

Poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) szerepe a bőr ultraibolya (UV) fény indukálta károsodásában

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Csete Béla



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvosi Kar

Pécs, 2009.

**Poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) szerepe a bőr
ultribolya (UV) fény indukálta károsodásában**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Csete Béla

Doktori iskola vezető: Dr. Sümegi Balázs, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Farkas Beatrix, egyetemi tanár

Dr. Battyáni Zita, egyetemi docens

Pécsi Tudományegyetem

Pécs, 2009.

1. Bevezetés

Az életkor meghosszabbodása, valamint a természetes (napfény) és a mesterséges (pl. szolárium) UV-expozíció növekedése által kiváltott fénykárosodás világszerte a jó- és rosszindulatú bőrtumorok előfordulási gyakoriságának progresszív emelkedéséhez vezetett. A malignus bőrtumorok incidenciája az utóbbi 30 évben hazánkban is drámaian emelkedett, s ez a tendencia jelenleg is folytatódik. Míg az epidermális eredetű laphám carcinoma és a basocelluláris carcinoma patogenezisében a krónikus (élet során összeadódó) napfény expozíciónak, addig malignus melanoma esetében inkább az ismétlődő, rövid expozíciós idejű, intenzív napégéseknek lehet szerepe.

Fenti tényezők miatt a fényvédő készítmények iránti követelmények megnöttek. A teljes spektrumú védelem (UVA, UVB) alkalmazása feltétlenül indokolttá vált. A jelenleg meglévő, és a fényvédők használatát sok esetben akadályozó mellékhatások (fototoxikus, fotoallergiás reakció, színező hatás, nem megfelelő konzisztencia, stabilitási problémák) kiküszöbölése fontos feladat. A kutatás az eddigiektől merőben eltérő, új típusú fényvédő készítmények (pl.: a DNS-repair kapacitást támogató T4V (T4N5) liposzómális endonukleáz, az IL-12, PARP-gátlók) előállítására irányába folyik.

A bonyolult védelmi funkció érvényesüléséhez az alapvető celluláris folyamatokat (proliferáció, differenciálódás, túlélés, apoptózis) szabályozó, számos jelátviteli rendszer korrekt működése szükséges. Jelen munkában a nagyszámú jelátviteli folyamatból, melyek az UV-fény indukálta bőrelváltozások kialakulásában részt vesznek a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim aktivitás és annak szabályozásával összefüggő mechanizmusokat kívántam vizsgálni.

A PARP szerepet játszik a DNS károsodás indukálta jelátviteli rendszerben. Biológiai szerepe a következő lényeges funkcióban foglalható össze:

- DNS-repair és a genom integritás fenntartása
- különböző fehérjék expressziójának transzkripciós szintű szabályozása
- replikáció és a differenciálódás szabályozása
- fehérjelebontás szignáljaként szolgálhat az oxidatív károsodáson átesett sejtekben

A PARP szerepe oxidatív stresszben jól ismert. Számos patológiás folyamatban jelentős mennyiségű reaktív oxigén speciesz (ROS) képződik, ami lipid-peroxidációt,

proteinoxidációt, és egyesszálú DNS törést indukál. Az egyesláncú DNS törések aktiválják a nukleáris poli(ADP-ribóz) polimerázt amely a NAD^+ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja. A túlzott mértékű PARP aktivitás a celluláris NAD^+ és ATP depléciójához vezet, amelynek következménye a sejtek nekrozisa. A túlzott mértékű PARP enzimaktivitás gátlása csökkentheti az oxidatív stressz indukálta sejthalált.

A ROS okozta energia metabolizmus károsodás és sejthalál részben kivédhető PARP inhibitorokkal, feltehetően azért, mert a PARP-inhibitorok szignifikánsan csökkentik a ROS aktiválta NAD^+ katabolizmus mértékét és csökkentik az ATP felhasználást a NAD^+ reszintéziséhez.

Egy új molekula az (O-(2-hidroxi-3-piperidino-propil) piridin-3-karboxil sav amidoxim monohidroklorid) állt rendelkezésünkre, amelyről Prof. Sümegi Balázs és munkacsoportja ischaemia reperfüziós károsodásban végzett vizsgálatok alapján feltételezte, hogy PARP gátló hatással rendelkezik, és oxidatív stresszben citoprotektív. Mivel a PARP-regulátorok szerepével a bőrelváltozásokkal kapcsolatban nem állt információ rendelkezésünkre, ugyanakkor a bőr számos ponton érintett a PARP által szabályozott mechanizmusokban, első lépésként az új molekula hatásának vizsgálatát a bőrben molekuláris szinten kezdtük.

2. Az értekezés célkitűzései

A munka célja a bőr akut és krónikus UV-fény károsodás kialakulásának megelőzésében szerepet játszó, illetve a már kialakult kóros állapotok helyreállításában részt vevő poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim szerepének és farmakológiai befolyásolhatóságának tanulmányozása volt.

A megvalósításhoz egyszerű, ugyanakkor jól reprodukálható modelleket próbáltunk használni, melyek mind sejtszinten, mind pedig a bőr, mint szerv szintjén biztosítják a fiziológias és patológias történések vizsgálhatóságát, és magukban foglalják a gyakorló klinikus számára az alkalmazás potenciális lehetőségét.

A fentiek alapján tanulmányozni kívántuk:

1. PARP-regulátor/inhibitor általi szabályzást a bőr akut és krónikus UV-irradiáció elleni védelmében
 - A poli-ADP-riboziláció jelentőségét a bőr UV-fény indukálta károsodásában
 - PARP aktivitást *in vitro* és *in vivo*
 - PARP-regulátor/inhibitor antieritematogén, DNS-, és immunoprotektív hatását
2. PARP-regulátor/inhibitor szerepét az UVA- és UVB-fény indukálta karcinogenezis elleni védelemben
3. **A célkitűzések megvalósítását célzó kísérletekben használt modellek és metodikák**

3.1. *PARP-regulátor (BGP-15M) a bőr akut és krónikus UV-fény károsodása elleni védelemben betöltött szerepének in vivo vizsgálata*

A lokálisan alkalmazott PARP-regulátor a bőr akut és krónikus UV-fény károsodása elleni védelemben betöltött szerepét szőrtelen (CRL:hr/hr BR Hr1) egérmodellen, egyszeri napfény expozíció, vagy mesterséges UVB-besugárzás, valamint krónikus UVA- és UVB-irradiáció alkalmazásával vizsgáltuk a BGP-15M krémmel, vagy vivőanyagával előkezelt teszterületeken.

3.2. *UV-sugárzás indukálta DNS-károsodás meghatározása*

A bőr UV-sugárzás indukálta DNS-károsodását az egyesláncú DNS törések meghatározásával, DNS-lánc szétcsavarodásán alapuló, fluoreszcenciás módszerrel végeztük.

A DNS-károsodás mértékét, szövettani metszetekben az apoptotikus keratinociták, a „sunburn” sejtek számának meghatározásával vizsgáltuk és „sunburn” sejt/mm epidermisz formájában fejeztük ki.

3.3. *PARP enzim auto-ADP ribozilációjának vizsgálata*

A poli(ADP-ribóz) polimeráz *in vivo* aktivitását az UV-expozíciónak kitett egerek bőrmintáiban a PARP auto-ADP ribozilációjának kvantitatív meghatározásával (Western-blot analízis) végeztük.

A szövetminták immunhisztokémiai analízisével vizsgáltuk a PARP enzim ADP-ribozilációjának mértékét és lokalizációját.

3.4. *UV-sugárzás indukálta immunszupresszió vizsgálata*

A PARP-regulátor a bőrben észlelhető UV-besugárzás által indukált immunszupresszióra kifejtett hatását az IL-10 és TNF α citokin szintézisének meghatározásával végeztük. Immunhisztokémiai analízissel.

3.5. *Klinikai tünetek vizsgálata*

Az UV-fény indukálta akut és krónikus fénykárosodás klinikai tüneteit vizuálisan és dermatoszkóppal vizsgáltuk.

3.6. *Fotokarcinogenezis vizsgálata*

A bőr krónikus UVA-, ill. UVB-expozíciója által kiváltott fotokarcinogenezist a tumorok jelentkezésének kinetikájával (klinikai vizsgálat), valamint hisztológiai (hematoxilin-eozin festés) és immunhisztokémiai (p53 mutáció kimutatása) analízissel tanulmányoztuk.

3.7. *Bőr kronológiai és UV-fény okozta öregedésének vizsgálata*

A bőr kronológiai és a krónikus UV-fény besugárzás hatására létrejött öregedését hisztológiai vizsgálattal tanulmányoztuk. Rutinszerűen a hematoxin-eozin festést használtuk (epidermális hipertófia, atrófia, stb.). A dermális rostkárosodást Orcein-Giemsza festéssel, a melanin pigmentáció meghatározását a Fontana-Masson féle argentaaffin reakcióval végeztük.

4. **Eredmények és következtetések**

4.1. *A PARP-regulátor BGP-15M DNS-protéktív hatása a bőrben*

Az UV-sugárzás által az egérbőrben indukált akut DNS-károsodás mértékét a képződött egyesláncú DNS-törések mennyiségének vizsgálatával azt találtuk, hogy az intenzív napfény expozíció a szövetmintákban az ép, nem károsodott DNS-arányát 30% alá csökkentette. Ugyanakkor a PARP-regulátor (15% BGP-15M krém) lokális alkalmazása kifejezett védelmet biztosított a napfény UV-tartományának DNS-károsító hatásával szemben.

Az UV-irradiáció által okozott DNS károsodás hisztológiai markereként nyilvántartott epidermális „sunburn” sejtek (apoptotikus keratinociták) kvantitatív meghatározása során, az UV-besugárzott (vivőanyaggal kezelt) bőrben a kontrollhoz képest hetvenötszörösére emelkedett „sunburn” sejtek száma. A „sunburn” sejt képződéssel szemben a PARP-regulátor használata DNS-protéktívnek bizonyult. A PARP-regulátorral előkezelt bőrmintákban az apoptotikus keratinociták száma közel azonos volt a kontroll bőrben észleltekkkel.

Következtetés: A PARP-regulátor lokális alkalmazása DNS-protéktívnek bizonyult. Az intenzív UV-fény expozíció által a bőrben kiváltott nagymértékű DNS-károsodás kivédhető volt.

4.2 *PARP enzimaktivitás in vivo gátlása a bőr lokális BGP-15M kezelésével*

A magas dózisu UV-expozíció nagyfokú DNS-károsodást indukál, amely az egyesláncú DNS-törések képződése által a nukleáris PARP enzim kifejezett aktivációját idézi elő. A túlzott mértékű PARP aktivitás a celluláris NAD⁺ és az ATP depléciójához, a sejt energiakészletének kimerüléséhez vezet, amelynek következménye a nekrozis. Az ismertetett mechanizmus bizonyítékául kísérletünkben a vivőanyaggal előkezelt, napfény expozíciónak kitett bőrmintákban hisztológiai vizsgálattal megfigyelt, kifejezett nekrotikus elváltozások szolgáltak.

Ismert, hogy a PARP gátlása részben megakadályozhatja ill. csökkentheti az oxidatív stressz indukálta sejthalált. Feltételeztük, hogy amennyiben a BGP-15M lokális alkalmazás mellett képes befolyásolni/kivédeni az oxidatív stressz okozta nekrozist, úgy PARP-gátló tulajdonsággal rendelkezik.

Következtetés: A BGP-15M krémmel előkezelt bőrből vett mintákban PARP enzim auto-ADP-ribozilációjának up-regulációját nem észleltük, ami arra utalt, hogy a szer lokális alkalmazása direkt, vagy indirekt módon gátolja az egyébként (vivőanyaggal kezelt mintákban) megfigyelt extrém magas PARP aktivitást.

4.3 *A PARP ADP-ribozilációjának immunhisztokémiai vizsgálata*

A BGP-15M lokális alkalmazása esetén, az immunhisztokémiai reakcióval észlelt, az anti-poli(ADP-ribóz)-specifikus poliklonális antitesttel pozitív nukleáris festődést mutató epidermális sejtek számával jellemzett ADP-riboziláció mértékének csökkenése megfelelt a Western-blot módszerrel végzett kvantitatív mérés során a PARP-enzim auto-ADP-ribozilációjára kapott eredményeknek. A BGP-15M krémmel kezelt szövetmintákban a nukleáris festődés mértéke nem tért el a kontroll bőrben látottaktól.

Következtetés: A BGP-15M dózis függő módon gátolta a PARP enzim aktivitását. A bőrben a szer direkt PARP gátló szerepe érvényesült, amely az UV-expozíció által kiváltott egyesláncú DNS-törések által over-aktivált PARP auto-ADP-ribozilációjának csaknem a normál szintre történő down-regulációjában nyilvánult meg.

4.4. *A PARP-regulátor (BGP-15M) hatása az UV-besugárzás által indukált bőr immunszupresszióra*

Az UV-fény ismert, negatív tulajdonságai között kiemelt jelentőségű a fotokarcinogenezis „előszobája”-ként nyilvántartott fotoimmunszupresszív hatás. A korszerű UV-tartományban fényvédő anyagokkal szemben elvárás, hogy a bőr, mint immunszerv funkciójának fiziológias működését biztosítsák, vagyis megakadályozzák a fotoimmunszupresszió/moduláció kialakulását. Az UVB-besugárzás után észlelhető immunszupresszió és gyulladás az epidermális sejtek által termelt citokinek (pl. IL-10, TNF α , IL-6, IL-1, IL-12, stb) és biológiailag aktív anyagok modulációja (up-,down-regulációja) révén manifesztálódik. Egérbőrben az IL-10 és TNF α citokineket az UVB-fény indukálta immunszupresszió markereként tartják számon. A PARP-regulátor (BGP-15M) fotoimmunprotektív hatásának meghatározását az IL-10 és TNF α citokinek immunhisztokémiai vizsgálatával végeztük. A vivőanyaggal előkezelt, UVB-besugárzott mintákban az epidermális sejtek anti-IL-10 poliklonális antitesttel kifejezett citoplazmatikus festődést mutattak az epidermisz teljes vastagságában. Ugyanakkor a PARP-regulátorral kezelt mintákban szórványosan csak egy-egy sejt festődött. A vivőanyaggal előkezelt, UVB-besugárzott bőrből készült metszeteken anti-TNF α poliklonális antitesttel intenzív citoplazmatikus és membránfestődést észleltünk. Az ödémásan kiszélesedett hámban részben a bazális rétegben perinukleárisan intenzív, a felső sejtsorokban pedig kevésbé kifejezett, diffúz, intracitoplazmális reakciót figyeltünk meg. A papilláris dermisz legfelső rétegében közvetlenül a hám alatt elhelyezkedő makrofágok is kifejezett festődést mutattak. A PARP-regulátorral ($\geq 10\%$ BGP-15M tartalmú krémmel) előkezelt, UVB-expozícióban részesült bőr epidermiszében, hasonlóan az UVB-besugárzástól védett kontrollhoz, immunhisztokémiaileg detektálható TNF α szintézist nem észleltünk.

Következtetés: A PARP-regulátor (BGP-15M) lokális alkalmazása fotoimmunprotektív hatásának bizonyult az UVB-irradiáció indukálta bőr-immunszupresszióval szemben.

4.5. *A PARP-regulátor szerepe a bőr akut UVB-fény károsodás elleni védelmében (klinikai és hisztológiai vizsgálatok)*

A szőrtelen egerek bőrén különböző koncentrációjú (5, 10, 15 és 20%) BGP-15M tartalmú krémmel illetve vivőanyaggal előkezelt teszterületeken, 2 MED UVB-irradiáció után 24 órával jelentkezett klinikai tünetek (eritéma, ödéma, vezikula, bulla, erózió) alapján határoztuk meg a PARP-regulátor antieritematogén koncentrációját, mely 10% BGP-15M-nek felelt meg.

A bőrminták hisztológiai feldolgozása során a vivőanyaggal előkezelt, UVB-expozícióban részesített bőrben különböző mértékű, akut fénykárosodásra utaló eltérést észleltünk. Számos, eozinofil citoplazmával, piknotikus sejtmaggal rendelkező, vagy mag nélküli apoptotikus keratinocitát („sunburn” sejtet), a dermisz felső rétegében, részben perivaszkulárisan, részben a dermo-epidermális határ mentén ödémásan fellazult alapállományban neutrofil granulocitákat, a papilláris rétegben dilatált, duzzadt endotélű, vér alakos elemeivel kitöltött ereket lehetett látni. A $\geq 10\%$ BGP-15M tartalmú krémmel előkezelt állatok csoportjaiban lényeges kóros hisztológiai eltérést nem találtunk. Amennyiben az UVB- károsodás mértékét az egységnyi epidermiszben jelen levő „sunburn” sejtek számával fejezzük ki, úgy a BGP-15M $\geq 10\%$ koncentrációban alkalmazva több mint harmincszoros védelmet jelent, az egyszeri, eritematogén UVB-irradiáció (vivőanyaggal kezelt bőrben kifejtett) károsító hatásával szemben.

Következtetés: A lokálisan alkalmazott PARP-regulátor fotoprotektívnek bizonyult a bőr akut UVB-fénykárosodás elleni védelemben.

4.6. *PARP-regulátor antieritematogén hatásának összehasonlító vizsgálata ismert fényvédő faktorú (SPF) készítménnyel*

A BGP-15M tartalmú krém ($\geq 10\%$ koncentrációban alkalmazva) antieritematogén hatását hasonlítottuk össze egy, a forgalomban levő, SPF (Sun Protection Factor) 30 jelzésű, az UVB és UVA tartományban védelmet biztosító (általunk ”AS”-sel jelölt) készítménnyel. Az „AS”, illetve BGP-15M krém előkezelésben részesült teszterületeken az UVB-expozíció

klinikai tüneteket nem okozott. Hisztológiai vizsgálattal az "AS"-sel jelölt, ill. BGP-15M krém kezelésben részesített bőrmintákban lényeges kóros eltérést nem találtunk

Következtetés: Az alkalmazott kísérleti körülmények között a $\geq 10\%$ BGP-15M tartalmú krém fotoprotektív hatása megegyezett az „AS” jelzésű, 30-as fényvédő faktorú (SPF 30) készítményével.

4.7. *PARP-regulátor hatása a szoláris UV-expozíció klinikai tüneteire és a hisztológiai elváltozásokra*

A vivőanyaggal előkezelt, intenzív UV-sugárzásnak kitett teszterületeken a bőr a napégés klinikai tüneteit mutatta. Hisztológiailag a klinikai tüneteknek megfelelően erodált, illetve ödémásan fellazult, csökkent magfestésű, nekrotikus hám felszínén nagy mennyiségű fibrin csapadék volt megfigyelhető. A dermisz legfelső részében elhelyezkedő neutrofil granulociták és magtörmelékek sötét, széles sávot képeztek. Ugyanakkor a $\geq 10\%$ BGP-15M tartalmú krémmel végzett előkezelés az intenzív UV-sugárzás által indukált súlyos klinikai tüneteket kivédte.

Következtetés: A PARP-regulátor (BGP-15M krém $\geq 10\%$) fotoprotektívnek bizonyult, meggátolta az intenzív UV-expozíció által indukált dermatitis solaris klinikai és hisztológiai tüneteinek megjelenését.

4.8. *A BGP-15M krém protektív a krónikus UV-besugárzás indukálta fotokarcinogenezis klinikai, hisztológiai, immunhisztológiai és ultrastuktúrális tüneteivel szemben*

4.8.1. *A BGP-15M krém fotoprotektív hatása krónikus UVB-fény károsodásban*

Krónikus UVB-besugárzásban részesített szőrtelen egerek teszterületein vizsgáltuk a PARP-regulátor hatását a krónikus fénykárosodás elleni védelemben. Kísérleteink eredményei alapján a PARP-regulátor lokális alkalmazása a krónikus UVB-expozíció (32 hét, UVB

összdózis: 39 J/cm^2) fotokarcinogén hatását kivédte. A vivőanyaggal előkezelt teszterületeken a 18. héttől kezdve (UVB-dózis: $22,5 \text{ J/cm}^2$) klinikailag 1-2 mm nagyságú, vörösbarna színű, félgömbszerűen kiemelkedő tumorok jelentkeztek, amelyek hisztológiai vizsgálattal carcinoma spinocellulare-nak bizonyultak. A 15% BGP-15M krémmel előkezelt egerek bőrmintáinak hisztológiai feldolgozása során a kontroll bőrhöz képest az epidermisz másfél-kétszeresére történő kiszélesedését lehetett megfigyelni, a dermiszben lényeges kóros eltérést nem észleltünk. A vivőanyaggal kezelt, UVB-irradiált csoport minden tagja a 23. hétre egy vagy több, klinikailag és hisztológiailag verifikálható, spinocellularis carcinomának illetve keratosis solarisnak megfelelő bőrelváltozással rendelkezett, ugyanakkor a 15% BGP-15M krémmel előkezelt egerek bőre enyhe fokú pigmentáción kívül más eltérést nem mutatott. A kísérlet befejezésekor a 32. héten a vivőanyaggal előkezelt, krónikus UVB-besugárzásban részesült állatok bőre a teszterületen jelentősen megvastagodott, sötétbarna-szürkés hiperpigmentációt és depigmentációt mutatott, felszíni egyenetlenség jeleivel, különösen a multiplex tumorok környezetében. A 15% BGP-15M krémmel előkezelt, és krónikus UVB-expozícióban (összdózis: 39 J/cm^2) részesített egercsoportban, a teszterület bőrét összehasonlítva a kezeletlen kontroll állatokéval, illetve a környező, takarással védett bőrfelzínnel, barnás-vörös színű pigmentáción kívül egyéb klinikailag értékelhető eltérést nem találtunk. Nyolc hónap elteltével tumor képződésre utaló klinikai, vagy hisztológiai eltérést a BGP-15M krémmel előkezelt csoportban nem észleltünk. Az UVB-expozíciótól védett (BGP-15M, ill kontroll csoport) állatokon spontán tumor képződést nem lehetett megfigyelni. Irritatív, vagy allergiás reakciót a kísérlet során nem észleltünk.

A krónikus fénykárosodás a vivőanyaggal előkezelt mintákban a 26. héten a rugalmas rostok Orcein-Giemsza festéssel kimutatható károsodásában (nagy göcökben fragmentáció és összezsapzódás), a 32. héten a tumorok körül az elasztikus rostok megfogyatkozásában, és a kollagén rostok felszaporodásában nyilvánult meg. A 15% BGP-15M krémmel előkezelt, és UVB-irradiációban részesült egerek bőrmintáiban ugyanakkor megtartott, ill. enyhén megfogyatkozott rugalmas rosthálózatot figyelhettünk meg, amit a kronológiai öregedés hisztológiai jeleként értékeltünk. Amíg a vivőanyaggal előkezelt mintákban a krónikus UV-expozíció hatására a dermiszben a melanin a makrofágokban durva szemcsés formában, esetenként szabadon a kötőszöveti alapállományban is megtalálható volt, addig a PARP-

regulátorral előkezelt egerek bőrében a melanin pigment a bazális réteg egyes sejtjeiben gócosan jelent meg.

Immunhisztokémiai vizsgálattal a PARP-regulátorral előkezelt, krónikus UVB-besugárzásban részesített bőrmintákban a bazális keratinociták p53 antitesttel csak elvétve adtak immunhisztológiai reakciót. A vivőanyaggal előkezelt állatok bőrében a keratosis solarisnak megfelelő területeken foltos p53 festődést kaptunk. Az invazív tumorokban a sejtek nagy része intenzív p53 magpozitivitást adott. A precancerosus elváltozásokban megfigyelhető „patch”-jelleg a klonális expanzióra utalt.

Következtetés: Eredményeink alapján a PARP-regulátor a krónikus UVB-expozíció fotokarcinogén hatását kivédte.

4.8.2. *PARP-regulátor hatásának vizsgálata UVA-sugárzás indukálta fotokarcinogenezis klinikai tüneteire szörtelen egérmódellem*

A PARP-regulátor BGP-15M potenciális fotoprotektív tulajdonságát a krónikus UVA-besugárzott, ill. 8-metoxipszoralennel fényérzékenyített és UVA-besugárzott szörtelen egerek bőrében kialakuló változások követésével vizsgáltuk.

A klinikai tünetek súlyosságát valamint a tumorok jelentkezését vizsgáltuk. Az első tumort a 14. héten, a vivőanyag+8-MOP+UVA-kezelésben részesült állaton figyeltük meg. A 4. hónap végére a vivőanyaggal előkezelt, 8-MOP+UVA-irradiációban részesült állatokon különböző nagyságú szoliter tumorokat észleltünk. A PARP-regulátor lokális előkezelés fotoprotektívnek bizonyult mind a 8-MOP-pal fényérzékenyített, mind pedig az UVA-besugárzott (26 hét, összdózis: 65 J/cm²) állatok bőrében. A PARP-regulátor kivédte a vivőanyaggal előkezelt, hasonló módon UV-expozíciónak kitett állatokban klinikailag megfigyelt, és hisztológiailag igazolt tumorképződést.

A PARP-regulátorral előkezelt, UVA-besugárzott bőrmintákban hisztológiai vizsgálattal a hám enyhe kiszélesedését és megtartott hámstruktúrát találtunk. Ugyanakkor a vivőanyaggal előkezelt, UVA-besugárzott mintákban az epidermisz egyenetlenül

akantótikusnak és hiperkeratótikusnak, szegmentálisan parakeratotikusnak bizonyult a hematoxilin-eozinnal festett metszetekben. Az epidermisz alsó részein a szerkezet felbomlott, a magok polaritása megszűnt. Ezeken a területeken a sejtmagok általában anapláziát, hiperkrom kromatin szerkezetet mutattak, és nagyobb számban sejtoszlások is észlelhetők voltak. A bazális rétegben kifejezett sejtproliferációt láttunk. A dermo-epidermális határ mentén főként limfocitákból és hisztiocitákból álló lobosodást észleltünk.

A vivőanyaggal kezelt, UVA-besugárzott bőrmintákból készült hisztológiai metszeteken Orcein-Giemsza festéssel a rugalmas rostok fragmentálódását és összezsapzódását figyeltük meg a dermisz középső részében. A PARP-regulátorral előkezelt bőrben az elasztikus rostok száma minimális mértékben csökkent, a kollagén rostok száma változatlan volt a kezeletlen, azonos korú kontroll bőrhöz viszonyítva. Fontana-Masson festéssel kisebb mennyiségű melanin pigmentet tudtunk fokálisan kimutatni a bazális és szuprabazális keratinocitákban. A vivőanyaggal előkezelt, fényérzékenyített, UVA-besugárzott egérbőrben Fontana-Masson festéssel fokálisan nagy mennyiségű melanint lehetett kimutatni a bazális és szuprabazális keratinocitákban, az epidermisz alsóbb sejtsoraiban, és a dermális makrofágokban tömeges melanin pigmentet észleltünk. Ugyanakkor az UVA-fénnyel besugárzott bőrben kisebb mennyiségben lehetett melanin pigmentet a hámban és az irhában megfigyelni.

Immunhisztológiai vizsgálattal a 15% BGP-15M krémmel előkezelt, UVA-besugárzott, valamint az UV-expozícióban nem részesült bőrmintákban p53 festődést nem észleltünk. A vivőanyaggal előkezelt, UVA-besugárzott részesített állatok bőrében a bazális sejtréteg magjainak és a megbomlott szerkezetű hámrészletek tumorosan átalakult sejteinek p53 akkumulációját igazoltuk.

Következtetések: A PARP-regulátorral végzett kezelés protektívnek bizonyult a több mint féléves UVA-besugárzás fotokarcinogén hatásával szemben.

5. Megbeszélés

A környezeti stressz hatások közül napjainkban bőrgyógyászati szempontból az egyik legfontosabb a napfény ultraibolya tartományának károsító hatása. Ezen a károsító hatással szembeni védelem lehetőségét vizsgáltam. Szemben a hagyományos fizikai illetve kémiai hatáson alapuló fényvédelemmel érdeklődésem a biológiai fényvédelem ezen belül is a PARP-regulációs mechanizmusokra terelődött. Prof. Dr. Farkas Beatrix munkacsoportjának tagjaként lehetőségem nyílt a BGP-15 mint PARP-regulátor molekula bőrgyógyászati hasznosításának kipróbálására.

Munkacsoportunk szőrtelen egéren végzett vizsgálataival igazolta, hogy a BGP-15M lokális alkalmazása kivédi az UV-fény DNS-károsító, immunszuppresszív hatását, az akut és krónikus UV(A/B)-fény károsodás klinikai és hisztológiai tüneteinek manifesztációját. Protektívnek bizonyult a több mint féléves UVA-besugárzás és 8 hónapos UVB-expozíció fotokarcinogén hatásával szemben. Irritatív, allergiás, ill. fotoirritatív vagy fotoallergiás reakciót a szer hosszas használata mellett nem észleltünk. További előnye, hogy a BGP-15M a bőrben kumulálódik, amelyet az UV-expozíció tovább fokoz. Tulajdonságai alapján a fényvédők új csoportjába tartozik. Potenciális használatával elkerülhető a jelenleg forgalomban levő sok komponensű fényvédő készítmények alkotó elemei között fellépő interakció, allergizáló, vagy a bizonyos hullámhosszokon jelentkező fényérzékenyítő (fotokarcinogén) mellékhatás.

6. Az értekezés megvalósult főbb célkitűzései

Elsőként hívtuk fel a figyelmet a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim a bőr akut és krónikus UV(A/B)-fény károsodásában, és annak legsúlyosabb formájában, a fotokarcinogenezisben betöltött szerepére.

Elsőként közöltük, hogy PARP-gátlása, ill. down-regulációja fotoprotektív hatású a bőr akut és krónikus UV-fény károsító hatásával szemben.

Az új, nem toxikus PARP-gátlóról, az O-(2-hidroxi-3-piperidino-propil)piridin-3-karboxil sav amidoxim monohidroklorid sójáról, a BGP-15M molekuláról *elsőként bizonyítottuk*, hogy lokális alkalmazása esetén az UV-fény citotoxikus hatásaival szemben a bőrben

jelentős védelmet biztosít. A BGP-15M direkt gátolja a PARP-aktivitást, DNS-protektív, fotoimmunprotektív, véd az akut és krónikus UV(A/B)-fény károsodás klinikai és hisztológiai tüneteinek manifesztációjával szemben és gátolja a fotokarcinogenezist.

Munkacsoportunk egy új típusú (PARP-gátló) fényvédő molekulát *fejlesztett ki*, mely önmaga potenciálisan képes mindazon feltételeknek eleget tenni, amit jelenleg 10-15 különböző fizikai és kémiai fényvédő hatású molekula kombinációjával érnek el.