. Mindezek mellett a koffein fokozta az anagén fázis kialakulásában szerepet játszó IGF-1 fehérje szintű kifejeződését, férfiaknál ellensúlyozván ezzel a TST IGF-1 expresszióját csökkentő hatását, míg női donorokban önmagában alkalmazva a koffein szignifikáns IGF-1 emelkedést eredményezett.

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

Összegezve eredményeinket elmondhatjuk, hogy az ORS keratinocitákon és mikrodisszektált HF szervkultúrákon végzett in vitro kísérleteink a koffein komplex szerepét bizonyítják a hajbiológiában. Mindezek felvetik a koffein potenciális terápiás szerként történő alkalmazását a haj- és szőrnövekedési rendellenességek kezelésében. Kísérleteink rávilágítanak a koffein hajnövekedést fokozó hatására a nemek közötti különbségek ellenére is és ez az első tanulmány, ahol női donorokból származó mikrodisszektált HF szervkultúrán végeztünk kísérleteket a koffein hatásaira vonatkozóan. A nemek közötti eltérő koffein-szenzitivitás háttérben álló folyamatok okának felderítése azonban egyelőre még nem tisztázott.

Feltételezett mechanizmus, avagy ahol a szálak összeérnek

A koffein a legtöbb biológiai hatását az adenozinerg tónus felfüggesztésével éri el az ADOR-ok gátlása révén. Felmerül tehát a kérdés: két, szerkezetükben nagymértékű analógiát mutató molekula, melyek egymással ellentétes

molekuláris hatásokat válthatnak ki, hogyan befolyásolhatják mégis ugyanazon irányba a hajciklust? A kérdés megválaszolásához természetesen a mögöttes jelátviteli folyamatokat mélyebbrehatóan célzó kísérletes vizsgálatok szükségesek, így jelen feltevésünk hangsúlyozottan hipotetikus jellegű marad. Az adenosin A_{2B} receptoron keresztüli jelátviteli útvonalának potenciális állomása lehet az adenilát cikláz (AC) stimulációja, mely fokozott ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) szintet eredményez. A koffein ezzel szemben (az ADOR-ok gátlása mellett) a cAMP lebontását is gátolhatja a foszfodiészteráz (PDE) gátlásán keresztül, vagyis (az adenosinhoz hasonlóan) fokozott cAMP szintet is eredményezhet.

A szőrnövekedésben tapasztalható nemi különbségekben szerepet játszhat a nemi hormonok eltérő hatása az intrafollikuláris másodlagos hírvivők szintjére. Irodalmi adatok szerint az ösztroon fokozza, a DHT pedig gátolja az AC működést – így előbbi növeli, míg utóbbi csökkenti a cAMP szintjét. Az AGA-ban jellemző emelkedett DHT szint és az erre genetikailag fokozott érzékenységgel reagáló HF-k a terminális haj fokozott vellus hajjává történő átalakulását, a későbbiek során pedig részleges vagy teljes kopaszodás kialakulását eredményezik, melynek hátterében felmerülhet a DHT AC működést gátló és ezáltal cAMP szintet csökkentő szerepe. Koffeinnel végzett kísérleteink során a női donorok HF-i fokozott érzékenységet mutattak az alkaloid iránt. Elképzelhető, hogy ebben az ösztrogének hatására fokozott AC aktivitás miatt nagyobb cAMP szint is szerepet játszik. Így a koffein PDE-t gátló hatása révén jelentősebb mértékben emelheti a cAMP szintet, mint a férfiak esetén, ahol az AC aktivitása kisebb.

Az emelkedett cAMP szint a különböző parakrin jelátviteli útvonalak működésének mediálása által szerepet játszhat az anagén fázis kialakítását stimuláló IGF-1 és SCF fokozott, valamint a katagén fázist indukáló TGF- β 2 és EGF csökkent mértékű kifejeződésében. A bemutatott eredményeink szerint ezen hajciklus szabályozó molekulák kifejeződésének mértéke jelentős változást mutatott az adenosin és koffein kezelése hatására. Feltételezhető, hogy az

emelkedett cAMP szint mindemellett fokozza a HF környezetében a mikrocirkulációt és fokozott tápanyag és oxigén ellátást biztosít, mely nélkülözhetetlen a HF növekedése és fejlődése szempontjából. Habár ezen gondolatok teoretikus jellegűek a vélt hatásmechanizmust illetően, az irodalmi adatokkal jó összhangban elmondhatjuk, hogy egy mellékhatások nélküli, azonban rendkívül hatékonynak ígérkező koffein és/vagy adenzin alapú terápia alkalmazása megoldást nyújthat az AGA-ban szenvedőknek.

ÖSSZEFOGLALÁS

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

Humán mikrodisszekált HF szervkultúrán végzett kísérleteink eredményei alapján megállapítottuk, hogy az adenzin jelentős mértékben fokozza a HF-k növekedését, a MK-ák proliferációját, és mindezek mellett anagén fázist megtartó hatással bír. Igazoltuk továbbá, hogy az adenzin képes kivédeni a TGF- β 2 katagén fázist-indukáló hatását. A lehetséges jelátviteli mechanizmusok után kutatva kimutattuk, hogy mind a négy ADOR altípus kifejeződik mind HF-kön, mind pedig izolált ORS keratinocitákon. ORS keratinocitákon végzett génextpressziós vizsgálataink eredménye szerint az adenzin fokozza az anagén fázist indukáló faktorok (IGF1R, SCF) és csökkenti a katagén-induktor TGF-B2 és EGF kifejeződését. A látott hatások kifejlődéséért az ADOR mediálta útvonalak – legfőképpen az A_{2B} –tehetőek felelőssé.

Koffeinnel végzett kísérleteink során kimutattuk – női és férfi donoroknál egyaránt –, hogy a TST katagén indukáló hatását felfüggesztvén a koffein fokozza a HF-k növekedését, a proliferáló MK-ák számát, valamint anagén fázist fenntartó szereppel bír. ORS keratinocitákon végzett kísérleteink alátámasztották a koffein proliferációt fokozó és apotózist csökkentő hatását. Kimutattuk, hogy a koffein a hajnövekedés szabályozásában szerepet játszó katagén-induktor TGF-B2 szintjét csökkentette, míg az anagén fázis kialakításában szerepet játszó IGF-1 kifejeződését fokozta.

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

FÜGGELÉK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További közlemények

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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 54,317

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

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

Debrecen, 2019.09.30.

