

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Bodnár Edina

Oxidatív stressz és poli-ADP-riboziláció a normál bőrben és a sebgyógyulás folyamatában

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Oxidatív stressz és poli-ADP-riboziláció a normál
bőrben és a sebgyógyulás folyamatában**

Dr. Bodnár Edina

Témavezető: Dr. Szabó Éva



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések listája	6
1. Bevezetés	9
1.1. Oxidatív stressz fogalma, biológiai szerepe	9
1.1.1. Endogén oxidánsok	10
1.1.2. Exogén oxidánsok	15
1.1.3. Antioxidáns rendszerek	16
1.1.4. Oxidatív stressz biológiai hatásai	18
1.1.5. Reaktív intermedierek, oxidatív stressz szerepe a bőrben	20
1.2.1. Poli-ADP-ribóziláció fogalma	21
1.2.2. Poli-ADP-ribóziláció biológiai szerepe	22
1.2.3. A PAR polimerek metabolizmusa	24
1.2.4. Poli-ADP-ribóziláció a bőrben	27
1.3.1. Sebgyógyulás folyamata fiziológiás állapotban, akut sebek	28
1.3.2. Kóros, elhúzódó sebgyógyulás, krónikus sebek	32
1.3.3. Oxidatív stressz a sebgyógyulásban	35
1.3.4. Poli-ADP ribóziláció lehetséges szerepe a sebgyógyulásban	37
2. Célkitűzések	41
3. Anyagok és módszerek	42
3.1. Humán minták	42
3.2. Nitro tirozin kimutatása szövetmintákból	44
3.3. Poli(ADP-ribóz)/PAR/ kimutatása szövetekben	45
3.4. Az immunhisztokémiai vizsgálatok értékelése	45
3.5. Szérum és sebfolyadékából végzett vizsgálatok	46
3.5.1. Gyökfogó kapacitás meghatározása	46
3.5.1.1. Gyökfogó kapacitás mérése ABTS dekolorizációs módszerrel	46
3.5.1.2. Antioxidáns kapacitás mérése rézion redukáló képessége alapján CUPRAC-assay-vel	46
3.5.1.3. Hidrogén-peroxid mennyiségének meghatározása Amplex Red assay-vel	47

3.5.2. Glutathion (GSH) meghatározása	47
3.5.3. Fehérje oxidáció mértékének meghatározása	47
3.5.4. Lipid peroxidáció mérése	48
3.5.5. Fehérje tirozin nitráció meghatározása	48
3.5.6. Laktát dehidrogenáz aktivitás meghatározása	49
3.5.7. Citokinek meghatározása	49
3.6. Statisztikai analízis	49
4. Eredmények	50
4.1. A poli(ADP) ribóz/PAR/ vizsgálata a normál bőrben	50
4.2. Nitrotirozin és PAR vizsgálata krónikus sebekben	51
4.3. Sebfoliadék és szérumminták vizsgálata	52
4.3.1. Biomolekula károsodás és antioxidáns szint mérése sebfoliadékban akut és krónikus sebbel rendelkező betegeknél	53
4.3.2. Biomolekula károsodás meghatározása és az antioxidáns szint mérése akut és krónikus sebbel rendelkező betegek és egészséges kontrollak szérumában	54
4.3.3. Sebgyógyulás folyamatában jellemző markerek vizsgálata akut és krónikus sebbel rendelkező betegek sebfoliadékában és szérumában, továbbá egészséges kontroll szérumban	56
4.4. Összefüggések keresése a mért biokémiai paraméterek között	57
4.5. Korrelációs analízis a sebfoliadék/szérum biomarkerek és a páciensek életkora között	58
5. Megbeszélés	59
5.1. Poli-ADP-riboziláció a normál bőrben	59
5.2. Oxidatív-, nitrozatív stressz akut és krónikus sebekben	60
5.3. A sebgyógyulás során kulcsfontosságú biomolekulák akut és krónikus sebekben	61
5.4. Összefüggések a mért paraméterek között, korrelációs vizsgálatok	62
5.5. A vizsgálatok korlátai	63
5.6. Peroxinitrit-PARP aktiváció krónikus sebekben szövettani szinten	64

5.7. PARP inhibitorok klinikai jelentősége	64
6. Konklúzió	66
7. Összefoglalás	68
8. Summary	69
9. Irodalomjegyzék	70
10. Tárgyszavak/ Key words	89
11. Köszönetnyilvánítás	90
12. Publikációs lista	91
13. Függelék (Közlemények másolatai)	94

RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

A magyarra nehezen fordítható kifejezések a rövidítésekben és a dolgozatban angolul szerepelnek.

3-AB	3-aminobenzamid
ABC	avidin-biotin peroxidáz komplex
ABTS	2,2-azino-bisz(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)
AP-1	aktivátor protein-1
ATP	adenozin trifoszfát
DNS	dezoxiribonukleinsav
G6PDH	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GPx	glutation peroxidáz
GSR	glutation-diszulfid reduktáz
GSH	glutation
GSSG	glutation diszulfid
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HIF	hipoxia indukáló faktor
HOCl	hipoklórossav
ICAM-1	intercelluláris adhéziós molekula-1
MDA	malondialdehid
MMP	matrix metalloproteináz
MRC	multiprotein replikációs komplex
cNOS	konstitutív nitrogén monoxid szintetáz
eNOS	endotheliális nitrogén monoxid szintetáz
iNOS	indukálható nitrogén monoxid szintetáz
nNOS	neuralis nitrogén monoxid szintetáz
NAD ⁺	nikotinamid-adenin dinukleotid (oxidált forma)
NADP ⁺	nikotinamid-adenin dinukletid foszfát (oxidált forma)
NADPH	nikotinamid-adenin dinukleotid foszfát (redukált forma)
NADPH-oxidáz	nikotinamid-adenin dinukleotid foszfát - oxidáz
NER	nucleotide excision repair
NF-κB	nuclear factor kappa B

NMNAT-1	nikotinamid-mononukleotid-adenil-transzferáz-1
NO^-	nitroxil anion
$\text{NO}\bullet^-$	nitrogén monoxid
$\text{NO}_2\bullet^-$	nitrogén-dioxid
NOS	nitrogén monoxid szintetáz
1O_2	szinglet oxigén
$\text{O}_2\bullet^-$	szuperoxid
$\bullet\text{OH}$	hidroxilgyök
ONOO-	peroxinitrit
PAR	poli(ADP-ribóz)
PARG	poli(ADP-ribóz) glikohidroláz
PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz
PARPi	PARP inhibitor
PARS	poli(ADP-ribóz) szintetáz
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet-derived growth factor
PJ34	N-(-oxo-5,6-dihidro-fenantridi-nin-2-yl)-N, N-dimetilacetamid)
PKC	protein kináz C
PMN	polimorphonuclearis sejt
R-ONOO	alkil-peroxinitrit
RNI	reaktív nitrogén intermediér
ROI	reaktív oxigén intermediér
ROS	reaktív oxigén származékok
RNS	reaktív nitrogén származékok
SIRT-1	sirtuin-1
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SMAD	suppressor of mothers against decapentaplegic
SSB	single strand breaks (DNS egyesszál törés)
TBS	tris-buffered saline
TBARS	thiobarbitursav reaktív anyagok
TCA	triklórecetsav
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
VEGF	vascular endothelial growth factor

VEGFR2

vascular endothelial growth factor receptor 2

1. BEVEZETÉS

1.1. Oxidatív stressz fogalma, biológiai szerepe

Az életfolyamatok során az élethez nélkülözhetetlen oxigénből fiziológiás körülmények között is keletkeznek szabadgyökök, melyek termelődése patológiás körülmények között megnő. A szabadgyökökre jellemző, hogy az atomok külső elektronhéján párosítatlan elektron található, ezért ezen elektronpályák nem stabilak, a szabadgyökök így igen reakcióképesek és igen rövid élettartamúak. Ezen szabadgyökök oxidatív stresszt okozva megbontják a sejtek pro- és antioxidáns egyensúlyát, ezzel növelik a sejtek érzékenységet, illetve károsítják azokat. Az oxidatív stressz a szervezetben zajló oxidációs folyamatok és ezek megakadályozását végző ún. antioxidáns rendszerek közötti egyensúly felborulása az előbbiek javára. Oxidatív stresszt a fokozott szabadgyök termelődés mellett, a csökkent lebontás, azaz az antioxidáns rendszerek kóros működése is okozhat.

Az oxidatív stressz során a sejtben felhalmozódnak a szabadgyökök (felszínükön szabad, egy- vagy több párosítatlan elektront hordozó atomok vagy molekulák), melyek nagy reakciókészségük miatt könnyen kémiai reakcióba lépnek más molekulákkal (arról elektront felvéve, vagy átadva), ezáltal sejtfunciókat, biológiai rendszereket befolyásolnak. Szabadgyökök a sejtekben fiziológiás körülmények között (endogén oxidánsok) és külső, toxikus hatásra (exogén oxidánsok) is keletkezhetnek. A gyökök nem csak károsak lehetnek, hanem bizonyos folyamatokban nélkülözhetetlenek. A ROS és RNS specieszek számos biológiai folyamat (redox reguláció) mediátorai, de több kórfolyamatban túlzott mennyiségben termelődhetnek, vagy lebontásuk elégtelensége miatt halmozódnak fel, ilyen esetben negatívan befolyásolják a biológiai folyamatokat (ezen esetben oxidatív stresszről beszélünk). A szervezet ezért nem a szabadgyökök teljes eliminálására törekszik, hanem a megfelelő pro- és antioxidáns egyensúly fenntartására. Ha az egyensúly a prooxidánsok irányába billen, oxidatív stresszről beszélünk. Ennek kivédésére a szervezet háromszintű antioxidáns védelmet alakított ki. Az első szintet az antioxidáns enzimek képviselik, melyek segítik a gyök-kioltó reakciókat vagy maguk is képesek a ROS semlegesítésére, a másodikat a kis molekulású antioxidánsok, melyek a már beindult szabadgyökös láncreakciókat állítják le, ezek közül a legfontosabbak az aszkorbinsav és a glutation. Az antioxidáns védekező rendszer harmadik vonala akkor lép működésbe, ha a károsodás már megtörtént, és feladata a már kialakult sérülések eltávolítása vagy a hibás részek kijavítása (pl.: DNS-repair enzimek, hősokk fehérjék, chaperonok).

1.1.1. Endogén oxidánsok

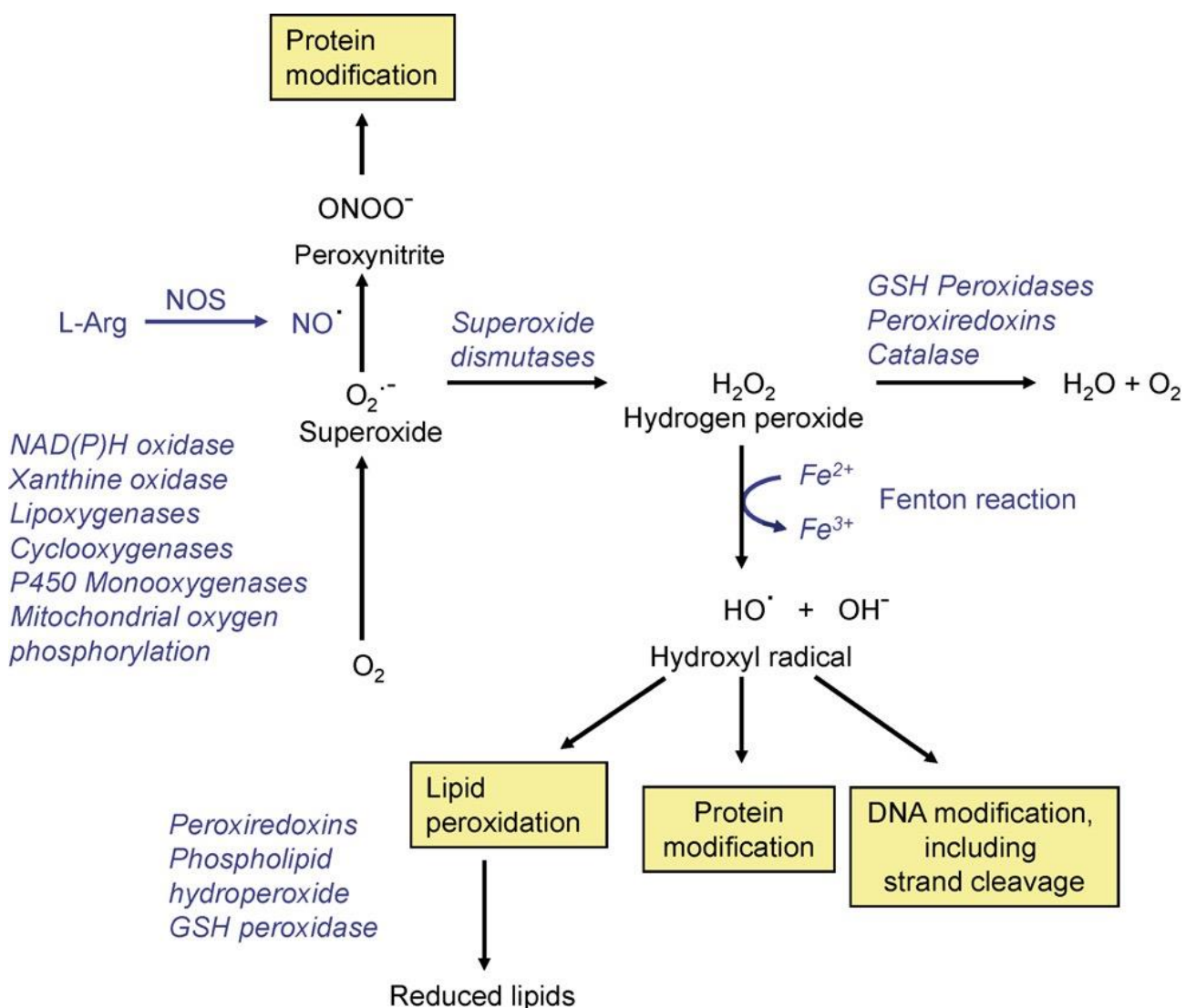
Az oxidatív stressz állapotában a sejtekben fiziológiás körülmények között keletkező nagy reakcióképességű molekulákat eredetük szerint két nagy csoportba sorolhatjuk: reaktív oxigén specieszek/származékok (ROS), vagy más néven reaktív oxigén intermedierek (ROI) és a reaktív nitrogén származékok (RNS) vagy más néven reaktív nitrogén intermedierek (RNI) (Valko és mtsai, 2006, 2007).

Reaktív oxigén származékok (ROS)

A reaktív oxigénszármazékok (ROS) az oxigén normál metabolizmusának (sorozatos redukciójának) természetes melléktermékei, kémiaiilag reaktív vegyi anyagok, amelyek oxigént tartalmaznak. Az élettani folyamatok során ROS termelődése elsősorban a mitokondriumokban zajló oxidatív foszforilációhoz, és a normális celluláris aerob metabolizmushoz kötött. Szabad gyököket a mitokondriális elektrontranszportlánc elemei termelnek: a xantin-oxidáz, a NADPH-oxidáz, a citokróm p450, illetve a nitrogén-monoxid szintáz, ciklooxygenáz izoenzimek, a lipoxigenázok és a monooxygenázok (1.ábra). A ROS-k számos fiziológiás folyamatban vesznek részt, fontos szerepet játszanak a sejtek jelátvitelében és homeosztázisában, illetve a kórokozók elleni nem specifikus védelemben. Környezeti stressz esetén (pl. UV, ionizáló sugárzás) szintjük drámaian megnőhet, ami jelentős károsodást okozhat a sejtstruktúrákban. A ROS-nak fontos szerepe van a sejtek oxigén érzékelésében, befolyásolja a hipoxia indukáló faktor (HIF) és a transzkripciós faktorok (NF- κ B, AP-1, p53) működését (Sun és Oberley, 1996). Két alcsoportjuk ismert: az egyik a párosítatlan elektronnal rendelkező szabadgyökök, melyek instabilak, reaktívak, a másik csoportba azon molekulák tartoznak, amelyek nem szabadgyökök, de reaktívak és reakcióik során szabad gyök képzésére képesek. A szabadgyökök csoportjába a szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$) és a hidroxil gyök ($\bullet OH$), a másik csoportba a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a szinglet oxigén (1O_2) és a hipoklórossav (HOCl) tartozik (Paravicini és Touyz, 2008). Ezeken kívül kevésbé ismert ROS-ok a következők: peroxil, hydroperoxil, alkoxil gyök, triplet oxigén, lipidperoxil-gyök, dioxigenil-gyök (Halliwell és Gutteridge, 1990; Cheeseman és Slater, 1993; Gutteridge és Halliwell, 2000; Halliwell és Whiteman, 2004).

A ROS-t az összes sejt előállítja a normál anyagcsere folyamatok során. Különösen nagy mennyiségben termelődik ROS sérült és gyulladt szövetekben NADPH-oxidáz révén, melyet a gyulladásos sejtek különösen nagy mennyiségben expresszálnak. A NADPH-oxidáz hatására a sejtekben nagy reakciókészségű szuperoxid-anion termelődik, amely gyorsan hidrogén-

peroxiddá, majd vízzé alakul a szuperoxid-dizmutáz révén. A hidrogén-peroxidból vas- vagy rézionok jelenlétében nagyon agresszív hatású hidroxilgyök keletkezik, mely makromolekulák oxidációjához vezet, ezért a hidrogén-peroxidot gyorsan semlegesíteni kell, melyet a katalázok, peroxidázok és peroxiredoxinok végeznek. A ROS méregtelenítő enzimek mellett a ROS elleni védelem számos exogén és endogén kis molekulatömegű antioxidánssal érhető el. Ha a ROS eliminálása nem elegendő, vagy ha a ROS nagy mennyiségben képződik, akkor oxidatív stressz lép fel, amely súlyos sejtkárosodást, idő előtti öregedést vagy akár daganatos átalakulást is eredményezhet.



1.ábra: A különböző típusú ROS-k és RNS-ek keletkezése és lebomlása, illetve hatása a biomolekulákra (Schäfer és Werner. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. 2008)

a, Szuperoxid: $O_2^{\bullet-}$

A szuperoxid legnagyobb mennyiségben a mitokondriális légzési lánc során keletkezik nem enzimatis úton a szemiubikinonnal való reakció során (Kovacic és mtsai, 2005).

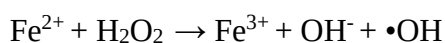
Illetve keletkezik enzimek (NADPH-oxidáz, xantin-oxidáz, lipoxigenázok, ciklooxygenázok, citokróom P450) közreműködésével is. Szuperoxid gyök keletkezik a xantin oxidáz működése során kóros körülmények között és az arachidonsav metabolizmusban a lipoxigenázok hatására. A szuperoxid gyök vizes közegben gyorsan átalakul, hidrogén-peroxid (H_2O_2) és víz keletkezik (dizmutációs reakció során), amely reakciót a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim jelentősen felgyorsítja.

b, Hidroxil gyök: $\bullet OH$

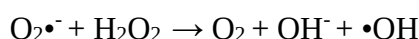
A legreaktívabb szabadgyök. Nagyon agresszív, citotoxikus, mindennel gyorsan reagál, rekombinálódik. Erősen oxidál, láncreakciót indukál, önmagával H_2O_2 -t alkot. Számos makromolekulát károsíthat: lipidperoxidációt, fehérjekárosodást, DNS törést okozhat. Neutrophil aktiváció során szuperoxid anionból keletkezik.

A Fenton-reakció vagy a Haber-Weiss reakcióban alakul ki hidrogén-peroxidból.

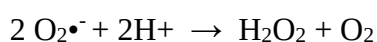
A Fenton-reakcióban a H_2O_2 átmeneti fém (Fe^{2+} vagy Cu^+) jelenlétében elhasad, és belőle hidroxil gyök keletkezik.



A Haber-Weiss reakcióban a hidrogén-peroxid és szuperoxid reakciójában hidroxilgyök keletkezik (Kehrer, 2000; Liochev és Fridovich, 2002).

**c, Hidrogén-peroxid: H_2O_2**

Szuperoxidból keletkezik SOD, NADPH-oxidáz vagy xantin oxidáz hatására.



A hidrogén-peroxid eliminálását a kataláz, peroxidázok és peroxiredoxinok végzik (Schafer and Werner, 2008).

d, Szinglet oxigén: 1O_2

Nagy reaktivitású vegyület. Legtöbbször enzimatisusan peroxidázok, lipoxigenázok hatására hidrogén-peroxid és hipoklorit vagy peroxinitrit reakciója során keletkezik.

e, Hipoklórossav: HOCl

Antibakteriális hatású erős oxidálószer, gyulladásos folyamatok során az aktivált PMN sejtekben (neutrophil sejtekben) termelődik, mieloperoxidáz hatására hidrogénperoxid és kloridion reakciója során. A membránokon átjutva fémionok jelenlétében nagy reaktivitású hidroxilgyök képződéshez vezet. Részt vesz a lipid peroxidációban és a DNS károsításban (Schraufstatter és mtsai, 1990; Cheeseman és mtsai, 1993).

f, Ezeken kívül fontos még megemlíteni a szerves **alkoxi- és peroxigyököket** is, melyek a lipidperoxidáció során keletkező szerves oxigén szabad gyökök. A szén-tetrakloridból képződő gyök is ebbe a csoportba tartozik.

Reaktív nitrogén származékok (RNS)

A legismertebb reaktív nitrogén származékok a nitrogén monoxid ($\text{NO}^\bullet$), nitrogén-dioxid ($\text{NO}_2^\bullet$), nitroxil anion (NO^-), a peroxinitrit (ONOO^-) és az alkil-peroxinitritek (R-OONO).

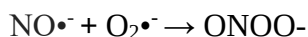
a, nitrogén monoxid: $\text{NO}^\bullet$

Emlős sejtekben az endogén NO képződés enzimatis folyamat. A nitrogén monoxidot a NO szintáz (NOS) enzimsalád tagjai szintetizálják L-argininből. A NOS enzimsalád két csoportra osztható: cNOS (konstitutív NOS) és iNOS (indukálható NOS). A cNOS enzimek tovább csoportosíthatók: nNOS (neurális NOS) és eNOS (endotheliális NOS), illetve a kevésbé ismert mtNOS (mitokondriális NOS). Az nNOS termeli a neurotransmitterként működő NO-t, míg az endotheliális NOS (eNOS) az értónus fenntartásában fontos NO-t termeli. Az indukálható NOS-t (iNOS) számos sejt termeli, pl. makrofágok, elsősorban gyulladásos állapotokban. A NO-ban lévő kompenzálatlan spinű elektron magyarázza a NO reakcióképességét, szabad gyök jellegét. A NO színtelen gáz, hidrofób jellege kifejezett diffúziós készséget eredményez a biológiai rendszerekben, így akadálytalanul jut át a membránokon. Viszonylag rövid (0,5-5 sec) fél-életideje ellenére a központi idegrendszerben pl. egy adott pontból felszabadulva kb. 100 μm sugarú körön belül elhelyezkedő sejtekhez és szinapszisokhoz tud eljutni. A NO szabadgyök jellegéből adódóan más szabad gyökökkel (pl. szuperoxid anion), és átmeneti fémekkel (pl. hem vas) reakcióba lép, mely reakciók termékei maguk is biológiailag aktív és jelentős vegyületek. A NO reakcióba lép az oxihemoglobinnal, így methemoglobin és nitrát keletkezik, mely nitrátot a vese választja ki és a vizelettel ürül. Már a XIX. század elején megfigyelték, hogy gyulladásos betegségben szenvedők vizeletében emelkedett a nitrátszint.

A NO az emberi szervezet egyik kulcsmolekulája, fontos celluláris jelátviteli molekula, mely számos fiziológiai és patológias folyamatban vesz részt. A NO intracellularisan reverzibilis poszttranszlációs módosításokat hoz létre, mellyel proteinek funkcióját befolyásolja, illetve a guanil-cikláz aktivitásának befolyásolása révén a cGMP szintet emeli. A NO-nak alapvető szerepe van a neurológiai, fiziológiai és immunológiai folyamatokban, a keringésszabályozásban (a szívinfarktus, stroke, érlemezsedés elleni folyamatokban). Erős értágító, kulcsszerepe van a szív működésében, a vérnyomás szabályozásában, az egyes életfontosságú szervek vérellátottságának szabályozásában. A NO hatására az erek simaizomzata elernyed, intravascularisan a vérrögzépződés csökken. Az idegrendszerben a szinaptikus plaszticitás, a memória, a kognitív funkciók mellett a neuroendokrin szabályozási folyamat is a NO neurotranszmitter segítségével zajlik. Az immunrendszer gyulladásért felelős sejtjei (makrofágok, neutrophilek) NO termelés révén baktericid, antivirális és tumorellenes hatást fejtenek ki, így szolgálva a gazdaszervezet védelmét. Szervátültetéseknél a szervkilökődés esélyét csökkenti.

b, peroxinitrit: ONOO-

Gyulladásos folyamatok során mind a szuperoxid anion, mind a NO túltermelődhet, ilyen állapotban a nitrogén monoxid képes reakcióba lépni a szuperoxiddal, melynek során nagy reakcióképességű peroxinitrit keletkezik (Beckman, 1996; Beckman és Koppenol, 1996).



A peroxinitritnek nincs párosítatlan elektronja, így nem szabadgyök, ennek ellenére nagyobb reakcióképességű, mint azok a molekulák, melyekből létrejön. A peroxinitrit viszonylag stabil vegyület (fél-életideje kb. 1 sec). Reakcióba léphet számos makromelukával, fehérjéket inaktiválhat oxidáció és/vagy tirozin/triptofán nitrálás révén, emellett a peroxinitrit reakcióba lép tiolokkal, lipid peroxidációt és DNS töréseket (SSB) hoz létre, illetve jelátviteli útvonalak működését befolyásolja.

A tirozin nitrálása révén létrejött nitrotirozin, az in vivo termelődő peroxinitrit jelenlétére utal. (Beckman és Koppenol, 1996; Crow és Ischiropoulos, 1996).

A peroxinitrit peroxinitritsavvá (ONOOH) alakul, mely nitrogén-dioxid gyökre és hidroxil gyökre bomlik: $\text{ONOOH} \rightarrow \text{NO}_2\cdot + \cdot\text{OH}$. A hidroxil gyök rendkívül reakcióképes, fél-életideje nagyon rövid. A nitrogén-dioxid szabad gyök tovább alakulhat dinitrogéntetroxiddá (N_2O_4) és dinitrogén-trioxiddá (N_2O_3), melyből karcinogén nitrózaminok képződhetnek.

A NO és a peroxinitrit biológiai hatásai

A két legtöbbet vizsgált reaktív nitrogén intermedier, a nitrogén monoxid (NO) és a peroxinitrit kémiai tulajdonságaiban és sejtre gyakorolt hatásában jelentős különbségek vannak.

A NO egyik meghatározó biológiai szerepe az értónus szabályozása vasodilatátor hatása révén, emellett neurotranszmitter funkcióval is bír. A NO szabadgyök, de mégsem rendelkezik olyan erős oxidáns hatással mint a peroxinitrit. A NO passzív diffúzióval jut át a sejtmembránon, ezzel szemben a peroxinitrit anion csatornán (Virág és mtsai, 2003). A prosztaglandin szintézis kulcsenzimének (lipoxigenáz és cikloxygenáz) működését a NO gátolja, míg a peroxinitrit fokozza (Fujimoto és mtsai, 1998; Landino és mtsai, 1996). A NO-t egyes szerzők apoptózis inhibitorként (Liu és Stamler, 1999), mások apoptózis indukálóként (Brune és mtsai, 1999; Haendeler és mtsai, 1999) írták le. A peroxinitrit egyértelműen apoptózist indukál (Estevez és mtsai, 1995; Virág és mtsai, 1998). Elképzelhető, hogy azokban a kísérletekben ahol a NO citotoxikus hatását észlelték, ott a NO-ból képződő peroxinitrit citotoxikus hatása érvényesült. A lipid peroxidációt a NO gátolja, míg a peroxinitrit fokozza (Rubbo és mtsai, 1994). A matrix metalloproteinázok (MMP) működésére inkább a peroxinitritnek van hatása. A peroxinitrit direkt módon is képes aktiválni a MMP-ok működését, mely elősegíti a fehérvérsejtek migrációját a szöveti regeneráció folyamatában (Frears és mtsai, 1996; Okamoto és mtsai, 1997).

c, nitroxil anion: NO^-

A nitroxil anion a $\text{NO}^\bullet$ egy elektronos redukciójának terméke, a nitrogén monoxidból egy elektron felvételével keletkezik.

1.1.2. Exogén oxidánsok

Számos külső, toxikus tényező indíthat be vagy fokozhat oxidatív folyamatokat. Ezek közül kiemelhető az UV-sugárzás, légszennyeződés (cigarettafüst), ózon, ionizáló sugárzások, hőhatás, hiperoxia, a nehézfémek (vas, réz, ólom, higany, arzén, nikkel), xenobiotikumok (a szervezet számára idegen anyagok, pl. gyógyszerek, mérgek), toxinok. Az UV-sugárzáshoz hasonlóan hatnak a nehézfémek, az endogén fotoszenzitív anyagokat (pl. porfirin, riboflavin) triggerelve indítanak be oxidatív folyamatokat (Kovács és mtsai, 2012).

1.1.3. Antioxidáns rendszerek

A szervezetben fiziológiás körülmények között termelődő oxidatív molekulák egyensúlyban tartása érdekében a szervezet sajátos védelmi, eltakarító, ún. antioxidáns rendszert hozott létre, így biztosítva a sejtalkotó molekulák védelmét. Ezt a védelmi mechanizmust a szervezetben termelődött enzimek és a táplálékból felvett nem enzimatisz antioxidáns tulajdonságú anyagok alkotják.

Az antioxidánsok csekély mennyiségben vannak jelen a szervezetben az oxidálándó szubsztárhoz képest, mégis jelentős mértékben csökkentik, vagy akár gátolni is képesek annak oxidációját. Az emberi szervezetben az antioxidánsok szinergizáló, egymást erősítő hatással rendelkeznek, ezért az antioxidánsok együtt jóval hatékonyabbak a szabadgyökökkel szemben, mint külön-külön.

Az antioxidáns védelemnek három szintjét ismerjük. Az első szintet az antioxidáns enzimek képviselik, melyek segítik a gyök-kioltó reakciókat vagy maguk is képesek a ROS semlegesítésére, a másodikat a kis molekulású antioxidánsok, melyek a már beindult szabadgyökös láncreakciókat állítják le (ezek közül a legfontosabbak az aszkorbinsav és a glutation). Az antioxidáns védekező rendszer harmadik vonala akkor lép működésbe, ha a károsodás már megtörtént, és feladata a már kialakult sérülések eltávolítása vagy a hibás részek kijavítása (pl.: DNS-repair enzimek, hősokk fehérjék, chaperonok).

a, antioxidáns enzimek:

Az antioxidáns védelem első szintjét az antioxidáns enzimek képviselik, melyek segítik a gyök-kioltó reakciókat vagy maguk is képesek a ROS semlegesítésére.

Ezen enzimek közé tartozik a szuperoxid diszmutáz (SOD), a kataláz, a glutation peroxidáz, a glutation S-transzferáz, tioredoxin és a peroxiredoxinok (Soloviev és mtsai, 2003; Amacher, 2006; Lipinski, 2011).

A **SOD** a szuperoxid aniont hidrogén peroxiddá és molekuláris oxigénné alakítja (McCord és Fridovich, 1969). Az emberi szervezetben 3 formája ismert: SOD1 a citoplazmában, SOD2 a mitokondriumban és az extracelluláris EC-SOD.

A **kataláz** a hidrogén-peroxid lebomlás fő szabályozója, segítségével a hidrogén-peroxid vízzé és molekuláris oxigénné alakul.

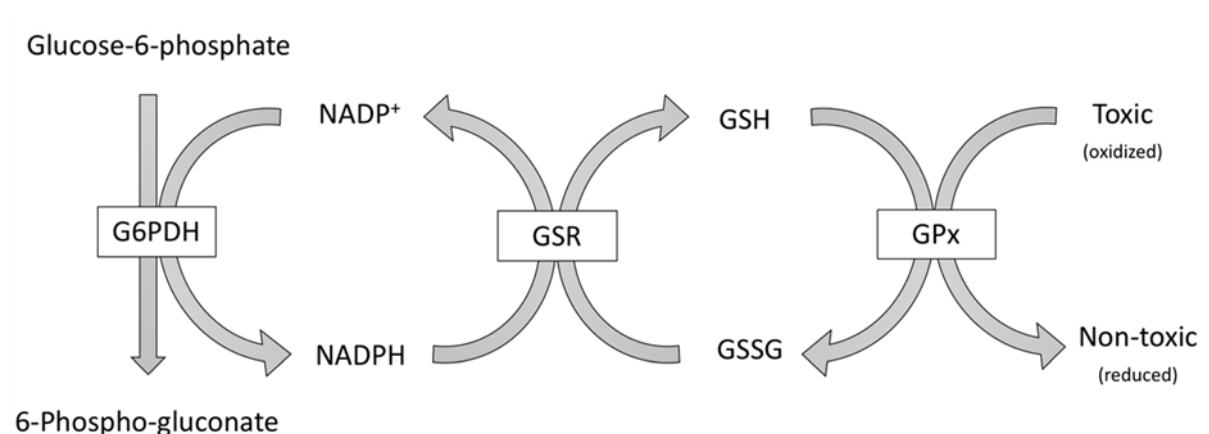
b, nem enzimatis antioxiánsok:

Számos nem enzimatis antioxiáns is részt vesz a reaktív intermedierek megkötésében, eliminálásában, ezek a már beindult szabadgyökös láncreakciókat állítják le. A kis molekulású antioxiánsok közül a legfontosabbak az aszkorbinsav (C-vitamin), alfa-tokoferol (E-vitamin), a béta-karotin, a flavonoidok és a szelén.

Külön kiemelendő nem enzimatis antioxiáns a **glutation** (GSH), egy glicinből, ciszteinből és glutaminsavból álló tripeptid, ami szinte minden sejtípusban megtalálható a szervezetben. Fontos feladata a sejtalkotók védelme a reaktív oxidáló molekuláktól, amilyenek a szabad gyökök és a hidrogén-peroxid.

Két glutation (az oxidált fehérje-cisztein diszulfidkötéseket redukálva, annak elektront átadva) oxidáció révén diszulfid-hidat alkot, glutation-diszulfid (GSSG)-ot képez. Az oxidált glutationt a glutation-reduktáz enzim alakítja vissza redukált formává. A folyamathoz az elektront a NADPH adja. (Az intracelluláris NADPH a NADP⁺ redukciójából képződik glükóz-6-foszfát dehidrogenáz hatására, ami így szintén antioxiáns enzimnek számít.)

A GSH (redukált glutation):GSSG (oxidált glutation) arány a humán sejtekben normálisan 500:1, a redukált és oxidált forma aránya az adott rendszer oxidatív stressz terhelésének mérésére alkalmazott módszer, így a GSH a redox egyensúly felborulásának fontos biomarkere. A GSH antioxiáns hatását a glutation peroxidáz (GPx) aktivációján keresztül is kifejti, amely enzim a hidrogén-peroxidot vízzé, a lipid hidroperoxidokat a megfelelő alkoholformává redukálja, így a membrán lipideket megvédi az oxidatív károsodástól (2. ábra).



2. ábra: Glutation körforgása: G6PDH: Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, GPx: glutation peroxidáz, GSH: glutation, GSR: glutation-diszulfid reduktáz, GSSG: glutation diszulfid (Franco és mtsai, 2019)

1.1.4. Oxidatív stressz biológiai hatásai

Az antioxidáns - prooxidáns egyensúly fenntartása az egészség megőrzésének, a betegségek megelőzésének fontos eszköze.

Az oxidatív stressznek nevezett állapotban az oxidánsok (reaktív oxigén származékok) keletkezése és azok lebontásának egyensúlya (az antioxidáns rendszeren keresztül) megbomlik, és az egyensúly eltolódik a redox állapotból az oxidáció (reaktív molekulák, szabadgyökök) irányába. A ROS, NOS kontrollálatlan keletkezése vagy az antioxidáns rendszer működésének csökkenése esetén a reaktív molekulák egy része kiszabadul az antioxidáns rendszer hatása alól, ezáltal károsítva az egyes szervek, szövetek biomolekuláit, a nukleinsavakat, fehérjéket és lipideket. Ma már szinte nincs olyan betegség, állapot, amelynek patomechanizmusában a szabadgyökök károsító hatását ne mutatták volna ki. Kiemelendők ezek közül az arteriosclerosis (Harrison és mtsai, 2003), ischaemia/reperfúzió okozta károsodás (Marczin és mtsai, 2003), tüdő-és szívbetegségek (Kirkham és Barnes, 2013; Valavanidis és mtsai 2013; Valaei és mtsai, 2021; Neri és mtsai, 2015), gyulladásos-, mozgásszervi- és neurodegeneratív kórképek (Reuter és mtsai, 2010; García és mtsai, 2017; da Fonseca és mtsai, 2019; Islam, 2017; Radi és mtsai, 2014; Koutsaliaris és mtsai, 2022), daganatok (Jelic és mtsai, 2021; Gorrini és mtsai, 2013; Reuter és mtsai, 2010), autoimmun betegségek (Sukkar és Rossi, 2004; Khaitan és Sindhuja, 2022; Duarte-Delgado és mtsai 2022; Zhang és mtsai, 2020; Wójcik és mtsai, 2021), diabetes (Luc és mtsai, 2019; Darenskaya és mtsai, 2021; Maritim és mtsai, 2003), vírusreplikáció, HIV (Ivanov és mtsai, 2016), öregedés, öszülés (Kudryavtseva és mtsai, 2016; Cabello-Verrugio és mtsai, 2017; Trüeb, 2021).

A redox diszregulációt számos bőrbetegségben is kimutatták, reaktív oxigén és nitrogén termékek túlprodukciónak (Prie és mtsai, 2015, 2016; Trüeb, 2015; Dobrică és mtsai, 2022; Medovic és mtsai, 2022; Péter és mtsai, 2016; He és mtsai, 2022; Baek és Lee, 2016; Lephart, 2016; Nakai és Tsuruta, 2021).

Az oxidatív stressz hatása a DNS-re

A szabadgyökök károsíthatják magát a DNS szerkezetét, és gátolhatják a replikációt is (Finkel és Holbrook, 2000; Sies és mtsai, 2017). A DNS szerkezetében a következő károsodások jöhetnek létre: egyes vagy dupla szálú DNS törések, báziskárosodások, mutációk, deléciók, transzlokációk, fehérjékkel történő keresztkötések. Oxidatív károsodás hatására kóros metiláció is létrejöhet, mely DNS-metiláció befolyásolja a DNS repairt, szerepet játszik a kromatinszerkezet és a transzkripció szabályozásában, a rekombinációban, a replikációban, az

X-kromoszóma inaktivációjában, a transzpozonok szabályozásában és az imprinting jelenség létrehozásában (Szigeti és mtsai 2018).

A DNS guanin-citozinban gazdag transzkripciósfaktort kötő konszenzus szekvenciái nagyon érzékenyek az oxidatív behatásra. Az oxidatív stressz okozta leggyakoribb DNS károsodás a 8-hidroxiguanin képződés, ami a karcinogenezis biomarkereként is ismert (Valavanidis és mtsai, 2009).

Az oxidatív stressz hatása a lipidekre

A ROS lipidekre gyakorolt legfontosabb hatása a lipidperoxidáció, mely során egy elektron (H^+) elvétele történik a többszörösen telítetlen zsírsavakról és a lipoprotein oldalláncokról, a lipidmolekula szabadgyök állapotba kerül, ezáltal képes reakcióba lépni az oxigénnel és peroxiszabadgyök keletkezik. A membránlipidek, sejtmembrán megbontásával az ahhoz kötött enzimek és receptorok inaktiválódhatnak, mitokondrium membrán károsodás során az ATP termelő folyamatok sérülnek. A keletkezett lipid gyök igen reaktív, más lipid gyökök forrása lehet, emellett telítetlen zsírsavakkal reagálva lipidperoxidokat vagy ciklikus szerkezetű peroxidokat (izoprosztánok) képez. A lipidgyökök és az oxigén reakciójából peroxil gyök keletkezik, mely láncreakciót indít be, mely során lipid hidroperoxidok képződnek. A lipid hidroperoxidok instabil vegyületek, szétesésükkor aldehidek (malondialdehid (MDA), akrolein, 4-hidroxinonenal, 4-oxononenal) keletkeznek. Ezek közül a MDA a legismertebb biológiai marker (Del Rio D és mtsai, 2005) A reaktív aldehidek keresztkötések létrehozásával számos sejtfehérjét inaktiválhatnak (Gutteridge 1995). A lipidperoxidáció során keletkező lipidperoxidok, aldehidek nem szabadgyökök, mégis kisfokban reaktívak és relatív stabilitásuk révén a keringési rendszeren keresztül eljuthatnak a keletkezéstől távol eső szövetekhez is, így ott is súlyos károsodásokat okozhatnak (Gaschler és Stockwell, 2017).

Az oxidatív stressz hatása a fehérjékre

A ROS a fehérjék szerkezetének megbontásával, keresztkötések kialakításával, a proteolízis fokozásával a fehérjék funkcióvesztését okozhatja, így sérülhetnek enzimek, receptorok és számos létfontosságú biokémiai folyamatban résztvevő molekulák is (Wang és mtsai, 2016).

A ROS legtöbbször a fehérjék cisztein, metionon és tirozin oldalláncait oxidálja, a keletkezett karbonilok az oxidatív stressz jól ismert biomarkerei (Frijhoff és mtsai, 2015).

Az oxidatív stressz kimutatása

A szabadgyökök *in vitro* direkt vizsgálata a szövetekben, sejtekben és testfolyadékokban igen rövid féléletidejük miatt nehézkes és igen költséges (elektron spin rezonancia, kemilumineszcencia), ezért rutin célból inkább a szabadgyökökkel történő reakció során átalakult stabilabb molekulák, megváltozott szerkezetű fehérjék, lipidek, DNS, vagy stabil metabolitjaik (nitrát, nitrit) kimutatása történik.

Az oxidatív stresszt ezek mellett vizsgálhatjuk az antioxidáns rendszer elemeinek kimutatásával, mérésével is (Zweier és mtsai, 1987; Dalle-Donne és mtsai, 2006).

1.1.5. Reaktív intermedierek, oxidatív stressz szerepe a bőrben

A legtöbb bőrben megtalálható sejtípus képes NO termelésére. Lipopoliszacharid vagy gyulladásos citokin stimulus hatására iNOS expressziót tudtak kimutatni a keratinocitákban, Langerhans sejtekben, dermális fibroblasztokban és a melanocitákban (Arany és mtsai, 1996; Qureshi és mtsai, 1996; Wang és mtsai, 1996; Rocha és mtsai, 2001). Fokozott iNOS expressziót mutattak ki szisztémás sclerosisban a fibroblastokban és az endothel sejtekben is (Cotton és mtsai, 1999; Yamamoto és mtsai, 1998; Karbach és mtsai, 2014).

A NO jelenlétét számos bőrbetegségben, pl. psoriasisos plakokban is leírták (Morhenn és mtsai, 1997). Pszoriázisban az oxidatív stresszt, mint befolyásoló tényezőt említik (Dobrică és mtsai, 2022).

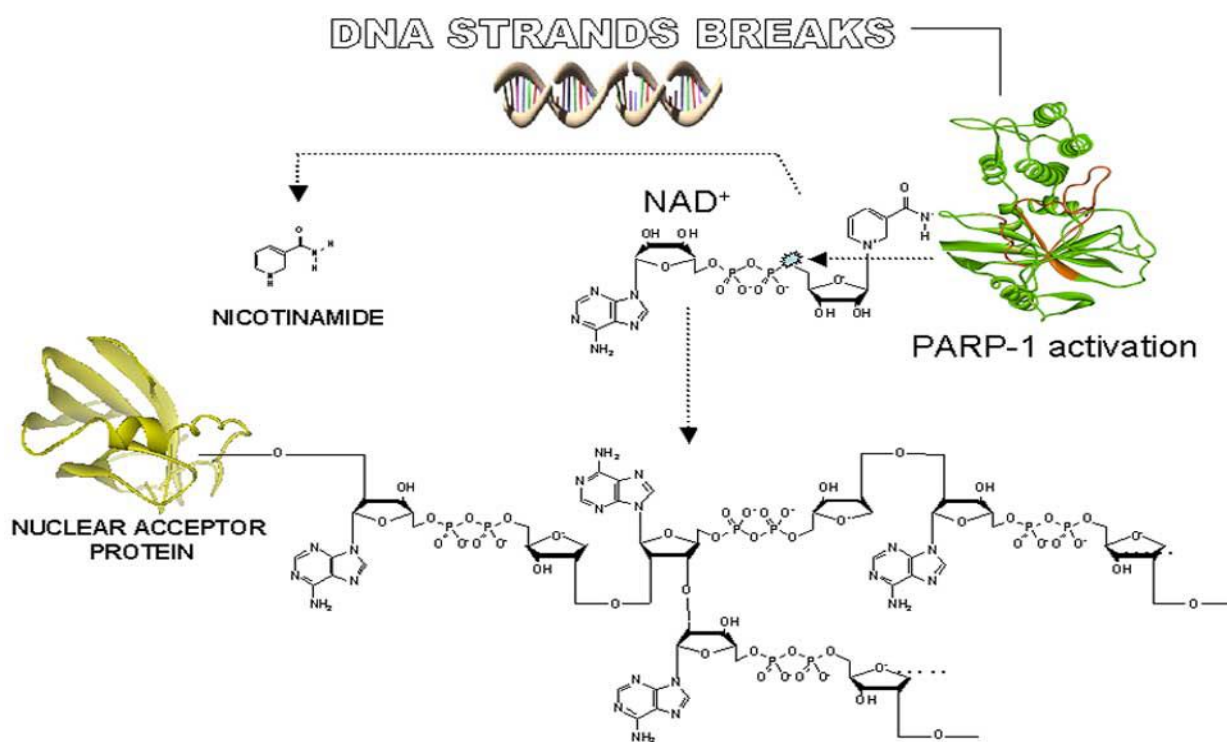
A reaktív oxigén és nitrogén intermediereknek (nitrogén monoxid, peroinitrit) szerepét írták le mustárnitrogén által kiváltott citotoxicitásban (Korkmaz és mtsai, 2006).

Kontakt hiperszenzitivitás állatmodelljében is leírtak kifejezett tirozin nitrációt az epidermisben, legnagyobb intenzitást a gyulladásos gócok környezetében mérték (Szabó és mtsai, 2001).

Antioxidánsok szerepét is kimutatták pszoriázisszerű betegségekben (Yangmeng Zhao és mtsai 2022). Redox alapú terápiát számos betegség modelljében alkalmaztak (Buglak és mtsai 2018; Babbush és mtsai, 2020).

1.2.1. Poli-ADP-riboziláció fogalma

Mára már a legtöbb betegségben jól ismert a reaktív oxigén és nitrogén tartalmú intermedierek pathogenetikai szerepe. A ROS/RNS indukálta szövetkárosodási útvonal egy késői lépése a poli(ADP-ribóz) (PAR) metabolizmus fokozódása (Heller és mtsai, 1995), mely így klinikai beavatkozásra alkalmas széles terápiás ablakot biztosít. A poli-ADP-riboziláció egy összetett regulációs mechanizmus. A poli-ADP-riboziláció során a poli(ADP-ribóz) polimerázok (PARP) a NAD^+ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítják, majd ezekből hosszú, elágazó (ADP-ribóz) $_n$ polimereket szintetizálnak megfelelő akceptor fehérjék glutamát oldalláncához kapcsolva. Az adapter fehérje lehet maga a PARP-1, ezt a folyamatot auto-poli-ADP-ribozilációnak nevezzük. Amennyiben az akceptor más fehérje, akkor transz-poli-ADP-ribozilációról beszélünk.



3. ábra: a PARP-1 szerepe: a poli-ADP-riboziláció során a poli(ADP-ribóz) polimerázok (PARP) a NAD^+ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítják, majd ezekből hosszú, elágazó (ADP-ribóz) $_n$ polimereket szintetizálnak megfelelő akceptor fehérjék glutamát oldalláncához kapcsolva. (Cepeda és mtsai, 2006)

1.2.2. Poli-ADP-riboziláció biológiai szerepe

Miután a PARP-1 nagy mennyiségben megtalálható a sejtmagban, DNS károsodás hatására azonnal, nagy mennyiségben tud aktiválódni (3. ábra). A PARP-1 elsődleges feladata a genom integritásának fenntartása, ezáltal a genomban tárolt információk károsodás nélküli megőrzése és utódsejtekbe való átadása, a DNS károsodások kijavítása (Bürkle, 2001; De Vos és mtsai, 2012; Durkacz és mtsai, 1980; Kraus és Hottiger, 2013; Schreiber és mtsai, 2002; Masson és mtsai, 1995; Ziegler és Oei, 2001).

Fiziológiás állapotokban a poli-ADP-riboziláció, illetve a PARP-1 más fehérjékkel való interakciója befolyásolja a kromatin szerkezetet, szerepet játszik a DNS repairben, a genom organizációban és a genom stabilitás megőrzésében, a replikáció, transzkripció, proliferáció, differenciálódás, az anyagcsere és a sejthalál szabályozásában is.

A PARP1-nek szerepe van a DNS hibajavításban, erre utal az a megfigyelés, hogy kapcsolatban áll olyan fehérjékkel, melyek a bázis kihalásos hibajavítás (BER) fontos szereplői (pl. DNS polimeráz béta, XRCC1) (Virág és mtsai, 2002). PARP gátlása során károsodik a bázis kivágásos hibajavítás (base excision repair - BER), melynek feladata a mutagén bázisok kivágása és cseréje. A BER-nek két útvonla ismert, a short patch repair (egy bázispár cseréje történik) és a long patch repair (több egymást követő nukleotid cseréje történik). PARP-1^{-/-} knockout egereken a long patch és a short patch repair is csökken, így fokozódik a sejtek érzékenysége a DNS károsító hatásokra, így pl. az UV sugárzásra (Dantzer és mtsai, 2000).

DNS károsodás nélkül az enzim alternatív funkciói, mint a transzkripció szabályozása (de Murcia és mtsai, 1986; Lindahl és mtsai, 1995), kromatinfelépítés, replikáció, telomer fenntartás (telomer elongáció elősegítése), NFκB koaktiváció kerülnek előtérbe (Hassa és mtsai, 2001; Chang és Alvarez-Gonzalez, 2001).

A PARP-1 *transzkripciós szabályozó* működésében a hisztonok poli-ADP-ribozilációja révén fellazul a kromatin, így a gének elérhetővé válnak a transzkripciós apparátus számára. A kromatin fellazításával a DNS hibajavítást is elősegíti (Bergeron és mtsai, 1997; Boulikas, 1990; Nagele, 1995; Oliver és mtsai, 1999; Panzeter és mtsai, 1992; Tanuma és mtsai, 1985). A PARP transzkripció szabályozásában betöltött szerepét támasztja alá az a megfigyelés, hogy a PARP-1^{-/-} fibroblasztok csökkent iNOS expresszióval válaszoltak lipopoliszacharid és IFN-gamma stimulusra mind protein, mind mRNS szinten. A PARP transzkripciós faktorok koaktivátora is, kimutatták az AP-2, az Oct-1 és a B-MYB-el történő asszociációját (Cervellera és Sala, 2000). A PARP-1-nek az NFκB mediálta transzkripció elősegítésével központi szerepe

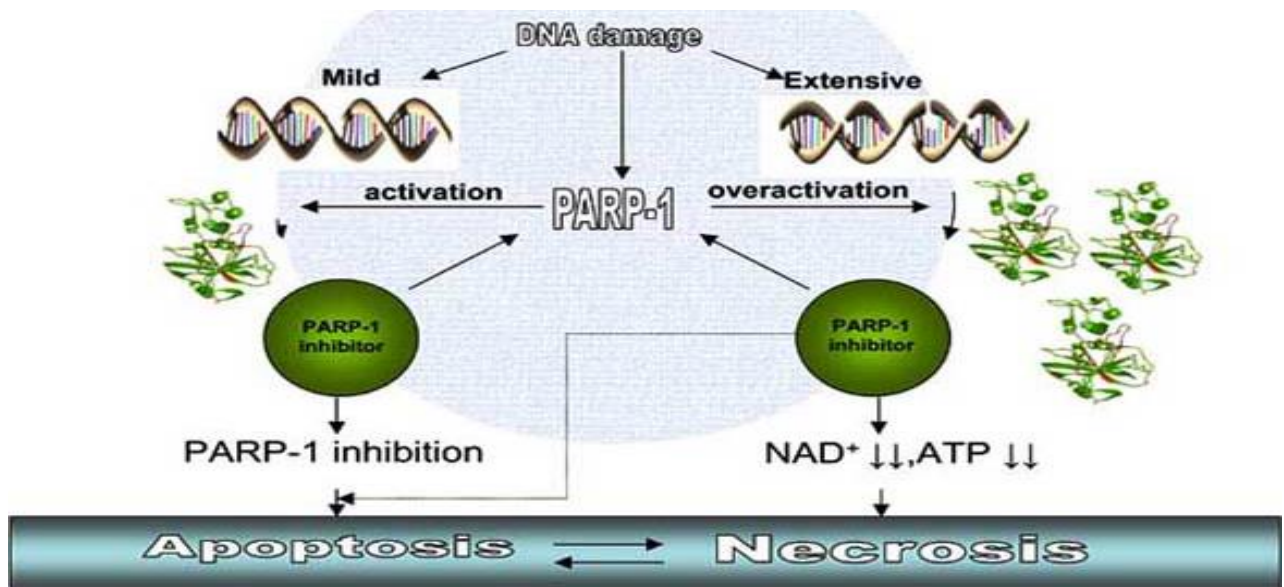
van a gyulladásos citokinek, kemokinek, adhéziós molekulák (pl. ICAM-1), gyulladásos mediátorok, iNOS és az MHC II hisztokompatibilitási antigének expressziójában (Oliver és mtsai, 1999).

A PARP enzimnek szerepe van ezeken kívül a *sejtproliferációban és a differenciálódásban* is. Az osztódó sejtek magjában fokozódik a PARP metabolizmus (Tanuma és mtsai, 1978; Kanai és mtsai, 1981; Leduc és mtsai, 1988; Bakondi és mtsai, 2002; Virág és mtsai, 2002), és az MRC (multiprotein replikációs komplex) felépítésében résztvevő molekulák (DNS polimeráz, topoizomeráz I, II és a PCNA) poli-ADP-ribosilálódnak (Simbulan-Rosenthal és mtsai, 1996; Dantzer és mtsai, 1998). A PARP differenciációban betöltött szerepét írták le melanoma sejtekben és a vérképző rendszer sejtjeiben (Chan és mtsai, 2021).

A PARP-1 szerepét a *sejthalál* folyamatában Berger és munkacsoportja írta le, az általuk megfogalmazott sejtöngyilkossági hipotézis szerint a DNS károsító hatások miatt létrejövő intenzív PARP aktiváció kimeríti a sejtek NAD⁺ készletét, ami miatt ATP deplécio és sejthalál következik be. A *PARP aktiváció* hatására létrejövő sejthalál **nekrózis** formájában zajlik, mely során a plazmamembrán integritása megszűnik, a sejt tartalma a környezetbe szivárog, ezáltal gyulladás keletkezik. A PARP gátlás gyulladásos és reperfüzió okozta szövetkárosodásban megfigyelt védő hatása azzal magyarázható, hogy kiiktatja a PARP aktiváció nekrozist okozó, illetve gyulladásos mediátorok expresszióját fokozó hatását.

A PARP **apoptózis**ban betöltött szerepére utal, a kaszpázokkal (az apoptózis fő végrehajtó enzimei) való kapcsolata. A kaszpáz 7 vagy 3 a PARP-1-et hasítja, ezáltal a PARP-1 inaktiválódik, így az apoptózis későbbi szakaszában létrejövő DNS fragmentáció PARP aktiváló hatása nem jön létre, így a sejtek megőrzik energiájukat az apoptózis energiaigényes lépéseihez (4. ábra). Apoptózis során gyulladás nem indukálódik, mivel a plazmamembrán integritása megmarad, az apoptotikus sejteket a makrofágok fagocitálják.

A poli-ADP-ribóz metabolizmust gátló beavatkozásokkal, a PARP enzim gátlásával (pl. nikotinamid, benzamid, 3-aminobenzamid), illetve PARP gén hiányos állatmodellek vizsgálatával (de Murcia és mtsai, 1997; Shieh, 1998; Heller és mtsai, 1995) kimutatták, hogy a PARP túlműködése számos oxidatív stressz mediálta kórfolyamatban vesz részt (amint azt korábban említettük), így PARP gátlók alkalmazásával kiváló terápiás eredmények érhetők el. (Chen, 2011; Yi és mtsai, 2019; Slade 2020).



4. ábra: PARP-1 szerepe a sejthalálban (Cepeda és mtsai, 2006). Kiterjedt DNS károsító hatás PARP aktivációt indukál, A PARP gátlása a necrosistól az apoptózis irányába tolja el a sejthalál folyamatát.

1.2.3. A PAR polimerek metabolizmusa

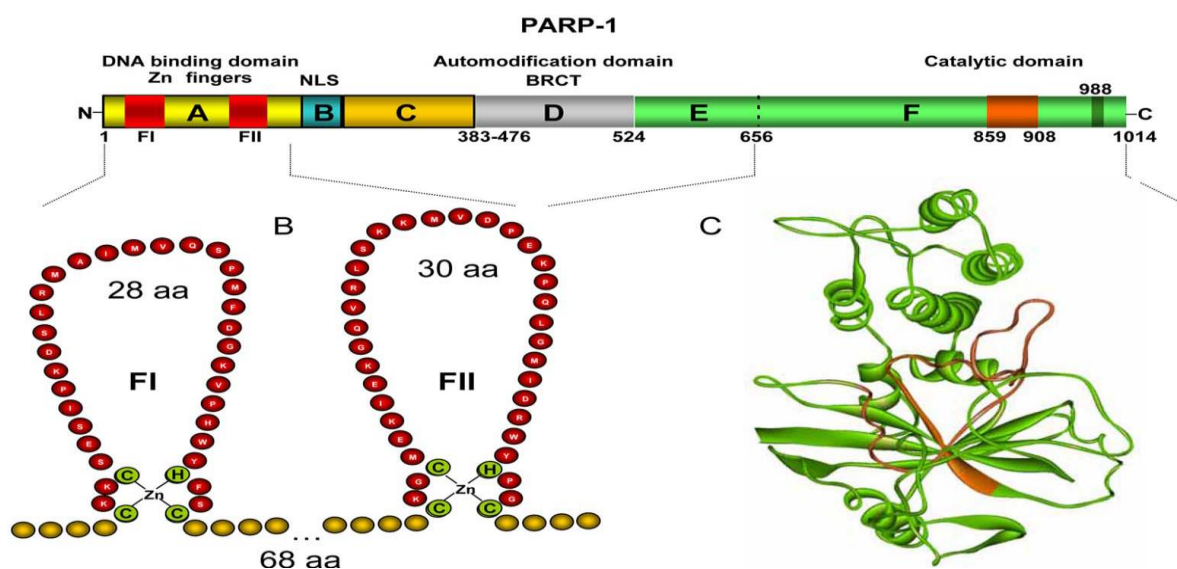
a, a PAR polimerek felépítése: a PARP-1

A PARP enzimesaládnak jelenleg 17 tagja ismert, melyből csak három rendelkezik igazi poli-ADP-ribozil transzferáz aktivitással, a többi enzim mono ADP-ribozil transzferázként működik, vagy aktivitásuk kevésbé jellemzett (Ame és mtsai, 2004; Virág és Szabó, 2002). A különböző PARP molekulák eltérnek sejten (sejtmag és mitokondrium) és szöveten belüli elhelyezkedésükben, domén szerkezetükben és DNS-kötő képességükben. A sejtek PARP aktivitásának 85-95%-át a PARP-1 adja, mely egy 116 kDa méretű, folyamatosan expresszálódó nagyon konzervatív magfehérje, mely multifunkcionális szabályozó enzimként biológiai folyamatokat szabályoz. Szerkezete három fő doménből áll: az N-terminális DNS kötő domén, a középső automodifikációs domén és a C-terminális katalitikus domén (5. ábra). Az N-terminális doménen lévő nagy affinitású cinkujjakkal kapcsolódik az enzim az egyes vagy duplaszálú DNS töréshez. A ROS/RNS, az ionizáló sugárzás és az alkiláló szerek DNS törések létrehozásával stimulálják a PARP aktivációt. Ma már tudjuk, hogy DNS károsodás hiányában

is aktiválódhat a PARP enzim. Így a kereszt, hajtű, stb. alakú DNS-ek (Lonskaya és mtsai, 2005), a partner fehérjékhez való kapcsolódás és a PARP foszforilációja vagy acetilációja is fokozhatja az enzim működését (Cohen-Armon és mtsai, 2007).

Az *automodifikációs domén* az auto-poli-ADP-ribóziláció akceptor helyeként működik (Mazen és mtsai 1989; de Murcia és Menissier de Murcia, 1994; de Murcia és mtsai, 1983, 1986, 1994; Smith, 2001). A PARP aktiváció megmutatkozhat auto-PAR-ilációban is, mikor maga a PARP-1 a szubsztrát, ilyenkor a PARP-1 leválik a károsodott DNS-ről és így gátlódik az enzimaktivitása. A PARP enzim működését gátló folyamatok közül a legjelentősebb az auto-PAR-iláció (Kawaichi és mtsai, 1981). Ezek mellett kiemelendők még a purinok (melyek ischaemia következtében szaporodnak fel), (Virág és Szabó, 2001) a nikotinamid (mint hasítási termék), a protein kináz C (foszforilálással gátolja a PARP enzimet) (Tanaka és mtsai, 1987; Bauer és mtsai, 1992, 1994).

A *C-terminális katalitikus domén*hez kötődik a NAD⁺. Az aktivált PARP a NAD⁺-ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja, majd poli-ADP-ribózt polimerizál a sejtmagban lévő fehérjékre, hisztonokra, transzkripció faktorokra, DNS javító enzimekre, és magára a PARP enzimre is (Virág and Szabó, 2002). A PAR a fehérjék glutamát oldalláncaihoz kapcsolódva azoknak negatív töltést kölcsönöz, megváltoztatva ezáltal azok fiziko-kémiai tulajdonságait, pl. a hisztonokhoz kötődve a polimer által kölcsönzött negatív töltés következtében taszítják a DNS-t, leválnak róla, így lazítva a kromatin szerkezetét.



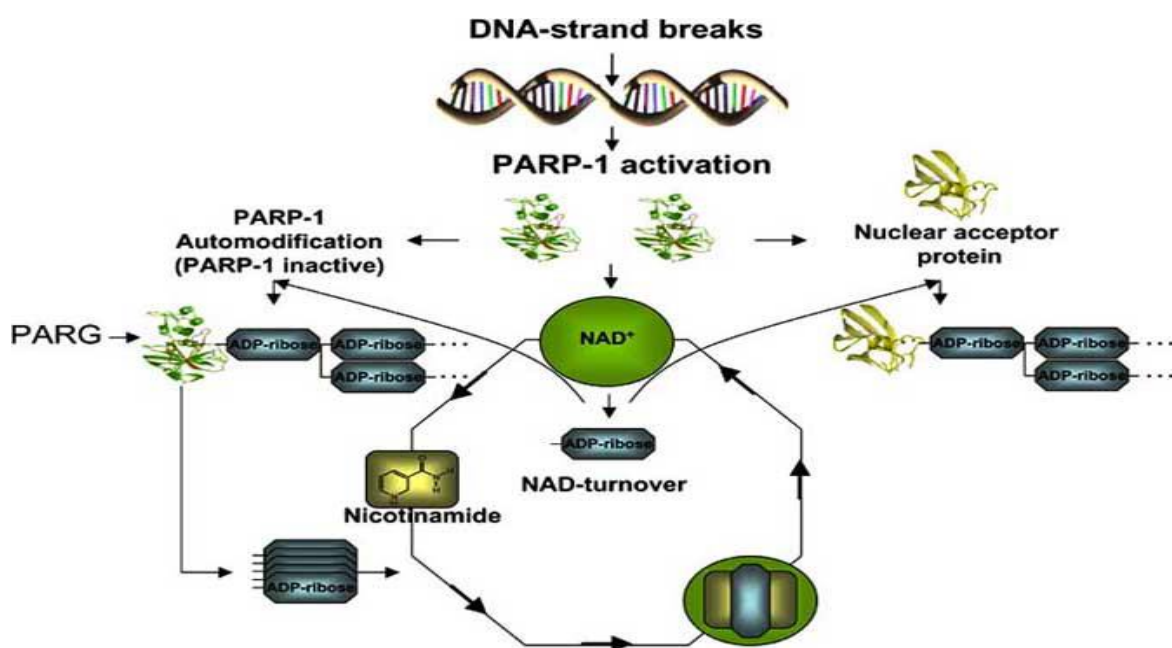
5. ábra. A PARP-1 doménszerkezetének vázlata (Cepeda és mtsai, 2006)

b, a PAR polimerek lebontása

A poli-ADP-riboziláció, a PAR polimerek szintetizálása és lebontása egy dinamikus, összehangolt folyamat, a polimer gyorsan lebontódik, féléletideje kevesebb mint néhány perc (6. ábra). A PAR polimerek lebontását a poli-(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) (Miwa és Sugimura, 1971; Miwa és mtsai, 1974) és az ADP-ribozil-hidroláz (ARH) végzi (Oka és mtsai, 1984).

A PARG először endoglikozidázként a poli-ADP-ribóz polimerek nagyobb oligo(ADP-ribóz) egységeit távolítja el, majd exoglikozidáz aktivitása révén a terminális ADP-ribóz egységeket hidrolizálja (Brochu és mtsai, 1994; Davidovic és mtsai, 2001; Hatekayama és mtsai, 1986). A PARG csak kis mennyiségben található a sejtekben, de kompenzatorikusan magas specifikus aktivitással rendelkezik. Gátlására *in vivo* tannin származékokat használnak.

Az ADP ribozil protein liáz a fehérjékhez közvetlenül kapcsolódó proximális ADP-ribózt távolítja el.



6. ábra: A PAR polimerek szintetizálása és lebontása: a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) újraaktiválja a PARP-1-et és így lehetővé teszi a NAD⁺ körforgását (Cepeda és mtsai, 2006)

1.2.4. Poli-ADP-ribóziláció a bőrben

Számos közlemény bizonyítja, hogy PARP aktiváció jelen van különféle kórélettani állapotban, pl. gyulladásos betegségekben, ischaemia-reperfúzió során, sokkban és diabéteszes angiopátiában. Ezen betegségek állatmodelljeiben a PARP gátlással javulás érhető el mind a klinikai tünetekben mind a labor paraméterekre vonatkozóan (Virág és Szabó, 2002; Liu S és mtsai, 2022; Kim és mtsai, 2021).

Elsőként Hinshaw és mtsai bizonyították, hogy a bőrben is történik PARP aktiváció kénmustár (egy citotoxikus, DNS károsító anyag) hatására (Hinshaw és mtsai, 1999). 2002-ben Farkas és mtsai PARP aktiváció szerepét írták le UV expozíció által kiváltott égésben (Farkas és mtsai, 2002).

Szabó és munkacsoportja 2001-ben HaCaT sejteken vizsgálta a peroxinitrit citotoxikus hatását. Vizsgálatuk eredménye szerint a peroxinitrit apoptózist indukál, amire kaszpáz aktiváció és DNS fragmentáció jellemző, továbbá megállapították, hogy nagy koncentrációjú peroxinitrit nekrozist hoz létre, továbbá a peroxinitrit PARP aktivációt indukál HaCaT sejtekben (Szabó és mtsai, 2001).

A PAR jelenlétét bőrtumorokban is vizsgálták. A PAR melanomában történő jelenlétét magyarázza az a tény, hogy a mitotikus sejtekben nagyobb a PARP aktivitás (Bakondi és mtsai, 2002). A tumorsejtekben lévő fokozott oxidatív stressz (Sander és mtsai, 2003), illetve a tumorsejtek hypoxiája is okozhat PARP aktivációt, amit a tumor körüli erek intenzív PAR festése jelez. A fokozott de novo angiogenesis során a VEGF és HIF-1 transzkripciójához PARP-1 aktiváció szükséges (Obrosova és mtsai, 2004). Szabó és munkatársai bizonyították, hogy a tumorigenezishez szükséges matrix metalloproteinázok (MMP-k), adhézis molekulák, gyulladásos mediátorok termelődéséhez PARP-1 szükséges (Szabó és mtsai, 2001). A PAR kimutatásának jelentőségét az adja, hogy a PAR metabolizmus fontos target lehet a melanoma malignum adjuváns kezelése során (Tentori, 2003; Plummer, 2008). Munkacsoportunk PAR jelenlétét tudta kimutatni melanoma malignumban is. A különböző klinikai típusú és stádiumú melanomából származó melanoma sejtek PAR pozitívak voltak, és a pozitivitás intenzitása korrelált a tumor inváziós mélységével (Clark stádium) és vastagságával (Breslow index) (Géhl és mtsai, 2012). Mivel különböző tumorokban már engedélyezett PARP gátlószereket használnak, ezért a PAR tartalom meghatározása segítséget nyújthat a PARP gátlókkal végzendő daganatellenes terápia hatékonyságának előrejelzésében.

Szabó É és munkatársai vizsgálták a késői típusú kontakt hiperszenzitivitásban a peroxinitrit-DNS károsodás - PARP aktivációs útvonal jelenlétét. A PARP gátló PJ34 és a PARP-1 genetikai "kiütése" (PARP-1 knockout egerekben) jelentősen csökkentette a hiperszenzitivitási reakcióban a gyulladás mértékét, aminek hátterében a gyulladásos mediátorok expressziójának gátlása, csökkent gyulladásos sejtes infiltráció és csökkent oxidatív stressz áll (Brunyánszki és mtsai, 2010)

Hassa és munkatársai vizsgálatában a PARP gátlása és genetikai inaktiválása nagyon hasonló eredményt hozott annak ellenére, hogy a PARP-1 NF κ B koaktivátor funkciójához nem szükséges a PARP enzimaktivitása (Hassa és mtsai, 2001).

Virág és munkacsoportja vizsgálta a PARiláció szerepét UV-fény keratinocitákra kifejtett hatásában. UVB toxikus hatását a specifikus PARP gátlószer PJ34 nem befolyásolta jelentősen, míg az UVA esetén érzékenyítette a sejteket a fototoxicitással szemben. Ennek valószínűleg az a magyarázata, hogy míg az UVB által okozott DNS hibákat a NER (nukleotid excisiós repair) javítja, amiben a PARP-1 szerepe nem domináns, addig az UVA által kiváltott döntően oxidatív DNS károsodások kijavítása a PARP-1 függő BER (bázis excisiós repair) feladata. A gyenge és nem specifikus inhibitor 3-aminobenzamid erős védő hatást fejtett ki, valószínűleg PARP gátlástól független mechanizmussal. Ezt bizonyítja az is, hogy más, új generációs PARP gátlószerek, illetve a PARP-1 csendesítése sem nyújtottak védelmet az UVA és UVB által kiváltott citotoxicitással szemben (Lakatos és mtsai, 2016).

1.3.1. Sebgyógyulás folyamata fiziológiás állapotban, akut sebek

A WHO szerint a különböző mértékű sérülések felelősek a globális mortalitás 9%-áért, és első vagy második helyre teszik a kórházi felvételekben és a sürgősségi osztályos ellátásban (Moore, 2016)

A legtöbb sérülés bőrsérüléssel is együtt jár. Míg a balesetből származó vagy műtéti bőrsebek jellemzően jól gyógyulnak, addig más típusú bőrgyógyászati sebek, mint például a diabeteses vagy nyomási fekélyek igazi kihívást jelentenek a sikeres sebkezelésben. A nyugati populációban magas a diabetes előfordulása, ezért a diabeteses betegek helyes metabolikus kontrollja a legnagyobb jelentőségű a diabeteses ulcusok megelőzése szempontjából. Megjegyzésként elmondható, hogy a diabeteses betegek 5%-ában fejlődik ki lábszárfekély és 1%-ban lesz szükséges az amputáció. A krónikus sebek (diabeteses láb, krónikus vénás

elégtelenség következtében kialakult ulcus) népbetegségnek tekinthetők, kezelésük nehéz, hosszadalmas és költséges feladat.

A sebgyógyulás egy komplex többfázisú folyamat, amelynek során a bőr és a bőr alatti szövetek sérülés után helyreállnak. A sebgyógyulás szövettanilag jól meghatározott lépésekből áll, de a minden részletre kiterjedő pathomechanizmus, a sejtekben végbemenő szabályozás pontos biokémiai, molekuláris lépései, melyek meghatározzák a normál és patológiás sebgyógyulást, még sok részletében tisztázatlanok.

Ezen komplex regulációs folyamat felborulása a sebgyógyulás elhúzódásához vezethet. A különböző krónikus sebek közös jellemzői a hipoxia, a perzisztáló gyulladás, a bakteriális kolonizáció és a megváltozott stresszválasz.

Normál sebgyógyulás folyamat

Testünk a bőrünkön keresztül érintkezik a külvilággal. Sértetlen bőr esetén az epidermis és a dermis védőgátat képez a külső környezettel szemben. Amikor ez a gát megsérül, a sebgyógyulás során szabályozott biokémiai események sorozata indul el a károsodás helyreállítása érdekében. A sebgyógyulás folyamata szöveti szinten jól leírható, különálló, de részben egymást átfedő fázisokat foglal magába.

A normál sebgyógyulás 6-7 napot vesz igénybe, és a következő négy fázisból áll: haemostasis, gyulladás, proliferáció és remodeling, azaz új szövet, hegszövet képződés (7. ábra).

1. Az első, 1-2 óráig tartó *haemostasis* szakaszban koaguláció és vasokonstrictio történik, melyben a thrombocyták a főszerep, a thrombocyta aktiváció és aggregáció során az aktív vérzés csökken, a seb ideiglenesen lezáródik. A sérülés első néhány percében a bőr traumája kapcsán sérült kollagén és szub-epithelium aktiválja a vérlemezke aggregációt, ami degranulációt, kemokinek és növekedési faktorok felszabadulását eredményezi. Tehát a vérben lévő vérlemezkék elkezdnek kitapadni a sérült helyre. Ez aktiválja a vérlemezkéket, melyek így amorf alakúvá válnak, alkalmasabbak lesznek az alvadásra, és kémiai jeleket bocsátanak ki a véralvadás elősegítésére. Ennek eredményeként a fibrin aktiválódik, amely hálót képez és "ragasztóként" működik a vérlemezkék egymáshoz történő kötéséhez. Ez vérrögzképződést eredményez, amely lelassítja / megakadályozza a további vérzést. A thrombocyták, az érfal sejtjei, illetve a keratinocyták által kiválasztott növekedési faktorok (EGF, TGF alfa, béta, PDGF) indítják be a sebgyógyulás véralvadást követő szakaszát (Rodrigues és mtsai, 2019)

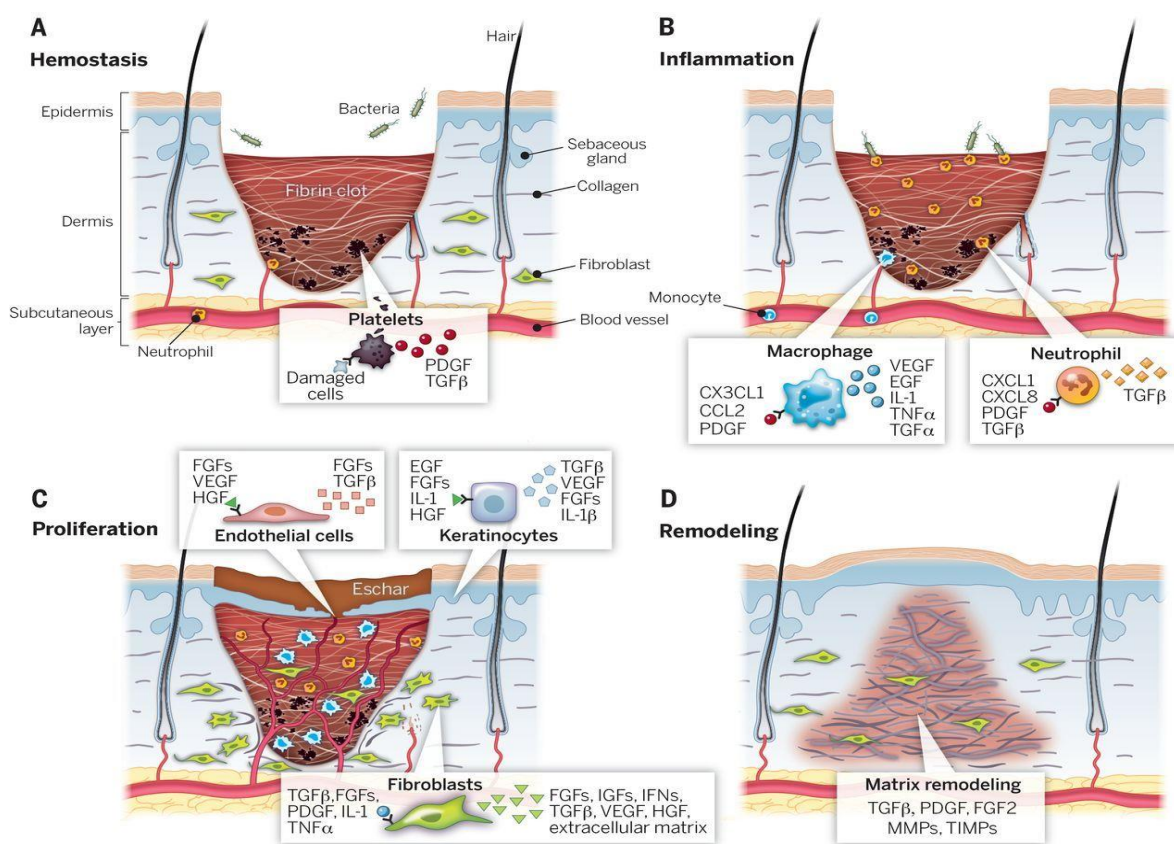
2. A második, 1-3 napig tartó *gyulladásos szakban* különböző immunsejtek hatolnak be a sebbe. Először a keringésből nagyszámú neutrophil granulocita mobilizálódik és érkezik a sérülés helyére, majd a monociták (melyek érett szöveti makrofágokká differenciálódnak) és limfociták mobilizálódnak, aktiválódnak. A neutrophilek, az első sejtek, amelyek megjelennek a sérülés helyén, megtisztítják a törmeléktől és a baktériumoktól a területet, hogy jó környezetet biztosítsanak a sebgyógyuláshoz. A sérülés helyére érkező makrofágok segítik a baktériumok fagocitózisát.

Ezek mellett endothel aktiválódás és vasodilatáció jön létre. A különböző sejtekből felszabadult pro-inflammatorikus citokinek (pl. IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN), növekedési faktorok (PDGF, TGF β), proteolitikus enzimek, ROS/RNS specieszek segítik a baktériumok és szövettörmelékek eltávolítását (Zhao és mtsai 2016; Rodrigues és mtsai, 2019; Reinke és Sorg, 2012).

3. A harmadik fázis, a *granuláció és proliferáció szakasza* a 3. naptól a 3. hétig tart. Ezt a szakaszt sok sejtes elem (fibroblasztok, keratinociták, endothel sejtek) és bőséges kötőszövet felhalmozódása jellemzi. Amíg az immunsejtek aktivitása és a proinflammatorikus citokinek mennyisége csökken, ebben a szakaszban a keratinocyták migrációja indítja el a reepitelizációt. Az új szövetet, amely kezdetben helyettesíti a sérült dermist, granulációs szövetnek nevezzük, mely fibroblastokból, endothelsejtekből és gyulladásos sejtekből áll. A granulációs szövetben proliferálódó fibroblasztok myofibroblastokká differenciálódnak, melyek felelősek a seb összehúzódsáért, valamint új kötőszöveti rostok (kollagén, elasztikus rostok), extracellularis matrix (proteoglikánok), hialuronsav termelésért. Ahhoz hogy az új szövet oxigénhez és tápanyaghoz jusson az endothelsejtek proliferációja, angiogenesis is történik ebben a szakaszban. Ezen felül a nyirokrendszer helyreállítása céljából lymphangiogenesis is zajlik. Sokféle citokin és GF vesz részt ebben a fázisban, mint például a transzformáló növekedési faktor- β család (TGF- β , beleértve a TGF- β 1, TGF- β 2 és TGF- β 3), az interleukin (IL) család és az angiogenesis faktorok (pl. VEGF-vaszkuláris epidermális növekedési faktor) (Darby és Hewitson, 2007; Rodrigues és mtsai, 2019; Reinke és Sorg, 2012).

4. A sebgyógyulás utolsó lépése az *epithelizációs vagy remodelling* fázis, amelyhez pontos egyensúlyra van szükség a meglévő sejtek apoptózisa és az új sejtek termelődése között. Az utolsó fázis a 7. naptól a kb. 6. hétig tart. A keratinociták migrációja, proliferációja és differenciációja révén az epidermalis barrier helyreáll, a seb behámosodik. Az erősen sejtűs

granulációs szövetben az endothel sejtek, myofibroblastok és gyulladásos sejtek apoptózison mennek keresztül. A fibroblast proliferáció leáll, a kollagén szintézis csökken, az extracelluláris matrix bomlik, átalakul, a granulációs szövetre jellemző III. típusú kollagén fokozatosan lebomlik, folyamatosan felváltja az I. típusú kollagén, mely növeli a seb szakítási szilárdságát, bár a normál dermis eredeti szilárdsága sohasem áll helyre. Végül kialakul a végleges heg, melyből hiányoznak a bőrfüggelékek. Ebben a fázisban bármilyen eltérés kóros sebgyógyuláshoz vagy krónikus sebhez vezethet. (Rousselle és mtsai, 2019; Rodrigues és mtsai, 2019; Reinke és Sorg, 2012).



7. ábra: a normál sebgyógyulás fázisai: A: haemostasis, B: gyulladásos, C: proliferációs, D: remodelling szakasz (Sun BK, Sipsrshvili Z, Khavari PA. Science 2014; 346:941)

(PDGF: vérlemezke eredetű növekedési faktor, TGF:transzformáló növekedési faktor, CXCL: kemokin ligand, CCL2:kemokin ligand 2, FGF:fibroblast növekedési faktor, HGF:hepatocita növekedési faktor, EGF:epidermalis növekedési faktor, TNF:tumor nekrosis faktor, IGF:inzulinszerű növekedési faktor, IFNs: interferonok, MMPs: mátrix metalloproteinázok, TIMPs:metalloproteinázok szöveti inhibitorai)

Akut sebek esetén normál sebgyógyulás következik be, ezek a sebzések kevesebb mint 6 hét alatt gyógyulnak. Ilyenek a traumás és műtéti sebek, illetve az égés következtében kialakult sebek. (Wang és mtsai, 2018; Sorg és mtsai, 2017; Broughton és mtsai, 2006).

1.3.2. Kóros, elhúzódó sebgyógyulás, krónikus sebek

A lakosság nagy része szenved sebgyógyulási rendellenességektől, különösen az idős emberek, cukorbeteg, illetve az immunszuppresszív gyógyszerekkel, kemo- vagy sugárterápiával kezelt betegek. Ennek eredményeként krónikus, nem gyógyuló sebek, fekélyek alakulnak ki, melyek általában fájdalmasak és nehezen kezelhetők. A krónikus sebekben a tartós gyulladás miatt daganatok is kialakulhatnak. A károsodott gyógyulási válasz alapjául szolgáló mechanizmusok még ma sem teljesen tisztázottak, de saját kutatásaink mellett a legújabb tanulmányok is erős bizonyítékot szolgáltatnak az oxidatív stressz szerepéről a nem gyógyuló sebek patogenezisében.

Kóros sebgyógyulás

A sebgyógyulás összetett folyamata zavart szenvedhet számos ponton és nem gyógyuló krónikus sebek vagy kóros hegek (pl. hipertrófiás hegek, keloidok) kialakulásához vezethet. Krónikus sebről akkor beszélünk, ha a komplett sebgyógyulás nem történik meg 6 héten belül, ilyenkor általában perzisztáló gyulladás áll fenn, melyet általában perzisztáló granulációs, proliferációs stádium követ. Krónikus sebek esetében az epithelizáció, remodelling is elhúzódó, részleges vagy nem következik be.

Krónikus seb számos ok következtében kialakulhat. Leggyakoribb okok a krónikus vénás betegség, érszűkület, diabeteses ulcus és a nyomás következtében kialakult ulcus (decubitus).

Gyulladás szerepe a sebgyógyulásban

A sebgyógyulást számos tényező befolyásolja, melyek közül jelentős a gyulladásra ható tényezők szerepe, így a prosztaglandinok és gátlói. A prosztaglandinok (PG-k) lipidvegyületek, amelyek számos fiziológiai és kóros folyamatban vesznek részt. A prosztaglandinok közül a PGE₂ a gyulladás fő közvetítője. A ciklooxygenáz (COX) útvonal nélkülözhetetlen az arachidonsav PGH₂-vé történő átalakulásához, mely különféle biológiailag aktív mediátorok prekursora, pl. tromboxán (TXA₂), prosztaglandinok (PGE₂, PGD₂) és prosztaciklin (PGI₂). A COX-ok két típusát azonosították, a COX-1 konstitutívan expresszálódik a különböző szövetekben, és a COX-2-t (indukciós gént), melyet citokinek,

növekedési faktorok, tumorpromoterek és egyéb szerek indukálják. A PGE2-t és a NO-t a gyulladást elősegítő mediátorok (pl. a tumor nekrosis faktor (TNF)- α , lipopoliszacharid és IL-1 β) szabályozzák. Ez az indukált gyulladásos válasz további károsodást vált ki a szomszédos sejtekben és szövetekben, így késlelteti a sebgyógyulási folyamatot. A PGE2 túlzott képződése a gyulladást gyorsító döntő fiziológiai tényező. A prosztaglandin E2 autokrin módon szabályozza a fibroblasztokat, gátolja a fibroblasztok proliferációját, migrációját, a miofibroblasztok differenciálódását és kollagénszintézist, illetve befolyásolja a keratinocita proliferációt, angienezist és a gyulladásos választ.

A PGE2 szintje pozitívan korrelál a sebgyógyulási sebességgel. Toxikus stimulus hatására a bőrben felszabaduló PGE2 helyi ödémát és fájdalomérzetet okoz.

Az aszpirin és a nem szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID-ok) vagy szelektív COX-2 gátlók, amelyek fájdalomcsillapítóként, lázcsillapítóként és gyulladáscsökkentőként ismertek, gátolják a PGE2 termelést, így hatékony fájdalomcsillapítóként hatnak. Az aszpirin és a nem szteroid gyulladásgátlók sebgyógyulásra gyakorolt hatása azonban erősen ellentmondásos, mivel a tudományos irodalom azt sugallja, hogy a COX aszpirin vagy más NSAID-ok általi gátlása káros lehet a normál sebgyógyulási folyamatokra. Az aszpirin a sebgyógyulás első lépését – a vérzéscsillapító/gyulladásos fázist közvetlenül befolyásolja. Az aszpirin nemcsak a vérlemezke-aktiválás (hemosztázis) trombotikus aktivitását befolyásolhatja, hanem számos gyulladást előidéző hatást is gátolhat, beleértve a trombocytákból a mátrix metalloproteinázok (MMP-k) és elasztázok felszabadulását, a P-szelektin felszabadulást, és ezáltal a monociták és neutrophilek toborzását és aktiválását, adhézióját az endotéliumhoz, kemoattraktánsok (monocita kemoattraktáns protein 1) és gyulladást elősegítő citokinek további felszabadulását a gyulladásos sejtekből (pl. IL1 β , IL-6, IL-8) (Zhao és mtsai, 2022).

Nagyon fontos a pro-inflammatorikus és az inflammatorikus utak közötti egyensúly. Az akut sebekben a gyulladásos válasz előnyt jelent a sebgyógyulás korai szakaszában, mint például a törmelék eltávolítása és a kórokozókra adott válasz, de ezeknek a gyulladást elősegítő faktoroknak a krónikus aktivációja és hosszan tartó termelődése valószínűleg folyamatos szövetpusztuláshoz, elhúzódó sebgyógyuláshoz vezet (8. ábra).

Hypertrophias heg és keloid patogenezise

Kóros sebgyógyulás gyakran bőrsérülések következtében alakul ki (pl. traumák, égési sérülések, műtétek, oltások, bőrpiercingek, akne, infekciók). A kóros sebgyógyulás

patogenezise nem teljesen tisztázott, az egyértelmű, hogy egy vagy több fázisa is zavart szenved, jellemző továbbá az elhúzódó gyulladás. Az aberráns sebgyógyulás gyakran a fibroblasztok túlzott működésével és az ECM túlzott felhalmozódásával jár. A kóros sebgyógyulás során kialakuló patológiás hegek két formáját különböztethetjük meg, a keloidokat és a hipertrófiás hegeket. Ogawa a keloidot és a hipertrófiás heget ugyanazon fibroproliferatív betegség egymást követő stádiumának tekinti, eltérő mértékű gyulladással. A keloidot erősen gyulladt kóros folyamatként határozta meg, a hipertrófiás heget pedig egy enyhébb kóros folyamatként írja le, melyet genetikai hajlam befolyásol. Az elhúzódó sebgyógyulás során gyakran pyogén gyulladás is jelen van, melynek során a fibroblasztok fokozott aktivitása, fokozott ECM termelés és akkumuláció jellemző (Ogawa, 2017).

A hipertrófiás heg a bőr felszínéből kiemelkedő heg, mely nem haladja meg az eredeti sebzés határát, idővel általában elhalványul, illetve a környező bőr szintjére laposodik.

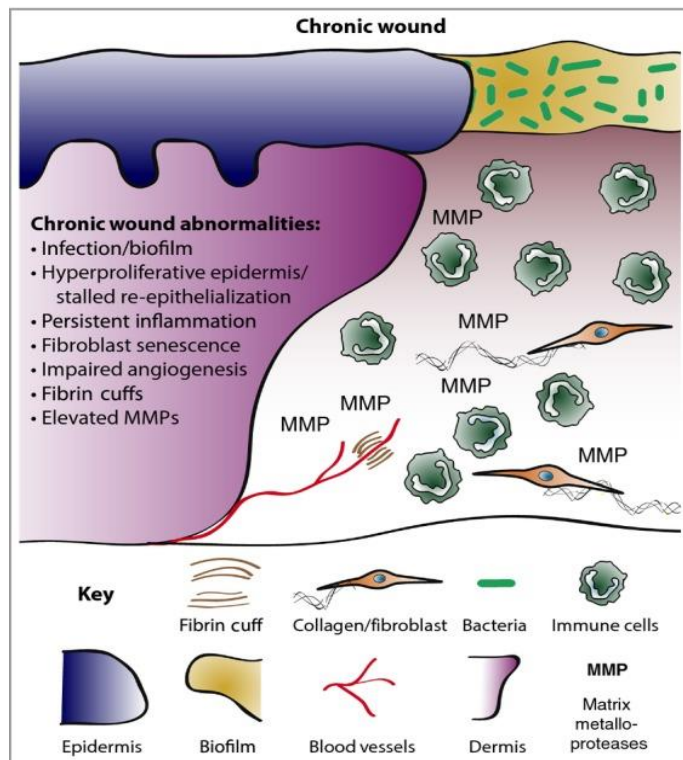
A keloidos heg ezzel szemben az eredeti seb szélein túlnyúlik, erőteljesen kiemelkedik, viszketést és hiperesztéziát okoz. A keloidos heg nem regrediál, és kivágás után hajlamos kiújulni.

A keloidos heg rendezetlen I. és III. típusú kollagént tartalmaz. A hipertrófiás heg főként a bőrfelülettel párhuzamosan elhelyezkedő III. típusú kollagénből áll. Az elasztikus rost tartalom szignifikánsan különbözik a normál és a kóros sebgyógyulásban. A keloidos hegek több elasztikus rostot tartalmaznak a bőr mélyebb rétegeiben, mint a hipertrófiás hegek és a normál bőr. A felületes, papillaris dermisben az elasztikus rosttartalom 51%-kal nagyobb a normál bőrben, mint a keloidoknál, és 37%-kal magasabb, mint a hipertrófiás hegeknél. Ezenkívül mindkét hegtípusban megfigyelhető a fibrillin-1 szignifikáns csökkenése a dermisben, ami a mikrofibrillumok összetételének torzulását, illetve fibrózist okoz (Cohen és mtsai, 2017).

A fokozott kollagénszintézis és a kóros kollagéntartalom, amelyet a mátrixbontó enzimek szabályozási zavara okoz, szintén hozzájárul az elhúzódó sebgyógyuláshoz. A MMP és TIMP fehérjék kombinálva szabályozzák az ECM szintézisét és lebomlását a sérülések helyén, az MMP és TIMP egyensúlyhiánya abnormális sebgyógyulást eredményez (Keskin és mtsai, 2021; Martin és Nunan, 2015).

A sebgyógyulást számos tényező késlelteti, akadályozza, melyek közül a leggyakoribbak a károsodott lokális keringés, a hypoxia, vénás pangás, feszülés a sebszélekben, infekciók,

krónikus gyulladás, táplálkozási problémák, malnutríció, immunszuppresszió vagy a metabolikus diszreguláció, különös tekintettel a diabetesre (Bootun, 2013; Stechmiller, 2010; Martin és Nunan, 2015).



8. ábra: Krónikus sebek

A krónikus sebek gyakran fertőzöttek, és tartósan gyulladást mutatnak. A re-epithelializáció leáll, a keratinociták hiperproliferálnak. Kóros granulációs szövet képződik melyben megemelkedett a mátrix metalloproteázok (MMP-k) szintje, kóros fibrózis van jelen. Károsodott a neoangiogenezis, emellett a fibrin mandzsetta korlátozza a meglévő erek oxigén diffúzióját, így a seb hipoxiássá válik (Martin és Nunan, 2015).

1.3.3. Oxidatív stressz a sebgyógyulásban

Egyre több kutatási eredmény bizonyítja az oxidatív stressz szerepét a sebgyógyulásban.

A sebgyógyulási folyamatot különféle növekedési faktorok, citokinek és hormonok szabályozzák. (Werner és mtsai, 2003; Schäfer és mtsai, 2007). Ezeken kívül a legújabb kutatások bizonyították, hogy a nitrogén-monoxid és a ROS kritikus szabályozói ennek a folyamatnak (Wlaschek és mtsai, 2005; Sen és mtsai, 2008).

A ROS szükséges az infekciók elleni védekezéshez, illetve a ROS alacsony mennyisége nélkülözhetetlen mediátor az intracelluláris jelátvitel számára. Egy nemrégiben végzett tanulmány kimutatta például, hogy alacsony hidrogén-peroxid szint fontos a seb hatékony angiogenezisében (Roy és mtsai, 2006). A ROS sebgyógyulásban betöltött szerepe negatív is lehet, mivel a túl sok ROS nagy reakciókészsége miatt káros (Sen és mtsai, 2008).

Egérkísérletekben igazolták, hogy ha a NADPH oxidáz egyik alapvető alegysége, a $\text{rac}2$ hiányzik, akkor ez károsodott sebgyógyulást eredményez (Ojha és mtsai, 2008). Ezek az eredmények is azt sugallják, hogy a normál sebekben keletkező alacsony ROS szint fontos a sebgyógyulási folyamatokban.

A legtöbb vizsgálatban a sebekben lévő ROS szintet közvetett módon, a lipidek, fehérjék vagy a DNS oxidációs termékeinek elemzése révén határozzák meg. A lipidperoxidáció fő termékei a 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), a malondialdehid (MDA) és az izoprosztánok. A 8-izoprosztánok koncentrációjának erőteljes növekedését figyelték meg krónikus vénás fekélyek sebfolyadékában, ellentétben az akut sebek sebfolyadékival (Yeoh-Ellerton és mtsai, 2003). Ezek az eredmények bizonyítékot jelentenek a krónikus sebekben fellépő oxidatív stresszre, amely valószínűleg egy erős gyulladásos állapot fennmaradásából származik (Wlaschek és mtsai, 2005). Ezt a hipotézist támasztja alá az is, hogy a krónikus sebekből származó sebfolyadékokban az allantoin és a húgysav arányát jelentősen emelkedettnek találták akut sebekkel összehasonlítva, ezt az arányt a szerzők az oxidatív stressz markereként írták le (James és mtsai, 2003). Az oxidatív stresszt az oxidált fehérjék (karbonil csoportok) szintjének meghatározásával is mérhetjük. Vizsgálatokban a krónikus emberi seb sebfolyadékában alacsonyabb fehérje-karbonil tartalmat tudtak kimutatni, mint az akut sebek esetén (Moseley és mtsai, 2004). A fehérje oxidáció kimutatásának másik lehetősége a nitro tirozin immunhisztokémiai kimutatása. A ROS a nitrogén-monoxiddal reagálva peroxinitrit képződéshez vezet, mely agresszív molekula a fehérjék tirozin oldalláncával reagálva tirozin-nitrációt eredményez.

Antioxidánsok szerepe a sebgyógyulásban

Számos állatkísérletekben bizonyították, hogy az alacsony tömegű antioxidánsok (E-vitamin, C-vitamin, glutation, húgysav, lipinsav, ubikinonok, karotinoidok és fenolos vegyületek) csökkent szintje kapcsolódik a károsodott sebgyógyuláshoz (Shukla és mtsai, 1997). Érdekes módon az E-vitamin és a glutation szintje sokkal alacsonyabb volt idős patkányok sebeiében a fiatal patkányokhoz hasonlítva, és ez korrelál az idős állatoknál tapasztalt késleltetett sebgyógyulással (Rasik és mtsai, 2000). Más tanulmányban az immunszuppresszált patkányok normál és különösen a sérült bőrén erősen csökkent glutation-, C- és E-vitamin szintet figyeltek meg az immunkompetens állatokhoz képest (Gupta és mtsai, 2002). Csökkent glutation szint

volt mérhető a diabeteszes egerek sebeiben, összehasonlítva a nem diabeteszes egerek sebeivel (Mudge és mtsai, 2002).

Különböző antioxidánsok (pl. E-vitamin, alfa-tokoferol, polifenolok, glutation) hatásának vizsgálatával kísérletes körülmények között fokozott sebgyógyulást és angiogenezist tapasztaltak cukorbeteg állatok esetében is (Musalmah és mtsai, 2005; Altavilla és mtsai, 2001; Mudge és mtsai, 2002).

Az alacsony molekulatömegű antioxidánsok mellett számos ROS antioxidáns enzim (SOD, kataláz, glutation peroxidáz, peroxiredoxinok, hem oxigenázok) is kulcsfontosságú a sejtek redox egyensúlyának szabályozásában. Állatkísérletekben idős patkányok SOD aktivitásának csökkenését mutatták ki a fiatal patkányokhoz képest, amely összhangban áll a károsodott sebgyógyulással (Rasik és mtsai, 2000).

A SOD-k sebgyógyulásban betöltött szerepét vizsgálták ischaemiás patkánysebekben rekombináns SOD-al, melynek hatására felgyorsult a sebgyógyulás, csökkent a seb körüli oedema (Senel és mtsai, 1997; Schafer és Wermer, 2008).

1.3.4. Poli-ADP-ribosiláció lehetséges szerepe a sebgyógyulásban

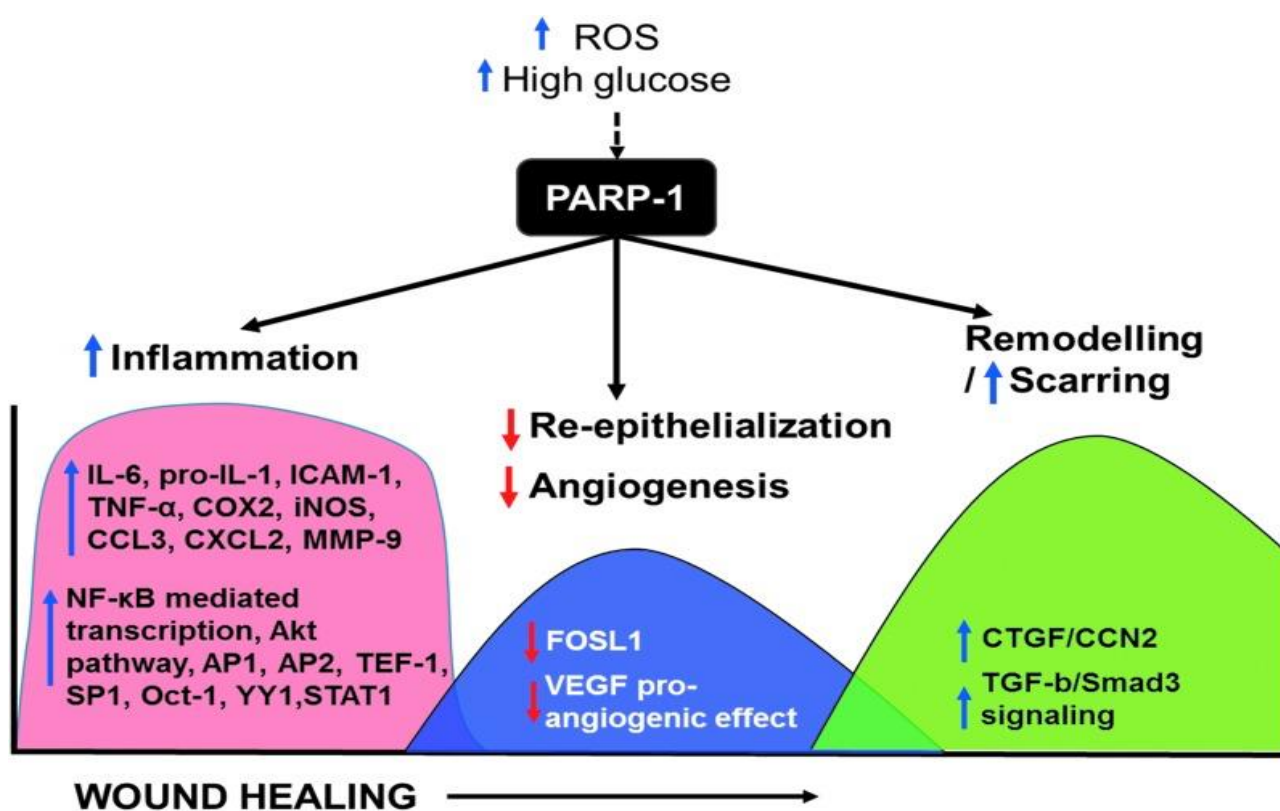
A cukorbetegség és az ischaemia az alsó végtagok nem gyógyuló sebeinek két fő etiológiája. A cukorbetegségből származó hiperglikémia és az ischaemiából származó oxidatív stressz aktiválja a poliadenozin-difoszfát (ADP)-ribóz-polimeráz-1-t (PARP-1), amelynek legfőbb funkciója a DNS-hibajavítása.

A PARP-1 egy nukleáris enzim, amely hiperaktiválódik ischaemiás / diabeteszes sebekben és sokféle mechanizmus révén szabályozza a sebgyógyulást. A PARP-1 sebgyógyulásban betöltött szerepének jobb megértése bevezetheti a PARP-1-célzott terápiás stratégiákat a klinikumba.

A PARP-1 enzimatis aktivitásának legkorábban ismert szabályozója a sérült DNS és a hajtű DNS, ezek mellett nemrégiben azonosították a következőket is: az oxidatív-nitrozatív stressz indukálja és a magas glükózsint aktiválja a PARP-1-et, a Mg^{2+} , Ca^{2+} és a poliaminok alloszterikusan aktiválják a PARP-1-et, az ATP fiziológiás sejtkoncentrációi gátolják a PARP-1-et. A PARG lebontja a PAR-t, ezáltal újraaktiválja a PARP-1-et és így lehetővé teszi a NAD^+ körforgását. A nikotinamid-mononukleotid-adenil-transzferáz-1 (NMNAT-1), mely központi enzim a NAD^+ bioszintézisében, a nukleáris NAD^+ -t szállítja a PARP-1 enzim számára, így

támogatja a PARP-1 katalitikus aktivitását (a PARP-1 a NAD^{+} -ot használja a PAR előállításához) (Zhang és mtsai, 2012; Banerjee és mtsai, 2019).

Annak ellenére, hogy köztudott, hogy mind a diabetes mellitus, mind az ischaemia indukálja a PARP-1-et, és számos PARilációval kapcsolatos reakció (oxidatív stresszválasz, gyulladásos citokinek és kemokinek expressziója, sejtproliferáció és migráció) nagyon fontos szerepet játszik a sebgyógyulásban, a PARP-1 szerepét az ischaemiás állapotokban és cukorbetegségben kialakult sebekben nem sikerült teljesen tisztázni, szerepére vonatkozóan még sok a tisztázatlan részlet.



9. ábra.: A PARP-1 szerepe a sebgyógyulás különböző fázisaiban. A kék nyilak jelzik a fokozott-, a piros nyilak pedig a csökkent regulációt. Az X-tengelyen lévő nyíl jelzi a sebgyógyulás előrehaladását a különböző fázisokon (gyulladás, epithelizáció és angiogenezis, majd remodelling) (Banerjee és mtsai, 2019).

A PARP-1 szerepe a sebgyógyulás különböző fázisaiban (9. ábra)

A sebgyógyulás **gyulladásos szakaszában**: Noha a sebgyógyulás megindítása gyulladásos folyamattal kezdődik, a normál sebgyógyuláshoz a gyulladás megszüntetésére is szükség van. A krónikus, nem gyógyuló sebekben a gyulladás soha nem oldódik meg, ami a reaktív oxigén specieszek (ROS) túltermeléséhez vezet, következményes PARP-1 hiperaktivitást idézve elő. A PARP-1 a NAD⁺ túlzott elhasználása következtében csökkenti a celluláris ATP-ellátást, ami a sejt halálát eredményezi. A PARP-1 hozzájárul a különféle proinflammatorikus mediátorok előállításához is. A PARP-1 3-aminobenzamid (3-AB) általi gátlásáról kimutatták, hogy enyhíti az oxidatív / nitrozatív stresszválaszt és felgyorsítja a sebgyógyulást (El-Hamoly T és mtsai, 2015).

A PARP-1 gátlás egyik lehetséges kockázata a sebfertőzés fokozódása lehet, ezért minden gyulladáscsökkentő kezelési módszernél fokozottan kell figyelni a seb antiszeptikus előkezelésére.

A sebgyógyulás **proliferációs szakaszában**: a PARP gátlása az angiogenezis fokozása és a granulációs szövetképződés javítása érdekében történhet.

Ezt a fázist a granulációs szövet képződése jellemzi, amely leegyszerűsítve a keratinocyták proliferációjából és migrációjából, illetve az új kötőszövet és a sebalapon az angiogenezis által létrehozott mikroszkopikus erek proliferációjából áll.

A PARP-1 / PARiláció szerepe a sejtproliferációban és migrációban nem egyértelmű (Simbulan-Rosenthal és mtsai, 1996). Viszont vizsgálatokban kimutatták, hogy a keratinocyták gyorsabban szaporodnak és vándorolnak PARP-inhibitorok (3-AB vagy PJ34) jelenlétében (El-Hamoly és mtsai, 2014).

A PARP angiogenezisben betöltött szerepéről ellentmondásosak az adatok. Azt találták, hogy az ép, sértetlen szövetekben a PARP-gátlás blokkolja az angienezist, addig sebek esetén a PARP-1 antiangiogén ágensként szerepel, csökkentve sok proangiogenetikus faktor szintjét (pl. HIF-2 α , angiopoetin-like 4, eritropoetin, SIRT-1, Smad3 /4, VEGFR2). A PARP-1 inhibitor 3-AB és az FDA által jóváhagyott PARP-1 inhibitor olaparib valóban felgyorsítja a sebgyógyulást egér modellben, stimulálva az angienezist (Ahmad és mtsai, 2018; El-Hamoly és mtsai, 2015). Hasonlóképpen, a PARP-1 knockout egerekben felgyorsult sebgyógyulást mutattak ki a gyulladásos mediátorok csökkentésével, a keratinocytá migráció elősegítésével, és az angiogenezis javításával (El-Hamoly és mtsai, 2014) Ezen felül az FDA által jóváhagyott

PARP-1 gátló olaparib felgyorsította a sebgyógyulást egér égési sérülésben (Ahmad és mtsai, 2018).

Az angiogenezis állatmodelljében azt találták, hogy a hiperglikémia rontotta az angiogenezist, még akkor is, ha az állatok visszatérnek euglikémiás állapotba. Amikor azonban a PARP-1 inhibitort hiperglikémiás körülmények között adták hozzá, az angiogenezis fokozódott (Sarras és mtsai, 2014).

Kísérletes vizsgálatok kimutatták, hogy a PARP-1 hiperaktivitása ischaemiás / diabéteszes sebeken in vitro rontja az endothel sejtek migrációját, illetve ezzel összefüggésben a PARP-1 PJ34-vel való gátlása az endothel sejtek migrációját fokozza (Zhou és mtsai, 2017).

A sebgyógyulás **remodelling szakaszában** a PARP gátlásával a hegesezés csökkentése érhető el. A remodelling fázisban a fibroblasztok myofibroblastokká alakulnak, az extracelluláris mátrixban az I-es típusú kollagén dominál, amely újból felépíti a szövet szakítószilárdságát. Ebben a fázisban apoptotikus mechanizmusok (fibroblastok, myofibroblastok, endothelsejtek) szükségesek a gyulladás megszűnéséhez és a granulációs szövet átalakulásához.

A MMP-k fontos szerepet játszanak a sebgyógyulás átalakulási szakaszában, és a megnövekedett MMP-9 szint előre jelezheti a seb gyenge gyógyulási hajlamát a diabéteszes lábszárfekélyekben. Érdekes, hogy az MMP-9 expressziója elnyomódik a PARP-1-hiányos egerekben, ami arra utal, hogy a PARP-1 elnémítása fokozhatja a remodelling folyamatát és felgyorsíthatja a sebgyógyulást. Ezenkívül a PARP-1 elnémítása gátolja a TGF- β / Smad3 útvonalat, amelynek nagy szerepe van a hegképződésben (Wang és mtsai, 2013).

Ezek az adatok arra utalnak, hogy a PARP-1 potenciálisan befolyással van a hegképződésre. Felvetődik, hogy a PARP-1 szerepet játszhat a magzati sebek heg nélküli gyógyulásában is. Állatmodellben leírták, hogy a heg nélküli magzati sebgyógyulás során apoptózis indukálódhat, melynek során caspase7 aktiválódás és PARP hasítás, inaktiválódás van jelen. (Carter és mtsai, 2009).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink egyik fő célja volt, hogy megnézzük a poli-ADP-riboziláció (PARiláció) szerepét a bőr élettani folyamatában és a sebgyógyulásra vonatkozóan. Munkánk során kifejezetten az oxidatív/nitrozatív stressz által stimulált PARilációnak a szerepét vizsgáltuk. Megnéztük, hogy a peroxinitrit- DNS károsodás- PARP aktivációs útvonal jelen van-e a sebgyógyulás folyamatában akut és krónikus sebekben. Valamint célunk volt a redox környezet jellemzése a normál bőrben és a sebgyógyulás folyamatában oxidatív stresszmarkerek segítségével, valamint antioxidáns kapacitás mérésével.

Vizsgálataink során a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Kimutatható-e PAR /poli(ADP-ribóz)/ a normál bőrben, ha igen akkor a bőr mely sejtjeiben?
2. Kimutatható-e a NO és a szuperoxid reakciója során keletkező peroxinitrit a krónikus sebek szövettani mintáiban, és ha igen, akkor van-e különbség jelenlétében a normál bőrrel összehasonlítva?
3. Kimutatható-e PARP aktiváció a krónikus sebekben?
4. Ha a peroxinitrit- DNS károsodás- PARP aktivációs útvonal kimutatható a sebgyógyulás során, van-e szerepe a sebgyógyulás folyamatában, befolyásolja-e az elhúzódó sebgyógyulást?
5. Kimutatható-e oxidatív stresszre utaló biomolekula károsodás akut és krónikus sebbel rendelkező betegek sebfolyadékában, ha igen, van-e különbség jelenlétükben?
6. Antioxidáns kapacitásban van-e különbség az akut és krónikus sebbel rendelkező betegek sebfolyadékában?
7. Kimutatható-e oxidatív stresszre utaló biomolekula károsodás és antioxidáns kapacitás akut és krónikus sebbel rendelkező betegek szérumában, és ha igen van-e különbség jelenlétükben?
8. Van-e különbség a gyulladásos mediátorok termelődésében akut és krónikus sebekben, ha igen, a különbség megnyilvánul-e a szérumban és a sebfolyadékban is?
9. A mért adatok között vannak-e korrelációk, és ha igen, milyen összefüggések állnak fenn?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Humán minták

A humán minta vizsgálatok a Helsinki Deklarációnak megfelelően történtek, a vizsgálatokat a Regionális Kutatás Etikai Bizottság engedélyezte (RKEB 2695). A vizsgálatokban résztvevő egyének előzetesen tájékoztatás kaptak, ezt követően az önkéntes vizsgálatokhoz beleegyező nyilatkozatot írtak alá.

A vizsgálatba bevont betegek adatai:

30 beteg mintáit vizsgáltuk. 19 betegnek volt krónikus sebe, ebből 16 betegnek krónikus vénás betegség miatt alakult ki nem gyógyuló sebe, 3 betegnek diabétesz következtében. A 11 akut sebbel rendelkező beteg sebe másodfokú égés következtében alakult ki. A krónikus sebbel rendelkező betegek között 9 nő és 10 férfi volt 40-85 éves kor között, az átlagéletkor 66,5 év volt. Az akut sebbel 5 nő és 6 ffi rendelkezett 17-77 éves kor között, átlagéletkor 45,5 év volt. A betegek klinikai adatait (seb típusa, nem, életkor, seb eredete, seb mérete, égés kiterjedése) az 1. táblázat foglalja össze. Szövet, sebfolyadék és szérum mintákat vizsgáltunk.

Szövetminták

Normál bőrmintát olyan egészséges kontrolloktól (33-68 év, átlagéletkor 49 év) nyertünk (n=7), akiknél jóindulatú elváltozás (pl. naevus) eltávolítása történt, és az egészséges bőrszél került szövettani feldolgozásra.

Seb szövetmintákat krónikus sebbel rendelkező betegek ulcusának széli részéről származó biopsziával (n=14) nyertünk, akiknél a nem gyógyuló sebben kialakuló spinocellularis carcinoma kizárása céljából volt mintavétel, a maradék mintákból történtek vizsgálataink. A 16 lábszárfekélyes beteg közül 2 nem egyezett bele a biopsziába. Formalinban fixált, parafinba ágyazott metszeteket vizsgáltunk. Mind a 14 minta tumormentes volt.

	seb típusa	beteg neme (N:nő, F:fi)	beteg életkora (év)	vénás (V)/ diabeteses (D) ulcus	teljes sebméret (cm2)	seb fennállásának ideje
1.	krónikus	N	85	V	96	3 év
2.	krónikus	N	70	V	378	6 év
3.	krónikus	F	54	V	656	5 év
4.	krónikus	N	60	V	56	4 év
5.	krónikus	F	82	V	327,5	3 év
6.	krónikus	F	69	V	750	40 év
7.	krónikus	N	70	V	447	4 év
8.	krónikus	F	83	V	318	20 év
9.	krónikus	F	66	V	18	3 év
10.	krónikus	F	52	V	104	9 hónap
11.	krónikus	N	82	V	116	2 év
12.	krónikus	N	40	V	56	4 év
13.	krónikus	N	70	V	32	20 év
14.	krónikus	N	68	V	60	4 év
15.	krónikus	F	65	V	180	1,5 év
16.	krónikus	F	46	V	300	3 év
17.	krónikus	F	52	D	80	6 hónap
18.	krónikus	F	68	D	36	1 hónap
19.	krónikus	N	81	D	148	4 év
20.	akut (2.fokú égés)	N	44		1500	< 4 óra
21.	akut (2.fokú égés)	N	61		225	< 4 óra
22.	akut (2.fokú égés)	F	42		1800	< 4 óra
23.	akut (2.fokú égés)	F	68		3000	< 4 óra
24.	akut (2.fokú égés)	F	17		1950	< 4 óra
25.	akut (2.fokú égés)	F	47		150	< 4 óra
26.	akut (2.fokú égés)	N	71		300	< 4 óra
27.	akut (2.fokú égés)	N	77		2250	< 4 óra
28.	akut (2.fokú égés)	F	31		1500	< 4 óra
29.	akut (2.fokú égés)	N	18		1500	< 4 óra
30.	akut (2.fokú égés)	F	23		3750	< 4 óra

1. táblázat: A betegek klinikai adatai (seb típusa, nem, életkor, seb eredete, seb mérete)

Sebfolyadékok

Sebfolyadékot az összes (30) betegtől nyertünk.

Akut sebek esetén másodfokú égést szenvedett egyének bullafolyadékát használtuk. Steril tűvel és fecskendővel történt a bullafolyadék leszívása. Összesen 11 egyéntől gyűjtöttünk mintát.

Krónikus sebbel 16 vénás eredetű ulcusban szenvedő és 3 diabéteszes ulcusban szenvedő egyént vizsgáltunk. A sebeket filmkötszerrel fedtük és 12 óra eltelte után a filmkötszer alatt összegyűlt sebváladékot steril tűvel és fecskendővel leszívtuk.

Az akut sebek bullafolyadékát és a krónikus sebekből nyert sebváladék mintákat lecentrifugáltuk (2000xg, 30 perc) és a felülúszókat -70 C-on tároltuk.

Szérumok

A szérum mintákat perifériás vérből nyertük a 30 beteg és 7 egészséges kontrolltól rutin technikával. (Az egészséges kontrollok kis sebészeti beavatkozáson mentek keresztül, benignus bőrtumor kimetszése történt.)

A vérmintákat lecentrifugáltuk (2000xg, 30 perc), a felülúszókat -70 C-on tároltuk.

3.2. Nitrotirozin kimutatása szövetmintákból

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat formaldehidben fixált és paraffinba ágyazott 5 µm vastagságú metszeteken végeztük. A metszeteket 3x10 percig xilolban, majd csökkenő koncentrációjú alkohol sorban (2x5 perc 100 % etanol, 2x5 perc 95% etanol, 1x5 perc 70 % etanol) rehidráltuk. Ezt követően PBS-ben (pH 7.2) mostuk 5 percen át, majd az endogén peroxidáz aktivitás blokkolásához 15 percig 3%-os hidrogén peroxiddal kezeltük a metszeteket, majd ismét PBS-ben mostuk. Ezután a metszeteket 2%-os kecskeszérumban 1 órán át inkubáltuk ezáltal blokkolva a nem specifikus kötődéseket. A nitrotirozin kimutatására a metszeteket nyúl poliklonális anti-nitrotirozin antitesttel (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) inkubáltuk 2 órán át 1: 1000 hígításban szobahőmérsékleten. (A kontroll metszeteket vagy normál nyúl szérummal vagy a primer ellenanyaggal 10 mM nitrotirozin jelenlétében inkubáltuk.) Ezután PBS-ben mostuk a metszeteket 5x5 percen át, majd kecskében termelt biotinilált anti nyúl-IgG másodlagos ellenanyaggal és avidin-biotin-peroxidáz komplex-szel

(ABC) detektáltuk az immunreaktivitást, Vector Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) felhasználásával. Az ABC reagens elő volt készítve és a gyártó ajánlása alapján használtuk. A színreakcióhoz nikkel erősített-DAB szubsztrátot használtunk, majd kromotrop festékkel ellenfestést végeztük. Ezt követően 2 perces dehidrációt követően Permount médiummal rögzítettük és tárgylemezzel fedtük a metszeteket. A vizsgálatok-hoz Zeiss mikroszkópot használtunk, a mikroszkópos felvételeket kamerával rögzítettük.

3.3. Poli(ADP-ribóz) /PAR/ kimutatása szövetekben

A szöveti PARP /poly(ADP-ribóz) polimeráz/ enzim aktivációt az enzim végtermékének a poli(ADP-ribóz) polimernek a kimutatásával végeztük immunhisztokémiai módszerrel. Az 5 µm vastag paraffinba ágyazott metszeteket a nitrotirozin festésnél leírtak szerint deparaffináltuk, majd blokkoltuk az endogén peroxidáz aktivitást. A nem specifikus kötéseket 2%-os lószérumban 2 órán át 1: 600 koncentrációban szobahőmérsékleten történő inkubálással blokkoltuk. A PAR kimutatása egér monoklonális anti-poli(ADP-ribóz) (Alexis, San Diego, CA) alkalmazásával történt. Másodlagos ellenanyagként lóban termelt biotinilált anti-egér Ig-G-t alkalmaztunk. A módszer további lépései megegyeznek a nitrotirozin festésnél leírtakkal.

3.4. Az immunhisztokémiai vizsgálatok értékelése

A nitrotirozin és PAR festés szemiquantitatívan volt értékelve és minden egyes festéshez vizuális score (0-3 pontszám) lett hozzárendelve az alábbiak szerint:

0: negatív,

1: a sejtek kevesebb mint 1/4-e mutatott gyenge pozitivitást,

2: a sejtek 25-50%-a mutatott változó intenzitású pozitivitást,

3: a sejtek döntő többsége közepes erősségű vagy erős pozitivitást mutatott.

Az értékelést két kutató egymástól függetlenül végezte el.

3.5 Szérumból és sebfolyadékból végzett vizsgálatok

3.5.1. Gyökfogó kapacitás meghatározása

Az antioxidáns kapacitást háromféle módszerrel értékeltük (ABTS-, Amplex red-, Cuprac assay) a szérumból és sebfolyadékból az alábbiak szerint.

3.5.1.1. Gyökfogó kapacitás mérése ABTS dekolorizációs módszerrel

A módszer során az ABTS (2,2'-azi-nobisz-3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav) szintelen vegyületből oxidációval (kálium-perszulfáttal) előállítható az ABTS⁺ kationgyöke, egy zöld színű vegyület, amelyet az antioxidánsok képesek elfogni, hatástalanítani. Az ABTS gyök létrehozása szobahőmérsékleten egy éjszakán át történik sötétszobában egy nappal a kísérlet előtt. A következő napon, röviddel a kísérlet előtt az ABTS⁺ oldat alap abszorbanciáját 405 nm-en Gly-HCl pufferrel 1,2-re állítottuk be. A mintákat kétszeresére hígítottuk PBS-sel, majd 30 percig inkubáltuk ABTS⁺ oldattal 96 lyukú plate-ben 3 példányban. Az abszorbanciát Viktor V multilabel mikroplate olvasóval határoztuk meg 405 nm-en. A dekolorizációt, elszíntelenedést (vagyis az antioxidáns kapacitást) a kontroll százalékos arányában fejeztük ki. Pozitív kontrollként a 3mM NAC (N-acetil- cisztein)-t és a 10 µM aszkorbinsavat használtuk, melyeknek 100% az antioxidáns kapacitása.

3.5.1.2. Antioxidáns kapacitás mérése rézion redukáló képessége alapján CUPRAC-assay-vel

A módszer során a réz(II)ion réz(I) ionná redukálódik antioxidánsokkal történő reakciója során. A folyamat színreakcióval jár. A képződött réz(I)ion mennyisége kolorimetriás módszerrel határozható meg. A módszert Apak és mtsai írták le 2007-ben. Mi a vizsgálatot ezen módszer szerint végeztük a következő módosítással: pozitív kontrollként 12 µM Trolox oldatot használtunk, a végső térfogatot 100 µL-re csökkentettük, és a mérések során 96 lyukú mikroplate-eket használtunk.

3.5.1.3. Hidrogén-peroxid mennyiségének meghatározása Amplex Red assay-vel

A hidrogén peroxid meghatározása során Amplex Red reagenst (Thermo Fisher Scientific) használtunk. A reakció során a szintelen Amplex Red reagens H_2O_2 -vel reakcióba lépve fluorescens terméké alakul. A képződött H_2O_2 mennyisége fluoriméterrel meghatározható. A vizsgálatunk során a szérum és sebfolyadék/bullafolyadék mintákat 1000x hígításban inkubáltuk 1 μM H_2O_2 -vel (Sigma-Aldrich), 50 μM Amplex Red reagenssel és 0,1 U/ml torma peroxidázzal (Sigma-Aldrich) foszfát pufferes sóoldatban 30 percig szobahőmérsékleten. Minden mintához negatív (vak) szérum mintát is alkalmaztunk. A torma peroxidáz jelenlétében a H_2O_2 sztöchiometrikusan reagál az Amplex Red reagenssel (10-acetil-3,7-dihidroxiphenoxazin), mely reakció során piros fluorescens oxidációs termék, resorufin keletkezik. A fluoreszcenciát 530 nm-es excitációs hullámhosszon, az emissziót 590 nm-en mértük, melyhez Fluoroskan Ascent FL plate reader (Labsystems, Vantaa, Finnország) eszközt használtunk.

3.5.2. Glutathion (GSH) meghatározása

A szérum mintákat jéghideg 10% -os RQB-TCA oldatban 15 percig precipitáltuk, kicsapattuk. Centrifugálás után (5000g, 15 perc, 4 °C) a felülúszót összegyűjtöttük további analízis céljából. Glutathion meghatározáshoz a felülúszóból 5 μL -t 96 lyukú plate-be tettünk, melyhez 40 μL 1M-os kálium-foszfát puffert adtunk. Rázást, majd 5 percig szobahőmérsékleten történő inkubálását követően 140 μL kálium-foszfát puffert adtunk a rendszerhez, majd 25 μL 0,5%-os o-ftálaldehidet. A mintákat összeráztuk, majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A fluoreszcenciát 390 nm excitációs hullámhosszon, az emissziót 460 nm-en olvastuk le. Az egyes minták háttereként megfelelő kontrollokat használtunk: a felülúszót és a puffert 4 μL 7,5 mM N-ethylmaleimiddel szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. A standard görbét glutationnal készítettük. A fehérjekoncentrációt a bicinkonin sav (BCA) módszerrel határoztuk meg.

3.5.3. Fehérje oxidáció mértékének meghatározása

A fehérje oxidáció mértékét a fehérje-karboniláció mennyiségének meghatározásával végeztük. Minden mintából 20 μL -t desztillált vízzel 200 μL -re hígítottunk. Majd 50 μL 80%-os TCA oldat hozzáadása után minden mintát vortexeltünk és 5 percig jégen inkubáltunk. Ezt követően

13.000 g fordulatszámon 2 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk, a pelleteket 500 μ L jéghideg acetonban újra feloldottuk (reszuszpendáltunk). Az 5 perces -20°C -on történő inkubálást egy újabb 13 000 g fordulatszámú 2 perces centrifugálás követett. Az acetont eltávolítottuk, azután a pelleteket 20 μ L desztillált vízben újra feloldottuk, majd a mintákból 15 μ L-t használtunk a további fehérje-karbonil analízishez, melyhez OxyBlot Protein Oxidation Kitet (Millipore) használtunk a gyártó utasítása szerint. A deriválási lépés befejezése után a kapott DNP termék mennyiségét spektrofotometriával határoztuk meg, a 405nm-en mért abszorbancia mérésével számszerűsítettük.

3.5.4. Lipid peroxidáció mérése

A lipid peroxidáció mértékét a lipid peroxidáció termékeinek, a tiobarbitursav reaktív anyagoknak (TBARS) mennyiségi meghatározásával végeztük. A mintákat (10 μ L) mikrocentrifugacsövekbe helyeztük, melyhez 10 μ L 8,1% SDS-t, 75 μ L 20%-os ecetsavat, 75 μ L TBA-t (tiobarbitursav) és 30 μ L desztillált vizet adtunk. Majd a reakcióelegyet 95°C -on 45 percig inkubáltuk, ezután minden reakció elegyből 100 μ L-t egy 96 lyukú plate egyes mélyedéseibe pipettáztunk. Az abszorbanciát 532 nm-en olvastuk le.

3.5.5. Fehérje tirozin nitráció meghatározása

A minták fehérjetartalmát BCA reagenssel becsültük meg. Minden minta fehérje koncentrációját 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -re hígítottuk. A kísérlet előtt a nitrocellulóz membránt TBST-vel (50 mM TRIS, 0.5M NaCl, 0.05% Tween 20, pH7.4) 20 percig szobahőmérsékleten aktiváltuk. A mintákat (1 μ L) 3 különböző hígításban (100x, 500x, and 1000x) vittük fel a membránra. A membránt 5%-os zsírszegény tejporban, TBST-ben blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. Majd a membránt anti-nitrotirozin primer antitesttel (Merck Millipore) inkubáltuk, melyet 1%-os tejpor-TBST-ben hígítottunk 4°C -on egy éjszakán át. Háromszori TBST-ben történő mosást követően a membránt peroxidáz-konjugált másodlagos antitesttel (kecske antinyúl IgG, Cell Signaling Technology) inkubáltuk 1%-os tejpor-TBST-ben 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az antitestreakció vizualizálásához kemiluminescens szubsztrátot adtunk, és a kemiluminescens jeleket FluorChem FC2 Imager segítségével detektáltuk. A denzitometriai elemzést az ImageJ software segítségével végeztük. A nitrotirozin mennyiségét

mol/μg fehérjében fejeztük ki, a pozitív kontrollként használt, peroxinitrittel kezelt BSA értékeiből számítva.

3.5.6. Laktát dehidrogenáz aktivitás meghatározása

A károsodott sejtekből felszabaduló laktát dehidrogenáz felszabadulást a kereskedelmi forgalomban kapható kit segítségével (Roche Applied Science, Mannheim, Németország) mértük. A mintákat (100 μL) 96 lyukú lapos aljú platebe tettük. Detektáló reagens (100 μL) hozzáadásával inkubáltuk a lemezeket 30 percen át, majd a minták abszorpciós képességét 490 nm-en mértük.

3.5.7. Citokinek meghatározása

A gyulladásos citokinek mennyiségének meghatározása a sebfolyadékokból szendvics ELISA technikával történt a megfelelő Human Mini TMB ELISA Development Kit (PeproTech, USA) segítségével a gyártó utasításait követve.

3.6. Statisztikai analízis

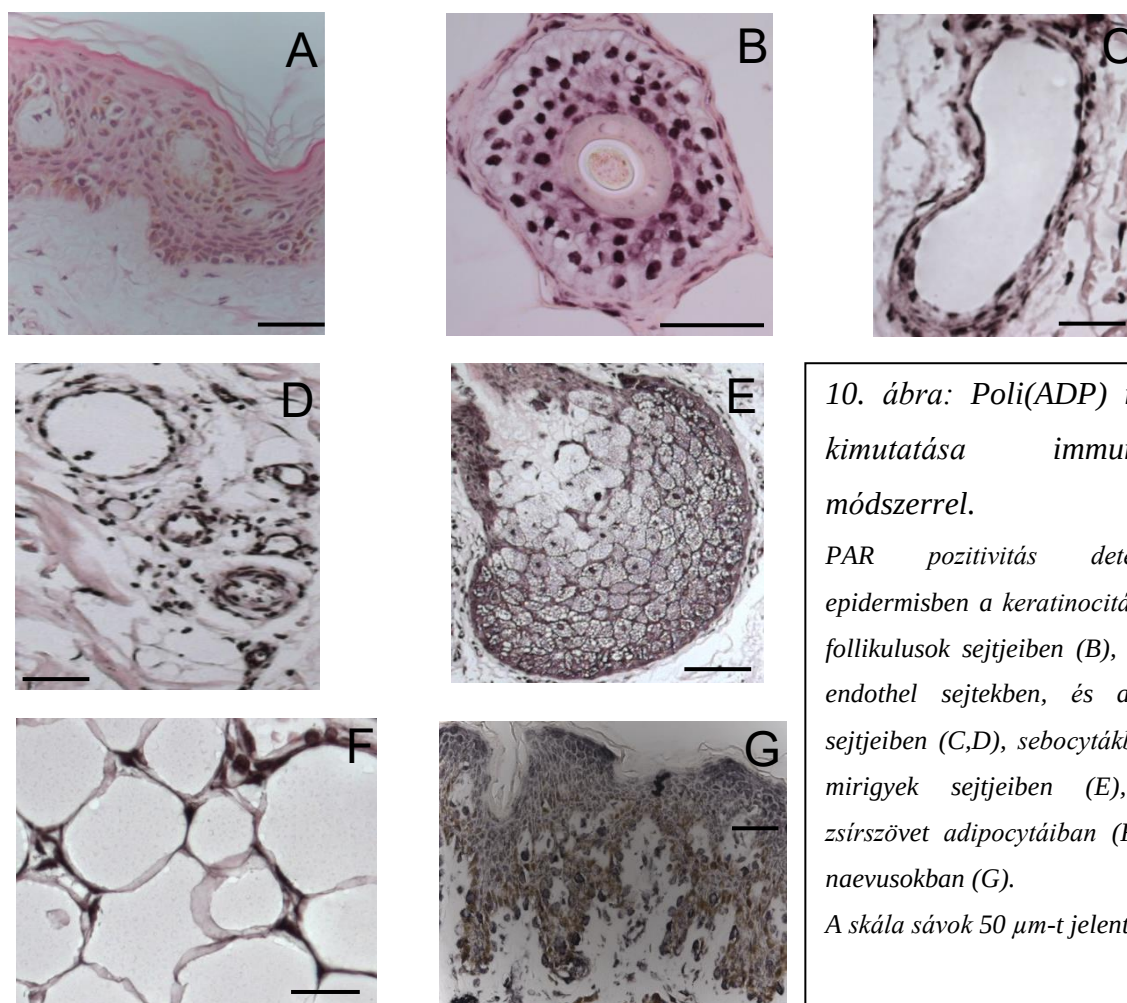
Az elsődleges adatokat doboz- és whisker diagramokon ábrázoltuk, melyeken a középpérték, az alsó és felső kvartilisek, valamint a minimum és maximum értékek szerepelnek. A statisztikai szignifikanciát t-teszttel határoztuk meg. A változók közötti kapcsolat szignifikanciáját és a megfelelő korrelációs együtthatókat a SigmaPlot szoftverrel végzett Spearman-féle kétfarkú korrelációelemzési teszttel határoztuk meg. A 0,05-nél kisebb P-értékeket szignifikánsnak tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

Immunhisztokémiai vizsgálatok a normál bőrben és krónikus sebekben:

4.1. A poli(ADP) ribóz /PAR/ vizsgálata a normál bőrben

A poli (ADP)ribóz polimeráz (PARP) aktivitás kimutatására az enzim végtermékét a poli(ADP) ribóz (PAR) jelenlétét vizsgáltuk normál bőrben immunhisztokémiai módszerrel. A normál bőrben PAR számos területen kimutatható volt (10. ábra A-G). PAR pozitivitás volt látható az epidermisben a keratinocitákban (A), a haj folliculusok sejtjeiben (B), a dermisben az endothel sejtekben, és az érfal egyéb sejtjeiben (C, D), sebocytákban, a sebaceus mirigyek sejtjeiben (E), a subcutan zsírszövet adipocytáiban (F). Jelen volt PAR pozitivitás a melanocytás naevusokban (G) is.



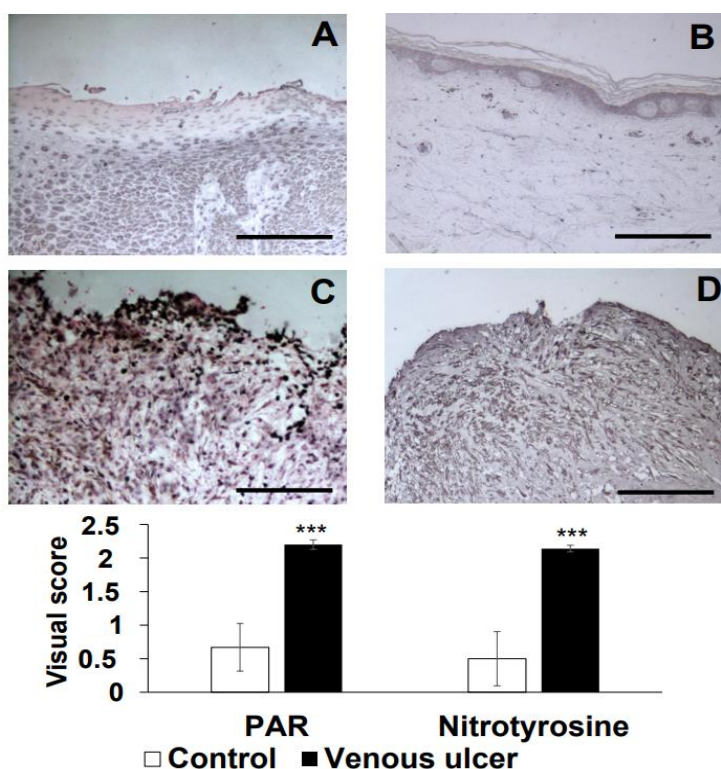
10. ábra: Poli(ADP) ribóz /PAR/ kimutatása immunhisztokémiai módszerrel.

PAR pozitivitás detektálható az epidermisben a keratinocitákban (A), a haj folliculusok sejtjeiben (B), a dermisben az endothel sejtekben, és az érfal egyéb sejtjeiben (C,D), sebocytákban, a sebaceus mirigyek sejtjeiben (E), a subcutan zsírszövet adipocytáiban (F), melanocytás naevusokban (G).

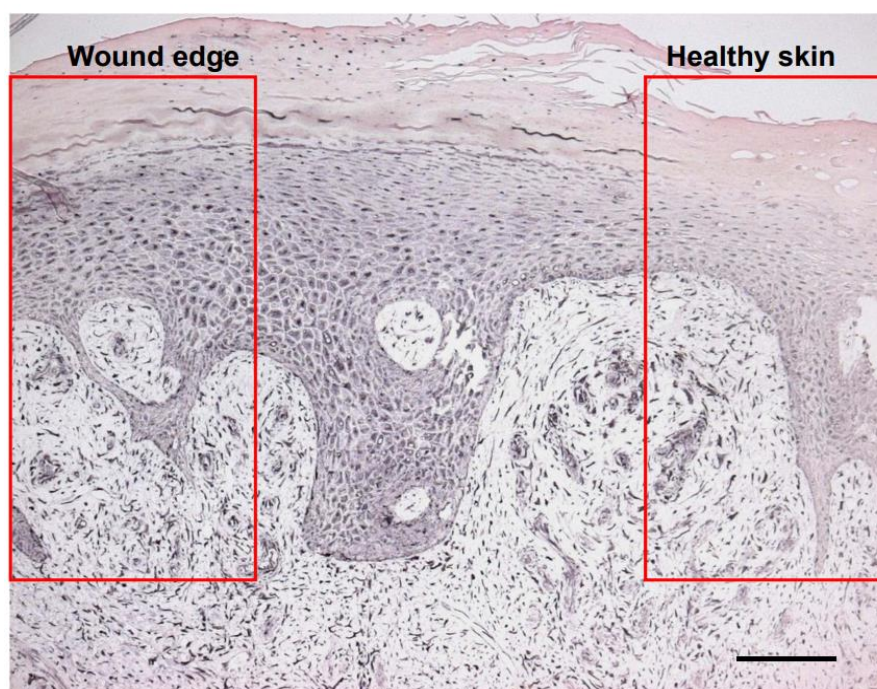
A skála sávok 50 μ m-t jelentenek.

4.2. Nitrotirozin és PAR vizsgálata krónikus sebekben

A minták krónikus vénás elégtelenség következtében kialakult ulcusok széli részéből származtak. A betegeknél a lábszárfekély több mint 6 hete fennállt. A krónikus seb talaján spinocelluláris carcinoma alakulhat ki, ezért szükséges volt biopsia elvégzése, és szövettani vizsgálat daganat kizárása céljából. A vizsgált szövetmintákban malignitás nem volt látható. Miután a daganat kizárása megtörtént, a maradék mintákból történtek alábbi vizsgálataink. Megnéztük, hogy peroxinitrit illetve PARP aktiváció kimutatható-e a szövettani mintákban. Ezen szövetekből készült metszeteken immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk nitrotirozin és PAR kimutatásra. Mivel a peroxinitrit tirozin nitrációt okoz, a nitrotirozin az in vivo termelődő peroxinitrit jelenlétére utal. A PARP1 aktivációját az enzim végtermékének, a PAR polimernek a kimutatásával végeztük. Kontrollként normál bőrt használtunk. A kontroll bőrminták olyan páciensektől származtak, akiknek anyajegy eltávolítás történt, és az egészséges bőrszélék kerültek feldolgozásra vizsgálatunk során. Mind a nitrotirozin (11.D ábra), mind a PAR (11.C ábra) intenzívebben volt jelen a vénás sebekben a kontrollhoz képest. A normál bőrmintákban gyenge nitrotirozin (11.B ábra) és PAR (11.A ábra) festődés volt detektálható vagy nem volt festődés. A PAR és a nitrotirozin festődés is intenzívebb volt a sebágy területén és az ulcus széli részein (12.ábra). A semikvantitatív analízis szignifikánsan emelkedett nitrotirozin és PAR festődést mutatott a sebalapok területén és a sebek körüli szövetekben a normál bőrhöz képest.



11. ábra: a nitrotirozin és a poli(ADP-ribóz) immunhisztokémiai kimutatása a fekély biopsziákból
Az egészséges bőrből vett szövetminták (A,B) és a krónikus vénás ulcusokból vett biopsziák (C,D) poli(ADP-ribóz) (A,C) és nitrotirozin (B,D) festése. A skála sávok 200 μm -t jelent.. Az immunfestés szemikvantitatív vizuális score-ral lett értékelve (***) $p < 0.001$.



12. ábra: a poli(ADP-ribóz) polimeráz végtermékének, a poli-(ADP-ribóz)nak (PAR) a detektálása immunhisztokémiai módszerrel a fekély biopsziákból

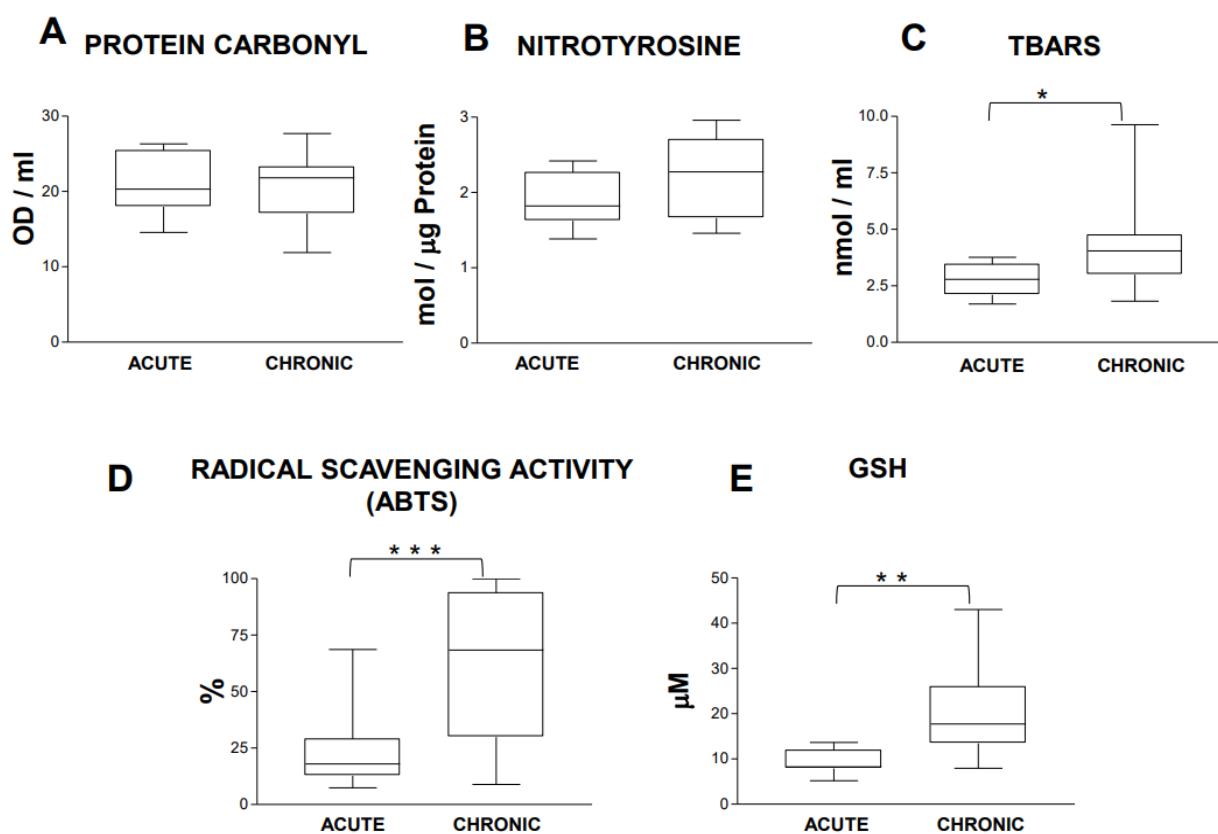
A vénás fekélyekből származó szövetmintákban a sebszélek intenzív PAR immunpozitivitást mutattak, a sebtől távolabbi, közel egészséges bőr gyengébb PAR expressziót mutatott. A skála sávok 200 μ m-t jelentenek.

4.3. Sebfolyadék és szérumminták vizsgálata

A sebgyógyulás folyamatában redox homeosztázis jellemzésére megvizsgáltuk a reaktív oxigén és nitrogén intermedierek (ROS/RNS) jelenlétét, amit reakcióik során keletkező jellegzetes termékek kimutatásával tudtunk detektálni. Továbbá megnéztük, hogy az antioxidáns rendszerek hogyan vannak jelen a folyamatban. Vizsgálatainkat sebfolyadék és szérum mintákból végeztük. A ROS és RNS molekulák számos különböző változást hoznak létre biomolekulákon. A legtöbb reaktív oxigén-, és nitrogén species fehérjéket képes oxidálni protein karbonilációt eredményezve, a lipidek oxidatív módosítása pedig lipid peroxidációt eredményez. Az antioxidáns homeosztázist gyökfogó aktivitás mérésével detektálhatjuk, valamint a fő antioxidáns molekula, a glutation szint mérésével.

4.3.1. Biomolekulák károsodásának és az antioxidánsok szintjének mérése sebfoliadékban akut és krónikus sebbel rendelkező betegeknél

A biomolekula károsodás szintje mérhető volt a vénás ulcusok sebfoliadékában (13.ábra). A két betegcsoportban, vagyis az akut és krónikus sebbel rendelkező betegek sebfoliadék mintáiban nem volt szignifikáns különbség a fehérje oxidációban és a fehérjék tirozin nitrációjában (13.A,B ábra). A lipid peroxidáció mértéke a krónikus ulcus sebfoliadék mintákban szignifikánsan nagyobb volt az akuthoz képest (13.C ábra). Továbbá a gyökfogó kapacitás, valamint a fő antioxidáns, a glutation szint is szignifikánsan magasabb volt, a krónikus sebek nagyobb antioxidáns kapacitással rendelkeznek az akuthoz képest (13.D, 13.E).



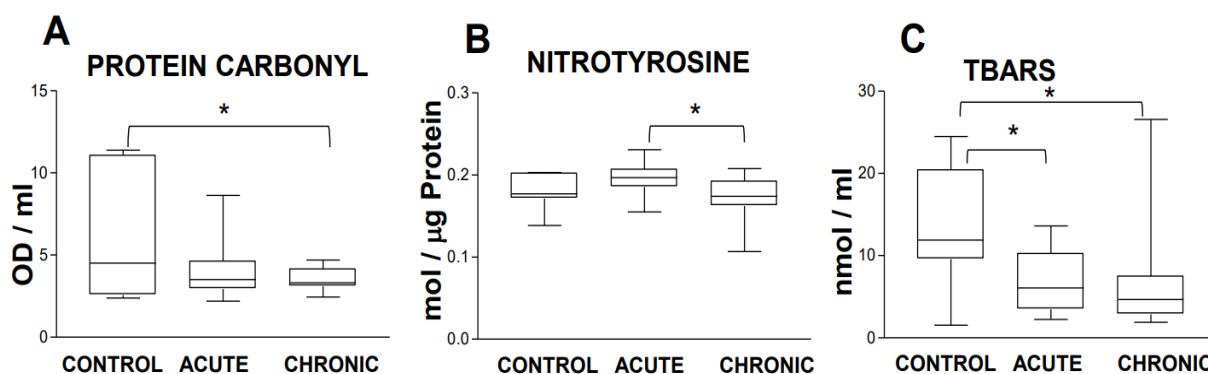
13. ábra: Biomolekula károsodás és az antioxidáns szintek a sebfoliadékokban

A krónikus és akut sebbel rendelkező betegek sebfoliadék mintáinak összehasonlítása a protein oxidáció (A), protein tirozin nitráció (B) és a lipid peroxidáció (C) tekintetében. Az antioxidáns aktivitás meghatározása a gyökfogó kapacitás mérésével ABTS dekolorizációs módszerrel (D) és a fő antioxidáns glutation szintek (E) mérésével történt. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

4.3.2. Biomolekulák károsodásának meghatározása és az antioxidáns szint mérése akut és krónikus sebbel rendelkező betegek és egészséges kontrollok szérumában

A sebbel rendelkezők szérum mintáiban nem volt jelentős különbség az akut és krónikus ulcusos betegek között. A protein karbonil és a lipid peroxidáció szignifikánsan kisebb mértékű volt a krónikus sebbel rendelkező betegek szérumaiban az egészséges kontrollokhoz képest (14.A,C ábra). A lipid peroxidáció termékek szintjei szintén alacsonyabbak voltak az akut sebbel rendelkező betegek szérumaiban, összehasonlítva a kontrollal (14.C ábra).

A protein tirozin nitrációban nem volt jelentős különbség a sebbel rendelkezők szérumában és az egészséges kontroll csoportban, de a krónikus sebbel rendelkező betegek szérumában alacsonyabb nitrotirozin szint volt mérhető az akut sebekhez képest (14.B ábra).



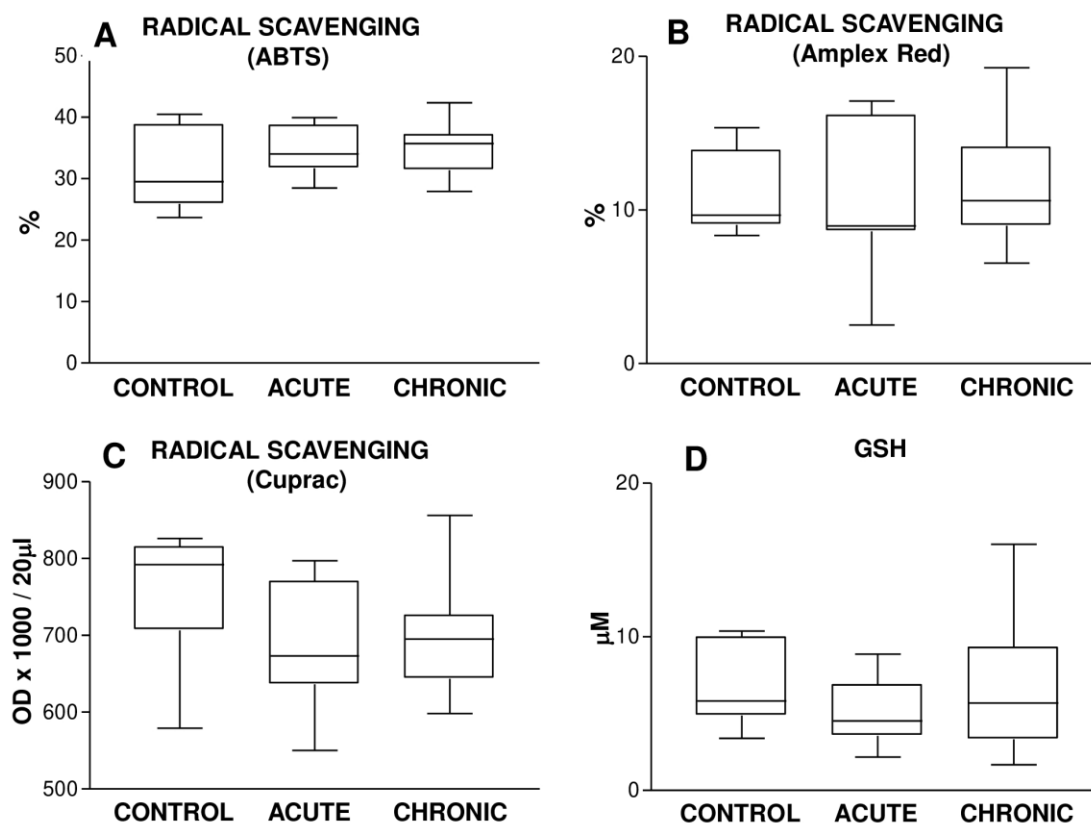
14. ábra: biomolekula károsodás markerei a betegek szérumában

A krónikus és akut sebbel rendelkező betegek szérumait az egészséges kontrollokhoz hasonlítottuk a protein oxidáció (A), protein tirozin nitrálás (B) és a lipid peroxidáció (C) tekintetében.

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

Az akut és krónikus sebtől szenvedő betegek szérumainak antioxidáns szintjeit is összehasonlítottuk gyökfogó kapacitás méréseivel, ABTS dekolorizációs (15.A), Amplex red (15.B), Cuprac (15.C) módszereket és glutation szint meghatározást alkalmazva (15.D). A

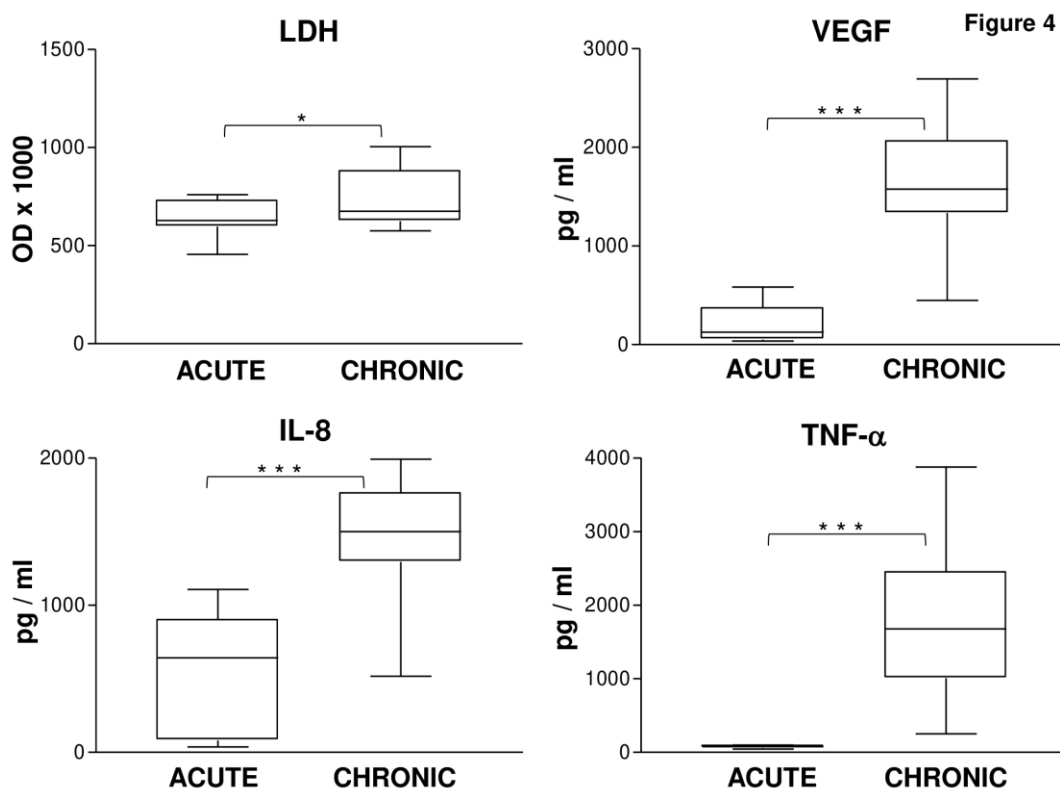
gyökfogó kapacitás (15.A,B,C) és az antioxidáns szintekben (15.D) nem volt jelentős különbség az egészséges kontrollhoz viszonyítva (15.ábra).



15. ábra: A betegek szérumának antioxidáns szintje egészséges kontrollokhoz hasonlítva
A krónikus és akut sebbel rendelkező betegek szérumait az egészséges egyének szérumainak antioxidáns szintjeivel hasonlítottuk össze. Az antioxidáns aktivitást ABTS dekolorizációs assayvel (A), Amplex red assayvel (B) és Cuprac assayvel (C) értékeltük. A fő thiol antioxidáns glutation szinteket szintén meghatároztuk (D). Nem volt szignifikáns különbség a vizsgált csoportok között.

4.3.3. Sebgyógyulás folyamatában jellemző markerek vizsgálata akut és krónikus sebbel rendelkező betegek sebfoliadékában és szérumban, továbbá egészséges kontroll szérumban

A szövetkárosodás mértékére utaló laktát dehidrogenáz (LDH) aktivitás, a granulocita kiáramlásra, infiltrációra utaló IL-8 szint, a gyulladás mértékére utaló TNF-alfa szint és a vascularizáció mértékére utaló VEGF szintek a krónikus sebtől szenvedőknél szignifikánsan magasabbak voltak a betegek sebfoliadékában az akut sebekhez képest (16. ábra). De a betegek szérumban ezek a biomarkerek nem voltak detektálhatóak.

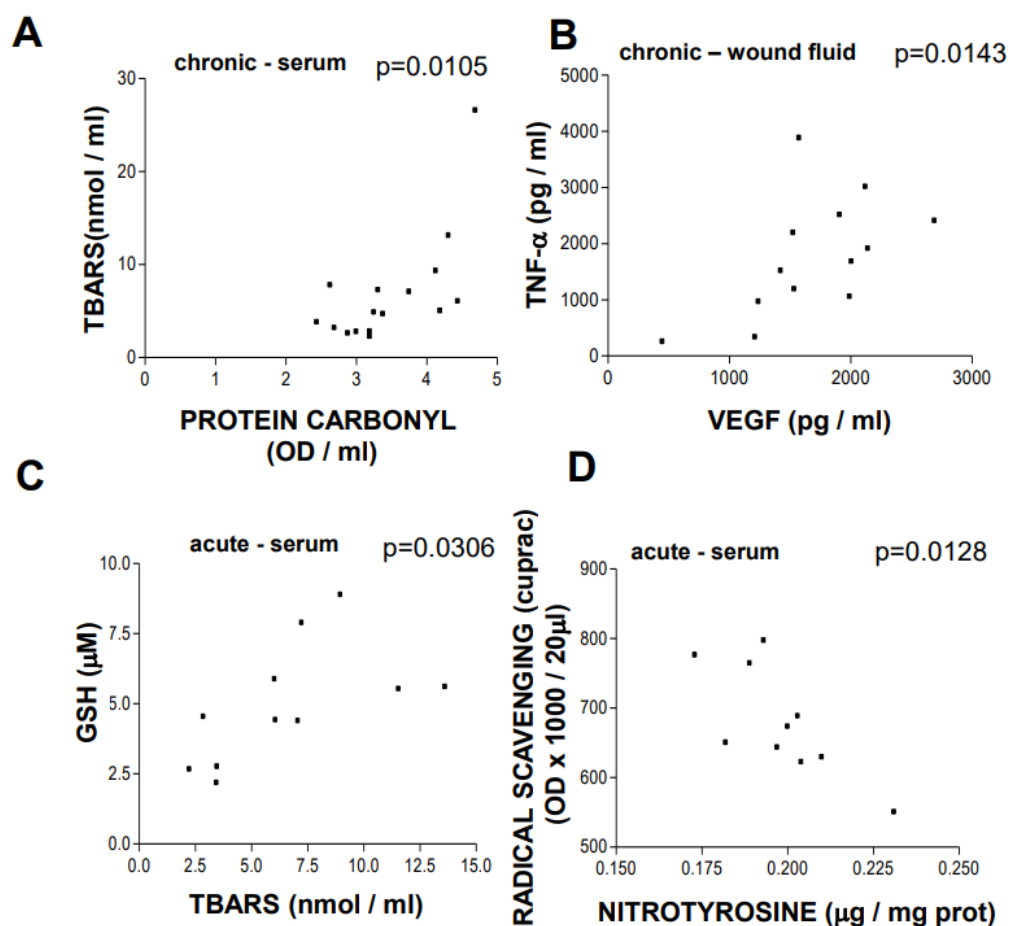


16.ábra: a szövetkárosodásra, vascularizációra, gyulladásra és a granulocita kiáramlásra, infiltrációra utaló markerek a sebfoliadékokban

A krónikus és akut sebbel rendelkező (égett) betegek sebfoliadékait elemeztük a szövetkárosodás (LDH), vaszkularizáció (VEGF), granulocita kemoattrakció- (IL-8) és a gyulladás (TNFα) markereire vonatkozóan. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

4.4. Összefüggések keresése a mért biokémiai paraméterek között

A páronkénti kölcsönösségi viszonyt (korrelációt) minden mért biokémiai paraméter esetében elvégeztük. Szignifikáns korrelációt találtunk a krónikus sebbel rendelkező betegek szérumban mért protein karbonil szint és a lipid peroxidáció értékek között (17.A ábra). Továbbá a krónikus sebfolyadék mintákban a VEGF és a TNF-alfa szintek szintén szignifikánsan korreláltak egymással (17.B ábra). Továbbá az akut sebekkel rendelkező betegek szérumban mért pozitív korrelációt találtunk a lipid peroxidáció és a glutation szintek között (17.C ábra), míg a tirozin nitráció és a gyökfogó kapacitás között fordított korrelációt (17.D ábra) találtunk.

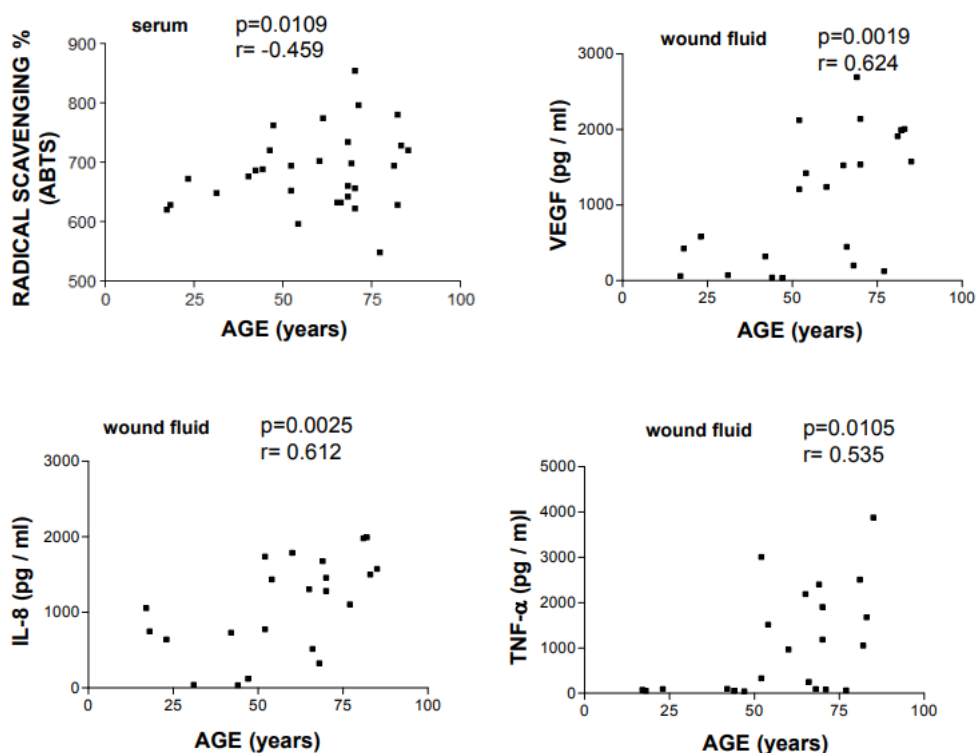


17. ábra: Sebfolyadék és szérumban mért biomarkerek korrelációs analízise

Páronkénti korrelációt minden paraméteren elvégeztük a vizsgálatban. A négy paraméterpárból 3 szignifikánsan pozitív (A, B, C), és 1 negatív (D) korrelációt mutatott.

4.5. Korrelációs analízis a sebfolyadék/szérumbiomarkerek és a páciensek életkora között

Az akut és krónikus sebek redox környezete közötti különbség vizsgálata során nem szabad figyelmen kívül hagyni azt a tényt, hogy az általunk vizsgált betegpopuláció különböző életkori eloszlású. A betegpopulációnk átlag életkora a krónikus sebbel rendelkező betegek esetén 66,5, míg az akut sebbel rendelkezők átlagéletkora 45,5 év volt. Mivel a redox környezet változhat a korral, a korrelációs analízissel próbáltuk kizárni annak a lehetőségét, hogy a két vizsgálati csoport közötti különbségek azért voltak, mert a betegcsoportok az átlagéletkorban különböztek. Valójában néhány azon redox és gyulladásos paraméter közül, amit mértünk (szérumban ABTS scavenger aktivitása és a TNF α , IL-8 és VEGF szintek a sebfolyadékban) pozitív korrelációt találtunk az életkorral az összes betegcsoportban (18. ábra).



18. ábra: korrelációs analízis a sebfolyadék/szérumbiomarkerek és a páciensek kora között
A betegek életkora és a mért biokémiai paraméterek közötti korrelációt elemeztük a vizsgálatban. Négy pár paraméter között volt pozitív szignifikáns összefüggés: szérumban gyökfogó kapacitás és életkor, sebfolyadék VEGF szint és életkor, sebfolyadék IL-8 szint és életkor, sebfolyadék TNF- α szint és életkor.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Poli-ADP-riboziláció a normál bőrben

Vizsgálataink során először megnéztük, hogy a poli-(ADP-ribóz) kimutatható-e a normál bőrben. Eredményeink egyértelműen igazolták, hogy a poli-(ADP-ribóz) polimeráz végterméke a poli-(ADP-ribóz) jelen van a normál bőrben. A normál bőrben PAR-pozitív sejtek kimutathatóak az epidermisben. Az epidermis fő sejtjeiben, a keratinocitákban már korábban leírták a PARP-1 expresszióját (Ross és mtsai, 1998; Szabó és mtsai, 2001). Ezenkívül számos kutatócsoport bizonyította a PARP-1 domináns expresszióját a tenyésztett primer keratinocitákban és HaCaT sejtekben (Malanga és Althaus, 1994; Szabó és mtsai, 2001; Bakondi és mtsai, 2002, 2003, 2004; Pachernik és mtsai, 2002; Cals-Grierson és Ormerod, 2004). A keratinocitákban a PARP-1 aktiválódását összefüggésbe hozták gyulladásos bőrbetegségekkel és a napégéssel is (Szabó és mtsai, 2001; Farkas és mtsai, 2002; Bakondi és mtsai, 2004; Bai és mtsai, 2009). Azt is kimutatták, hogy a PARP-1 szabályozza a gyulladásos citokinek és kemokinek (IL-1, TNF- α , MIP-1a, MIP-2, MCP-1 stb.) expresszióját (Szabó és mtsai, 2001; Bakondi és mtsai, 2003; Cals-Grierson és Ormerod, 2004; Bai és mtsai, 2009) és az oxidatív stressz által kiváltott sejthalált (Bakondi és mtsai, 2003, 2004). Jelen vizsgálataink során kimutattuk, hogy a PAR jelátviteli molekulaként is szolgálhat a keratinocitákban, mivel a polimer kimutatható az egészséges bőr keratinocitáiban. Ugyanakkor további vizsgálatokat igényel annak kimutatása, hogy a keratinocitákban zajló PAR szintézist a DNS-törések vagy a DNS-töréstől független folyamatok indukálják-e.

Intenzív PAR festődés volt jelen a szőrtüszők sejtjeiben. Ennek oka lehet a gyors sejtciklus, amit alátámaszt az a tény, hogy a PARiláció szerepet játszik a proliferáció szabályozásában (Virag és Szabó, 2002). A PAR polimereket a sebocitákban és az adipocitákban is kimutattuk, ami a PAR új szerepére utalhat ezekben a lipideket felhalmozó sejt típusokban. A PARP-1 adipocitákban betöltött szerepét már felvetették (Janssen és Hilz, 1989; Hsu és Yen, 2006), azonban a PARP-1 érett adipocitákban való jelenlétét munkacsoportunk írta le először. Az utóbbi években több tudományos közlemény is beszámolt a PARP zsírsavanyagcserében betöltött szerepéről (Szántó és Bai, 2020). Kimutatták, hogy a PARP-1 kölcsönhatásba lép a retinoid X-receptorokkal (RXR) az RXR - peroxiszóma proliferátor aktivált receptor γ (PPAR γ) nukleáris receptor heterodimerben (Miyamoto és mtsai, 1999), amely a sebocita lipid akkumulációt szabályozza a sebocita differenciálódás során (Rosenfield és mtsai, 1999; Kim és mtsai, 2001). Irodalmi adatok alapján valószínű, hogy a PARP-1 kötődését az aktív sejtmag receptorokhoz

a DNS-szál törés indítja el a receptor aktiválódása során (Ju és mtsai, 2006), így valószínűleg ez magyarázza a PAR jelenlétét ezekben a sejtekben.

5.2 Oxidatív-, nitrozatív stressz akut és krónikus sebekben

A sebgyógyulás összehangolt biokémiai történések sorozata, mely számos sejt koordinált működése révén valósul meg. Irodalmi adatok sora bizonyítja a reaktív oxigén és nitrogén intermedierek szerepét a folyamatban. A sebgyógyulás során mind a gyógyulást elősegítő, mind gátló hatásait leírták (Sen és Roy, 2008). A ROS/RNS speciesek alapvető szignalizációs szerepet játszanak a gyógyulási folyamatban például a sejtproliferációban és az angiogenezisben, továbbá hozzájárulnak a patogének elleni védelemben. Ugyanakkor a fokozottan termelődő reaktív intermedierek a redox homeosztázis egyensúly felborulásához vezethetnek, ami elhúzódó sebgyógyuláshoz vezethet például diabéteszben, kemoterápia, sugárkezelés, illetve steroid kezelés során. Nem teljesen tisztázott, hogy a redox környezet hogyan változik akut és krónikus sebekben, különböznek-e egymástól. Továbbá az sem ismert hogyan változik a redox környezet a sérült szövetekben, és hogy tükröződik ez a szérumban. A folyamat jobb megértéséhez célunk a redox környezet jellemzése volt akut és krónikus sebekben. Ismert, hogy ROS/RNS speciesek érinthetnek fontos biológiai targeteket, így proteineket, lipideket, nukleinsavakat, a szövetekben biomolekulák strukturális változásait idézhetik elő. Számos ROS/RNS species oxidáns így a szövetekben a fehérjék oxidációját okozhatja.

Vizsgálataink során megnéztük, hogy oxidatív stresszmarkerek, így protein karboniláció, lipid peroxidáció, tirozin nitráció jelen van-e akut és krónikus sebekben, és van-e különbség a jelenlétükben szérumban és a szövetekben, sebfolyadékban, valamint megnéztük az antioxidáns szinteket is. Továbbá megnéztük, hogy a sebgyógyulás fontos kulcsmolekulái hogyan vannak jelen a különböző sebekben, és hogyan alakulnak a szérumban.

Mind az akut, mind a krónikus sebekből származó sebfolyadékban ki tudtunk mutatni protein karbonilációt (egy protein oxidációs markert), de az akut és krónikus sebek között nem volt szignifikáns intenzitás különbség. A lipid peroxidáció egy kicsit intenzívebb volt a krónikus sebfolyadékokban, míg a tirozin nitrálásban (peroxinitrit-indukált protein módosulás) nem volt különbség az akut és krónikus sebből származó sebfolyadékok között. Az akut és krónikus sebek antioxidáns profilja azonban szignifikánsan eltér egymástól: a krónikus sebeknek

nagyobb gyökfogó aktivitásuk volt és nagyobb a GSH tartalom összehasonlítva az akut sebekkel (13. ábra).

5.3. A sebgyógyulás során kulcsfontosságú biomolekulák akut és krónikus sebekben

A szövetkárosodás mértékére utaló laktát dehidrogenáz (LDH) aktivitás, a vascularizáció kulcsmediátorának a VEGF-nek a szintje, valamint a fő granulocytá toborzó faktor és inflammatorikus citokin, az IL8 szint, illetve TNF α szintek magasabbak voltak a krónikus sebek sebfolyadékában összehasonlítva az akut sebekkel (16. ábra). Ezek az adatok együttesen erősebb gyulladásos környezetet sugallnak a krónikus sebekben, amely valószínűleg velejárója a magasabb ROS/RNS species termelésnek. Az antioxidánsok kompenzatórikus túlprodukciója (13. D, E ábra) magyarázhatja, hogy a megnövekedett ROS/RNS termelés miért nem okoz fokozott biomolekuláris károsodást (13. A, B, C ábra). A kismértékben, de szignifikánsan magasabb lipid peroxid szintek a krónikus sebfolyadékokban valószínűleg azt jelzik, hogy a lipidek sérülékenyebb targetek mint a fehérjék.

Az érintett szövetekben zajló molekuláris történések hatásai gyakran a vérkeringésben is megmutatkoznak, vérvizsgálati tesztekkel detektálhatóak. Ezért megnéztük, hogy a sebgyógyulás során kimutatható redox környezet változások kimutathatóak-e a betegek szérumában. Nem találtunk jelentős különbséget az akut és krónikus sebbel rendelkező betegek és a kontroll csoport szérum mintáinak biomolekula károsodás marker szintekben (14. ábra), így a gyökfogó aktivitásban, glutation szintben, fehérje oxidációban és a lipid peroxidációban sem (15. ábra). Ez az eredmény magyarázható azzal a ténnyel, hogy a redox módosulások lokalizálva maradnak a seb területén és a seb környezetében, de szisztémásan nem okoznak jelentős különbséget az akut és krónikus sebbel rendelkező betegekben. Megjegyzendő, hogy a lipid peroxidációs termékek alacsonyabb értékekkel jelennek meg mind az akut, mind a krónikus sebbel rendelkező betegek szérumaiban, összehasonlítva a kontrollokkal, míg a sebfolyadék mintákban szignifikáns különbséget találtunk a két sebcsoportban. Valószínű, hogy a sebfolyadékok közvetlenül tükrözik a szövetekben zajló biokémiai folyamatok szintjét, míg a szérum szinteket jobban érinti a clearance mechanizmus.

5.4. Összefüggések a mért paraméterek között, korrelációs vizsgálatok

Megnéztük, hogy van-e összefüggés a mért biokémiai paraméterek között. A vizsgálat a mért biokémiai paraméterek páros korrelációs analízise során szignifikáns korrelációt fedett fel néhány párban (17. ábra). Megjegyzendő, hogy a pozitív korreláció két biomolekuláris marker között, nevezetesen a lipid peroxidok és a protein carbonilok között arra utalhat, hogy ugyanaz a fajta oxidatív redox környezet váltja ki ezt a két módosulást vénás ulcusban szenvedő betegek szérumaiban (17. A ábra). Egy inverz korreláció a gyökfogó aktivitás és a nitro tirozin képződés között jelzi hogy a gyökfogók gátolhatják a tirozin nitrálást az akut sebbel rendelkező betegek szérumaiban (17. D ábra). A pozitív összefüggés a lipid peroxidáció és a glutation között az akut sebbel rendelkező betegek szérumaiban (17.C ábra) némileg meglepő. Számos oxidatív stresszhez kapcsolódó állapotban kimutatták, hogy a lipid peroxidáció tipikusan növekszik, míg a glutation szintek leesnek a gyulladásos szövetekben (Liaudet és mtsai, 2002). Más vizsgálatok arról számoltak be, hogy nem tapasztaltak paralell változást a glutathion és a lipid peroxid szintek között (Pemberton és mtsai, 2006) ami arra utalhat, hogy valószínű sokkal komplexebb kapcsolat van ezen paraméterek között. Továbbá a glutathion fragmentek ciszteinil-glicin és cisztein redukáló hatása bizonyítottan hozzájárul a vasion-kelát által kiváltott lipid peroxidációhoz. (Spear és Aust, 1994). Ha ezen tiolok szintje hasonló változást jelez mint a glutation, ez magyarázhatja miért változik egymással párhuzamban a GSH és a lipid peroxidok szintje akut sebbel rendelkező betegek szérumában. Azoban az sem zárható ki, hogy nincs ok-okozati kapcsolat a két paraméter között.

Ismert, hogy a VEGF expressziót elsősorban a hypoxia szabályozza, azonban van irodalmi adat arra vonatkozóan, hogy gyulladásos citokinek mint pl. a TNF α és az IL-1 β és az oxidánsok mint pl. a H₂O₂ szintén fokozhatják a VEGF expressziót (Obrosova és mtsai, 2004). Korábban kimutattak H₂O₂ által indukált VEGF expressziót a bőrben, és leírták sebgyógyulást elősegítő hatását (Tonnesen és mtsai, 2000). A VEGF H₂O₂ általi indukciója úgy tűnik hogy független a hypoxia útvonaltól, de gátolható a thiol antioxidáns N-acetylciszteinnel (Redondo és mtsai, 2000). A krónikus sebfolyadék mintáinkban a TNF α szintek korreláltak a VEGF szintekkel (17. B ábra). Így feltételezhető az a hipotézis, hogy a gyulladásos és oxidatív szignál indukálja a VEGF expressziót a krónikus sebekben. Ennek ellenére a redox szignál és a VEGF expresszió közötti kapcsolat még további vizsgálatokat igényel.

Míg az akut és krónikus sebek redox környezete közötti különbséget vizsgáljuk, nem szabad figyelmen kívül hagyni azt a tényt, hogy a mi vizsgálati populációnk eltérő életkori eloszlású. A mi betegpopulációnk átlag életkora a krónikus sebbel rendelkező betegek esetén 66,5 év, míg

az akut sebbel rendelkezők átlagéletkora 45,5 év volt. A redox környezet változhat a korrall, így felvetődik a lehetőség, hogy néhány különbség a két vizsgálati csoport között azért volt, mert az átlagéletkorban különböztek. Azonban több paraméter esetén ki tudjuk zárni, hogy a mért különbség az átlagéletkor különbözőség miatt lenne. Valójában néhány, a vizsgálatban mért redox és gyulladásos paraméter közül (a szérumban a gyökfogó kapacitás /ABTS scavenger aktivitás/ és a sebfolysadék TNF α , IL-8 és VEGF szintek) korreláltak az életkorral az összes betegcsoportban (18. ábra). Ezekből a paraméterekből a szérumban ABTS aktivitás nem mutatott különbséget a vizsgálati csoportok között (18. A ábra). Mivel a többi oxidatív károsodási paraméter nem mutatott életkor függőséget, ezért azt gondoljuk, hogy nem valószínű, hogy a redox stressz vizsgált szignáljai a sebfolysadékokban az életkori tényező következményei. Másrészt a TNF α , IL-8 és VEGF szintek pozitívan korreláltak az életkorral és magasabb értékeket mutattak a krónikus sebek sebfolysadék mintáiban, összehasonlítva az akut sebekkel. További vizsgálatok szükségesek hasonló korú betegcsoportokkal hogy megerősítsék vagy megcáfolják az életkor szerepét a magasabb TNF α , IL-8 és VEGF szintek esetén a krónikus sebfolysadékokban összehasonlítva az akut esetekkel.

5.5. A vizsgálatok korlátai

Munkánknak ebben a részében tehát a humán akut és krónikus sebek redox jellemzését végeztük. A kétféle sebfolysadék közötti különbségek értelmezésénél fontos figyelembe venni a következőket. Míg a krónikus sebek, amelyekből sebfolysadékot gyűjtöttünk, ki voltak téve a külső környezetnek (a fedőkörtől eltekintve) és a saját mikrobiomjuk is jelen volt, addig az akut sebek hólyagfolysadéka hólyagtetővel borítottak és sterilek voltak. Mivel az égési betegeink jellemzően egy órán belül érkeztek az égési osztályra és a hólyagfolysadékukat négy órán belül eltávolítottuk, ezeknek a sebfolysadékoknak az összetétele valószínűleg különbözött azokétól, amelyeket későbbi időpontokban nyertek. Továbbá a sérülést követő korai időszakban még nem mindig lehet egyértelműen elkülöníteni a felületes és mélyebb szöveteket is érintő másodfokú égést. A szakirodalom szerint a két kategóriába tartozó sebfolysadék összetétele nem feltétlenül azonos (Pan és mtsai, 2010). Mindazonáltal az akut sebekből mért redox paraméterek viszonylag kevés eltérést mutattak egymáshoz viszonyítva, ami arra utal, hogy a kiválasztott égési betegpopuláció valószínűleg meglehetősen homogén. Egyéb lehetséges sebfolysadékforrások (műtéti sebek vagy bőrátültetések donor területei) általában nem biztosítanak elegendő mennyiség volument a sokféle vizsgálatához, amit a munkánk során

alkalmaztunk. Felvetődött az a lehetőség is, hogy bőrsébszeti beavatkozások után másodlagosan gyógyuló sebek sebfolyadékát használjuk, de ezek többnyire fertőzött sebek.

5.6. Peroxinitrit- PARP aktiváció krónikus sebekben szövettani szinten

Ismert, hogy a gyulladás számos formájában termelődik peroxinitrit (Virág és mtsai, 2002). Adataink is bizonyítják, hogy keletkezik peroxinitrit a humán sebekben, amit a peroxinitrit elfogadott indikátorának, a nitrotirozinnak a dektálásával mutattunk ki. Immunhisztokémiával a krónikus sebekben fokozott tirozin nitráció mutatható ki az egészséges bőrrel összehasonlítva (8. ábra), ami valószínűleg az indukálható nitrogén oxid szintetáz fokozott expressziójának köszönhető (Abd-El-Aleem és mtsai, 2000) a fokozott szuperoxid termeléssel együtt (Vorauer-Uhl K és mtsai, 2002). Ismert, hogy a peroxinitrit és a hidroxil gyökök DNS törést okoznak, ami PARP-1 aktivációhoz vezet (Virág és mtsai, 2002). A PARP aktivációt a humán krónikus sebekben az enzim végtermékének a poli(ADP-ribóz) immundetektálásával igazoltuk. A megnövekedett PAR polimer leginkább az expresszáldó PARP-1-nek köszönhető. Fokozott PARP-1 expressziót tudtunk kimutatni a sebekben, különösen a sebszéleken (12. ábra), ami hozzájárul a szövet PARiláció kapacitáshoz. A fokozott PARiláció jelezheti a DNS-javítást oxidatív DNS-károsodást követően, de fokozott oxidatív stresszben hozzájárulhat a sejtkárosodáshoz is. A PARiláció pontos szerepe a humán sebekben további vizsgálatokat igényel.

5.7. PARP inhibitorok klinikai jelentősége

Irodalmi adatok támasztják alá a PARP inhibitorok hatékonyságát számos betegségben. Ma már FDA engedéllyel rendelkező PARP inhibitorokat (olaparib, talazoparib, niraparib, rucaparib) használnak daganatok (BRCA-pozitív petefészekrák, BRCA-pozitív metastatikus emlőrák) terápiájában, melyeket már tesztelnek áttétes prosztatarák kezelésére is.

El-Hamoly és mtsai egész testet ért gamma-sugárzás utáni sebgyógyulás vizsgálata során azt találták egerekben, hogy a PARP-1 enzim gátlása (3-AB krémmel) felgyorsítja a késleltetett sebgyógyulást az oxidatív stressz és a gyulladásos válasz korai módosítása révén. 2018-ban Akbar Ahmad és mtsai kimutatták, hogy a klinikailag engedélyezett PARP-gátló olaparib javítja a szervfunkciókat, elnyomja a gyulladásos reakciókat és felgyorsítja a sebgyógyulást

egér égési sérülésekben. Az adatok felvetik az olaparib potenciális hasznosságát súlyos égési sérülések esetén, illetve nem gyógyuló sebek esetén is.

6. KONKLÚZIÓ

Vizsgálataink alapján a következő megállapításokat tehetjük válaszolva célkiűzésünk során feltett kérdésekre.

1. Vizsgálatainkban demonstráltuk a PAR jelenlétét keratinocitákban, sebocitákban, haj folliculusokban, endothel sejtekben, a sebocitákban és a subcutan adipocitákban, illetve a melanocytás naevusokban a normál bőrben, jelezve azt, hogy a PAR fiziológias funkciókat szabályozhat ezekben a sejtekben.
2. Adataink bizonyítják, hogy keletkezik peroxinitrit a humán sebekben, amit a peroxinitrit elfogadott indikátorának, a nitro tirozinnak a dektálásával mutattunk ki. Immunhisztokémiával a krónikus sebekben fokozott tirozin nitráció mutatható ki az egészséges bőrrel összehasonlítva.
3. A PARP aktivációt a humán krónikus sebekben az enzim végtermékének a poli(ADP-ribóz) immundetektálásával igazoltuk.
4. Fokozott PARP aktivációt tudtunk kimutatni a sebekben a normál bőrhöz képest, a PAR expresszió a sebszéleken még kifejezettebb volt. A fokozott PARiláció jelezheti a DNS-javítást oxidatív DNS-károsodást követően, de fokozott oxidatív stresszben hozzájárulhat a sejtkárosodáshoz is a krónikus sebekben. A fokozott PARilációnak szerepe lehet az elhúzódó sebgyógyulásban.
5. Biomolekula károsodást oxidatív stressz markerek vizsgálatával mértük, protein karbonilációt, lipid peroxidációt, tirozin nitrációt vizsgáltunk, mely jelen volt akut és krónikus sebfolyadékokban. A lipid peroxidáció mértékében találtunk különbséget, a krónikus ulcus sebfolyadék mintákban szignifikánsan nagyobb volt az aktivitás az akuthoz képest, a többi paraméterben nem volt jelentős különbség a két csoport között.
6. A gyökfogó kapacitás, valamint a fő antioxidáns, a glutation szint is szignifikánsan magasabb volt, a krónikus sebek nagyobb antioxidáns kapacitással rendelkeznek az akuthoz képest. Az antioxidáns profil az akut és krónikus sebekben szignifikánsan eltér

egymástól: a krónikus sebeknek nagyobb gyökfogó aktivitásuk volt és nagyobb a GSH tartalom összehasonlítva az akut sebekkel. Az antioxidánsok kompenzatórikus túlprodukciója magyarázhatja, hogy a megnövekedett ROS/RNS termelődés miért nem okoz fokozott biomolekuláris károsodást.

7. A szérumbizsgálatok során nem találtunk jelentős különbséget az akut és krónikus sebbel rendelkező betegek és a kontroll csoport szérumb mintáinak biomolekula károsodás marker szintjeiben, és a gyökfogó aktivitásban, glutation szintben, fehérje oxidációban és a lipid peroxidációban sem. Ez az eredmény magyarázható azzal a ténnyel, hogy a redox módosulások lokalizálva maradnak a seb területén és a seb környezetében, de szisztémásan nem okoznak jelentős különbséget az akut és krónikus sebbel rendelkező betegekben.
8. A szövetkárosodás mértékére utaló laktát dehidrogenáz (LDH) aktivitás, a vascularizáció kulcsmediátorának a VEGF-nek a szintje, valamint a fő granulocita toborzó faktor és inflammatorikus citokin, az IL-8 szint, illetve TNF α szintek magasabbak voltak a krónikus sebek sebfolyadékában összehasonlítva az akut sebekkel. Mindez gyulladásos környezetet sugall a krónikus sebekben, amely valószínűleg velejárója a magasabb ROS/RNS species termelődésnek.
9. A páronkénti kölcsönösségi viszonyt minden mért biokémiai paraméter esetében elvégeztük. Szignifikáns korrelációt találtunk a krónikus sebbel rendelkező betegek szérumban mért protein karbonil szint és a lipid peroxidáció értékek között. Továbbá a krónikus sebfolyadék mintákban a VEGF és a TNF-alfa szintek szintén szignifikánsan korreláltak egymással, ami arra utalhat, hogy a gyulladásos és oxidatív szignál indukálja a VEGF expressziót a krónikus sebekben. Továbbá az akut sebekkel rendelkező betegek sebfolyadék mintáiban pozitív korrelációt találtunk a lipid peroxidáció és a glutation szintek között. Az általunk mért redox és gyulladásos paraméter közül (szérumb ABTS scavenger aktivitása és a TNF α , IL-8 és VEGF szintek a sebfolyadékban) pozitív korrelációt találtunk az életkorral az összes betegcsoportban.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az oxidatív stressz kutatása napjainkban reneszánszát éli. Vizsgálati eredmények sora bizonyítja szerepét számos betegségben. Az oxidatív stressz által indukált PARP aktiváció szintén számos pathofiziológiai folyamatban szerepet játszik.

Vizsgálataink egyik fő célja az volt, hogy megnézzük a PARiláció szerepét a bőr élettani folyamataiban és a sebgyógyulásra vonatkozóan. Munkánk során kifejezetten az oxidatív/nitrozatív stressz által stimulált PARilációnak a szerepét vizsgáltuk. Megnéztük, hogy a peroxinitrit-DNS károsodás- PARP aktiváció útvonal jelen van-e a sebgyógyulás folyamatában akut és krónikus sebekben. Valamint célunk volt a redox környezet jellemzése a normál bőrben és a sebgyógyulás folyamatában oxidatív stresszmarkerek segítségével.

Vizsgálatainkban demonstráltuk a PAR jelenlétét keratinocitákban, sebocitákban, haj folliculusokban, endothel sejtekben és a subcutan adipocitákban a normál bőrben, jelezve azt, hogy a PARP fiziológias funkciókat szabályozhat ezekben a sejtekben.

Ismert, hogy az oxidatív stressznek szerepe van a sebgyógyulás bonyolult folyamatában, de még sok a feltáratlan részlet. Vizsgálataink során jellemeztük az akut és krónikus sebek redox környezetét. Eredményeink alapján egyértelmű, hogy a redox környezet a krónikus emberi sebekben különbözik az akut sepektől, amit az intenzív gyulladás és a magasabb antioxidáns szintek tükröznek. Az egyes ROS specíesek valamint a redox szignál mechanizmusok szerepének további elemzése (follow-up vizsgálatok) célzott terápiás lehetőségeket is jelenthet a jövőben az elhúzódó sebgyógyulás kezelésére.

Felvetődik a kérdés, hogy vajon a sebfolyadékok vagy szérumok részletes redox- és gyulladásos biomarker-profilja képes lesz-e prediktív biomarkereket szolgáltatni a nem gyógyuló sebek azonosítására. A peroxinitrit-termelés és a PARiláció is jelen van a krónikus sebekben, és valószínűleg hozzájárul a szövetkárosodáshoz. Ezen folyamatok szerepének pontosabb tisztázása normális és patológiás sebekben további vizsgálatokat igényel, melyekre vonatkozóan már elkezdtek vizsgálatainkat.

Irodalmi adatok támasztják alá a PARP inhibitorok hatékonyságát számos betegségben. Ma már FDA engedéllyel rendelkező PARP inhibitorokat használnak daganatok terápiájában. Kísérletes adatok felvetik az olaparib potenciális hasznosságát súlyos égési sérülések esetén, illetve nem gyógyuló sebek esetén is.

8. SUMMARY

Research on oxidative stress is experiencing a renaissance. A wealth of research has demonstrated its role in many diseases. Oxidative stress-induced PARP activation is also implicated in many pathophysiological processes.

One of the main aims of our studies was to investigate the role of PARylation in skin physiological processes and wound healing. In our work, we specifically investigated the role of PARylation stimulated by oxidative/nitrosative stress. We examined whether the peroxynitrite-DNA damage- PARP activation pathway is present in the wound healing process in acute and chronic wounds. We also aimed to characterize the redox environment in normal skin and the wound healing process using oxidative stress markers.

In our studies, we demonstrated the presence of PAR in keratinocytes, sebocytes, hair follicles, endothelial cells and subcutaneous adipocytes in normal skin, indicating that PARP may regulate physiological functions in these cells.

Oxidative stress is known to play a role in the complex process of wound healing, but many details remain unexplored. We have characterised the redox environment of acute and chronic wounds. Based on our results, it is clear that the redox environment in chronic human wounds is clearly different from that in acute wounds, as reflected by intense inflammation and higher antioxidant levels. Further analysis of the role of specific ROS species and redox signalling mechanisms (follow-up studies) may provide targeted therapeutic options for the treatment of delayed wound healing in the future.

The question arises whether a detailed redox and inflammatory biomarker profile of wound fluids or sera will be able to provide predictive biomarkers for the identification of non-healing wounds. Peroxynitrite production and PARylation are also present in chronic wounds and are likely to contribute to tissue damage. Further studies are needed to clarify the role of these processes in normal and pathological wounds, and we have already begun our investigations.

Literature supports the effectiveness of PARP inhibitors in a number of diseases. Today, FDA-approved PARP inhibitors are used in the therapy of tumours. Experimental data also raise the potential utility of olaparib in severe burns and non-healing wounds.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006: 160(1):1-40.
2. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007: 39(1):44-84.
3. Sun Y, Oberley LW.: Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med.* 1996: 21(3):335-48.
4. Paravicini TM, Touyz RM.: NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008: 31 Suppl 2:S170-80.
5. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990: 280(1):1-8.
6. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993: 49(3):481-93.
7. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000: 899:136-47.
8. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004: 142(2):231-55.
9. Schäfer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res.* 2008: 58(2):165-71.
10. Kovacic P, Thurn LA. Cardiovascular toxicity from the perspective of oxidative stress, electron transfer, and prevention by antioxidants. *Curr Vasc Pharmacol.* 2005: 3(2):107-17.
11. Kehrer JP. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. *Teratology.* 2000: 62(4):235-6.
12. Liochev SI, Fridovich I. Superoxide and nitric oxide: consequences of varying rates of production and consumption: a theoretical treatment. *Free Radic Biol Med.* 2002: 33(1):137-41.
13. Schraufstatter .IU, Browne K, Harris A, Hyslop PA, Jackson JH, Quehenberger O, Cochrane CG. Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *J Clin Invest.* 1990: 85(2):554-62.

14. Cheeseman KH.: Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med.* 1993: 14(3):191-7.
15. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol.* 1996: 9(5):836-44.
16. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996: 271(5 Pt 1):C1424-37.
17. Crow JP, Ischiropoulos H. Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: in vivo marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 1996: 269:185-94.
18. Virág L, Szabó E, Gergely P, Szabó C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett.* 2003: 140-141:113-24.
19. Fujimoto Y, Tagano S, Ogawa K, Sakuma S, Fujita T. Comparison of the effects of nitric oxide and peroxynitrite on the 12-lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism of arachidonic acid in rabbit platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1998: 59(2):95-100.
20. Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996: 93(26):15069-74.
21. Liu L, Stamler JS. NO: an inhibitor of cell death. *Cell Death Differ.* 1999: 6(10):937-42.
22. Brüne B, von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999: 6(10):969-75.
23. Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide and apoptosis. *Vitam Horm.* 1999: 57:49-77.
24. Estévez AG, Spear N, Manuel SM, Barbeito L, Radi R, Beckman JS. Role of endogenous nitric oxide and peroxynitrite formation in the survival and death of motor neurons in culture. *Prog Brain Res.* 1998: 118:269-80.
25. Virág L, Salzman AL, Szabó C. Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J Immunol.* 1998: 161(7):3753-9.
26. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem.* 1994: 269(42):26066-75.

27. Frears ER, Zhang Z, Blake DR, O'Connell JP, Winyard PG. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite. *FEBS Lett.* 1996; 381(1-2):21-4.
28. Okamoto T, Akaike T, Nagano T, Miyajima S, Suga M, Ando M, Ichimori K, Maeda H. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 342(2):261-74.
29. Kovács K, Erdélyi K, Hegedűs C, Lakatos P, Regdon Z, Bai P, Haskó G, Szabó E, Virág L. Poly(ADP-ribosyl)ation is a survival mechanism in cigarette smoke-induced and hydrogen peroxide-mediated cell death. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53(9):1680-8.
30. Soloviev AI, Tishkin SM, Parshikov AV, Ivanova IV, Goncharov EV, Gurney AM. Mechanisms of endothelial dysfunction after ionized radiation: selective impairment of the nitric oxide component of endothelium-dependent vasodilation. *Br J Pharmacol.* 2003; 138(5):837-44.
31. Amacher DE. Reactive intermediates and the pathogenesis of adverse drug reactions: the toxicology perspective. *Curr Drug Metab.* 2006; 7(3):219-29.
32. Lipinski B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2011; 2011:809696.
33. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244(22):6049-55.
34. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2003; 91(3A):7A-11A.
35. Marczin N, El-Habashi N, Hoare GS, Bundy RE, Yacoub M. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 420(2):222-36.
36. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000; 408(6809):239-47.
37. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:715-748.
38. Szigeti KA, Galamb O, Kalmár A, Barták BK, Nagy ZB, Márkus E, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B. Role and alterations of DNA methylation during the aging and cancer. *Orv Hetil.* 2018; 159(1):3-15.
39. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009; 27(2):120-39.

40. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995; 41(12 Pt 2):1819-28.
41. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84(5):1404-7.
42. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. 2006;52(4):601-23.
43. Arany I, Brysk MM, Brysk H, Tying SK. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by differentiation and cytokines in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 220(3):618-22.
44. Qureshi AA, Hosoi J, Xu S, Takashima A, Granstein RD, Lerner EA. Langerhans cells express inducible nitric oxide synthase and produce nitric oxide. *J Invest Dermatol*. 1996; 107(6):815-21.
45. Wang R, Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE. Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. *J Invest Dermatol*. 1996; 106(3):419-27.
46. Rocha IM, Guillo LA. Lipopolysaccharide and cytokines induce nitric oxide synthase and produce nitric oxide in cultured normal human melanocytes. *Arch Dermatol Res*. 2001; 293(5):245-8.
47. Morhenn VB. Langerhans cells may trigger the psoriatic disease process via production of nitric oxide. *Immunol Today*. 1997; 18(9):433-6.
48. Dobrică EC, Banciu ML, Kipkorir V, Khazeei Tabari MA, Cox MJ, Simhachalam Kutikuppala LV, Găman MA. Diabetes and skin cancers: Risk factors, molecular mechanisms and impact on prognosis. *World J Clin Cases*. 2022;10(31):11214-11225.
49. Cotton SA, Herrick AL, Jayson MI, Freemont AJ. Endothelial expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in systemic sclerosis skin. *J Pathol*. 1999; 189(2):273-8.
50. Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1998; 25(2):314-7.
51. Karbach S, Croxford AL, Oelze M, Schüler R, Minwegen D, Wegner J, Koukes L, Yogev N, Nikolaev A, Reißig S, Ullmann A, Knorr M, Waldner M, Neurath MF, Li H, Wu Z, Brochhausen C, Scheller J, Rose-John S, Piotrowski C, Bechmann I, Radsak M, Wild P, Daiber A, von Stebut E, Wenzel P, Waisman A, Münzel T. Interleukin 17 drives vascular inflammation, endothelial dysfunction, and arterial hypertension in psoriasis-like skin disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34(12):2658-68.

52. Korkmaz A, Yaren H, Topal T, Oter S. Molecular targets against mustard toxicity: implication of cell surface receptors, peroxynitrite production, and PARP activation. *Arch Toxicol*. 2006; 80(10):662-70.
53. Szabó E, Virág L, Bakondi E, Gyüre L, Haskó G, Bai P, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C. Peroxynitrite production, DNA breakage, and poly(ADP-ribose) polymerase activation in a mouse model of oxazolone-induced contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2001; 117(1):74-80.
54. Zhao Y, Xie Y, Li X, Song J, Guo M, Xian D, Zhong J. The protective effect of proanthocyanidins on the psoriasis-like cell models via PI3K/AKT and HO-1. *Redox Rep*. 2022; 27(1): 200–211.
55. Buglak NE, Batrakova EV, Mota R, Bahnson ESM. Insights on Localized and Systemic Delivery of Redox-Based Therapeutics. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018:2468457.
56. Heller B, Wang ZQ, Wagner EF, Radons J, Bürkle A, Fehsel K, Burkart V, Kolb H. Inactivation of the poly(ADP-ribose) polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells. *J Biol Chem*. 1995; 270(19):11176-80.
57. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Soto M, Pérez JM. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors in cancer chemotherapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2006; 1(1):39-53.
58. Bürkle A. Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays*. 2001; 23(9):795-806.
59. De Vos M, Schreiber V, Dantzer F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem Pharmacol*. 2012; 84(2):137-46.
60. Durkacz BW, Omidiji O, Gray DA, Shall S. (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature*. 1980; 283(5747):593-6.
61. Kraus WL, Hottiger MO. PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles. *Mol Aspects Med*. 2013; 34(6):1109-23.
62. Schreiber V, Amé JC, Dollé P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem*. 2002; 277(25):23028-36.
63. Masson M, Rolli V, Dantzer F, Trucco C, Schreiber V, Fribourg S, Molinete M, Ruf A, Miranda EA, Niedergang C, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase: structure-function relationship. *Biochimie*. 1995; 77(6):456-61.
64. Ziegler M, Oei SL. A cellular survival switch: poly(ADP-ribosyl)ation stimulates DNA repair and silences transcription. *Bioessays*. 2001; 23(6):543-8.

65. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev.* 2002; 54(3):375-429.
66. Dantzer F, de La Rubia G, Ménissier-De Murcia J, Hostomsky Z, de Murcia G, Schreiber V. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry.* 2000; 39(25):7559-69.
67. de Murcia G, Huletsky A, Lamarre D, Gaudreau A, Pouyet J, Daune M, Poirier GG. Modulation of chromatin superstructure induced by poly(ADP-ribose) synthesis and degradation. *J Biol Chem.* 1986; 261(15):7011-7.
68. Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci.* 1995; 20(10):405-11.
69. Hassa PO, Covic M, Hasan S, Imhof R, Hottiger MO. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J Biol Chem.* 2001; 276(49):45588-97.
70. Chang WJ, Alvarez-Gonzalez R. The sequence-specific DNA binding of NF-kappa B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly (ADP-ribose) polymerase 1. *J Biol Chem.* 2001; 276(50):47664-70.
71. Bergeron MJ, Leclerc S, Laniel MA, Poirier GG, Guérin SL. Transcriptional regulation of the rat poly(ADP-ribose) polymerase gene by Sp1. *Eur J Biochem.* 1997; 250(2):342-53.
72. Boulikas T. Poly(ADP-ribosylated) histones in chromatin replication. *J Biol Chem.* 1990; 265(24):14638-47.
73. Nagele A. Poly(ADP-ribosyl)ation as a fail-safe, transcription-independent, suicide mechanism in acutely DNA-damaged cells: a hypothesis. *Radiat Environ Biophys.* 1995; 34(4):251-4.
74. Oliver FJ, Ménissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J.* 1999; 18(16):4446-54.
75. Panzeter PL, Realini CA, Althaus FR. Noncovalent interactions of poly(adenosine diphosphate ribose) with histones. *Biochemistry.* 1992; 31(5):1379-85.
76. Tanuma S, Yagi T, Johnson GS. Endogenous ADP ribosylation of high mobility group proteins 1 and 2 and histone H1 following DNA damage in intact cells. *Arch Biochem Biophys.* 1985; 237(1):38-42.
77. Cervellera MN, Sala A. Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J Biol Chem.* 2000; 275(14):10692-6.

78. Tanuma SI, Enomoto T, Yamada MA. Changes in the level of poly ADP-ribosylation during a cell cycle. *Exp Cell Res.* 1978; 117(2):421-30.
79. Kanai Y, Tanuma S, Sugimura T. Immunofluorescent staining of poly(ADP-ribose) in situ in HeLa cell chromosomes in the M phase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981; 78(5):2801-4.
80. Leduc Y, Lawrence JJ, De Murcia G, Poirier GG. Cell cycle regulation of poly(ADP-ribose) synthetase in FR3T3 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1988; 968(3):275-82
81. Bakondi E, Bai P, Szabó E E, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C, Virág L. Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50(1):91-8.
82. Virág L, Szabó E, Bakondi E, Bai P, Gergely P, Hunyadi J, Szabó C. Nitric oxide-peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Exp Dermatol.* 2002; 11(3):189-202.
83. Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Hilz H, Hickey R, Malkas L, Applegren N, Wu Y, Bers G, Smulson ME. The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex. *Biochemistry.* 1996; 35(36):11622-33.
84. Dantzer F, Nasheuer HP, Vonesch JL, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J. Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26(8):1891-8.
85. de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(14):7303-7.
86. Shieh WM, Amé JC, Wilson MV, Wang ZQ, Koh DW, Jacobson MK, Jacobson EL. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem.* 1998; 273(46):30069-72
87. Chen A. PARP inhibitors: its role in treatment of cancer. *Chin J Cancer.* 2011; 30(7):463-71.
88. Yi M, Dong B, Qin S, Chu Q, Wu K, Luo S. Advances and perspectives of PARP inhibitors. *Exp Hematol Oncol.* 2019; 11;8:29.
89. Slade D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. *Genes Dev.* 2020; 34(5-6):360-394.

90. Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays*. 2004; 26(8):882-93.
91. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*. 2002; 54(3):375-429.
92. Lonskaya I, Potaman VN, Shlyakhtenko LS, Oussatcheva EA, Lyubchenko YL, Soldatenkov VA. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *J Biol Chem*. 2005; 280(17):17076-83.
93. Cohen-Armon M, Visochek L, Rozensal D, Kalal A, Geistrikh I, Klein R, Bendetz-Nezer S, Yao Z, Seger R. DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol Cell*. 2007; 25(2):297-308.
94. Mazen A, Menissier-de Murcia J, Molinete M, Simonin F, Gradwohl G, Poirier G, de Murcia G. Poly(ADP-ribose)polymerase: a novel finger protein. *Nucleic Acids Res*. 1989; 17(12):4689-98.
95. de Murcia G, Ménissier de Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci*. 1994; 19(4):172-6.
96. de Murcia G, Jongstra-Bilen J, Ittel ME, Mandel P, Delain E. Poly(ADP-ribose) polymerase auto-modification and interaction with DNA: electron microscopic visualization. *EMBO J*. 1983; 2(4):543-8.
97. de Murcia G, Huletsky A, Lamarre D, Gaudreau A, Pouyet J, Daune M, Poirier GG. Modulation of chromatin superstructure induced by poly(ADP-ribose) synthesis and degradation. *J Biol Chem*. 1986; 261(15):7011-7.
98. de Murcia G, Schreiber V, Molinete M, Saulier B, Poch O, Masson M, Niedergang C, Ménissier de Murcia J. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem*. 1994; 138(1-2):15-24.
99. Smith S. The world according to PARP. *Trends Biochem Sci*. 2001; 26(3):174-9.
100. Kawaichi M, Ueda K, Hayaishi O. Multiple autopoly(ADP-ribosyl)ation of rat liver poly(ADP-ribose) synthetase. Mode of modification and properties of automodified synthetase. *J Biol Chem*. 1981; 256(18):9483-9.
101. Virág L, Szabó C. Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. *FASEB J*. 2001; 15(1):99-107.
102. Tanaka Y, Koide SS, Yoshihara K, Kamiya T. Poly (ADP-ribose) synthetase is phosphorylated by protein kinase C in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987; 148(2):709-17.
103. Bauer PI, Farkas G, Buday L, Mikala G, Meszaros G, Kun E, Farago A. Inhibition of DNA binding by the phosphorylation of poly ADP-ribose

- polymerase protein catalysed by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 187(2):730-6.
104. Bauer PI, Farkas G, Mihalik R, Kopper L, Kun E, Faragó A. Phosphorylation of poly(ADP-ribose)polymerase protein in human peripheral lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1223(2):234-9.
 105. Virág L, Szabó E, Bakondi E, Bai P, Gergely P, Hunyadi J, Szabó C. Nitric oxide-peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Exp Dermatol.* 2002; 11(3):189-202.
 106. Miwa M, Sugimura T. Splitting of the ribose-ribose linkage of poly(adenosine diphosphate-ribose) by a calf thymus extract. *J Biol Chem.* 1971; 246(20):6362-4.
 107. Miwa M, Tanaka M, Matsushima T, Sugimura T. Purification and properties of glycohydrolase from calf thymus splitting ribose-ribose linkages of poly(adenosine diphosphate ribose). *J Biol Chem.* 1974; 249(11):3475-82.
 108. Oka J, Ueda K, Hayaishi O, Komura H, Nakanishi K. ADP-ribosyl protein lyase. Purification, properties, and identification of the product. *J Biol Chem.* 1984; 259(2):986-95.
 109. Brochu G, Duchaine C, Thibeault L, Lagueux J, Shah GM, Poirier GG. Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1219(2):342-50.
 110. Davidovic L, Vodenicharov M, Affar EB, Poirier GG. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res.* 2001; 268(1):7-13.
 111. Hatakeyama K, Nemoto Y, Ueda K, Hayaishi O. Purification and characterization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Different modes of action on large and small poly(ADP-ribose). *J Biol Chem.* 1986; 261(32):14902-11.
 112. Hinshaw DB, Lodhi IJ, Hurley LL, Atkins KB, Dabrowska MI. Activation of poly [ADP-Ribose] polymerase in endothelial cells and keratinocytes: role in an in vitro model of sulfur mustard-mediated vesication. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999; 156(1):17-29.
 113. Farkas B, Magyarlaci M, Csete B, Nemeth J, Rablóczy G, Bernath S, Literáti Nagy P, Sümegi B. Reduction of acute photodamage in skin by topical application of a novel PARP inhibitor. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63(5):921-32.
 114. Szabó E, Virág L, Bakondi E, Gyüre L, Haskó G, Bai P, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C. Peroxynitrite production, DNA breakage, and poly(ADP-ribose) polymerase activation in a mouse model of oxazolone-induced contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 2001; 117(1):74-80.

115. Janssen OE, Hilz H. Differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes induced by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase and by related noninhibitory acids. *Eur J Biochem.* 1989; 180(3):595-602.
116. Miyamoto T, Kakizawa T, Hashizume K. Inhibition of nuclear receptor signalling by poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(4):2644-9.
117. Sander CS, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 2003; 148(5):913-22.
118. Obrosova IG, Minchenko AG, Frank RN, Seigel GM, Zsengeller Z, Pacher P, Stevens MJ, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors counteract diabetes- and hypoxia-induced retinal vascular endothelial growth factor overexpression. *Int J Mol Med.* 2004; 14(1):55-64.
119. Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, D'Amati G, Vergati M, Portarena I, Xu W, Kalish V, Zupi G, Zhang J, Graziani G. Systemic administration of GPI 15427, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, increases the antitumor activity of temozolomide against intracranial melanoma, glioma, lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(14):5370-9.
120. Plummer R, Jones C, Middleton M, Wilson R, Evans J, Olsen A, Curtin N, Boddy A, McHugh P, Newell D, Harris A, Johnson P, Steinfeldt H, Dewji R, Wang D, Robson L, Calvert H. Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(23):7917-23.
121. Géhl Z, Bai P, Bodnár E, Emri G, Remenyik É, Németh J, Gergely P, Virág L, Szabó É. Poly(ADP-ribose) in the skin and in melanomas. *Histol Histopathol.* 2012; 27(5):651-9.
122. Brunyánszki A, Hegedus C, Szántó M, Erdélyi K, Kovács K, Schreiber V, Gergely S, Kiss B, Szabó E, Virág L, Bai P. Genetic ablation of PARP-1 protects against oxazolone-induced contact hypersensitivity by modulating oxidative stress. *J Invest Dermatol.* 2010; 130(11):2629-37.
123. Lakatos P, Hegedűs C, Salazar Ayestarán N, Juarranz Á, Kövér KE, Szabó É, Virág L. The PARP inhibitor PJ-34 sensitizes cells to UVA-induced phototoxicity by a PARP independent mechanism. *Mutat Res.* 2016; 790:31-40.
124. Moore K. Injury Prevention and Trauma Mortality. *J Emerg Nurs.* 2016;42(5):457-8.
125. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *J Chin Med Assoc.* 2018; 81(2):94-101.
126. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res.* 2017; 58(1-2):81-94.

127. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117(7 Suppl):1e-S-32e-S.
128. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83(3):835-70.
129. Schäfer M, Werner S. Transcriptional control of wound repair. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23:69-92.
130. Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 2005; 13(5):452-61.
131. Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1780(11):1348-61.
132. Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt TK, Sen CK. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol Ther.* 2006; 13(1):211-20.
133. Ojha N, Roy S, He G, Biswas S, Velayutham M, Khanna S, Kuppusamy P, Zweier JL, Sen CK. Assessment of wound-site redox environment and the significance of Rac2 in cutaneous healing. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(4):682-91.
134. Yeoh-Ellerton S, Stacey MC. Iron and 8-isoprostane levels in acute and chronic wounds. *J Invest Dermatol.* 2003; 121(4):918-25.
135. James TJ, Hughes MA, Cherry GW, Taylor RP. Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers. *Wound Repair Regen.* 2003; 11(3):172-6.
136. Moseley R, Hilton JR, Waddington RJ, Harding KG, Stephens P, Thomas DW. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen.* 2004; 12(4):419-29.
137. Shukla A, Rasik AM, Patnaik GK. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing cutaneous wound. *Free Radic Res.* 1997; 26(2):93-101.
138. Rasik AM, Shukla A. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. *Int J Exp Pathol.* 2000; 81(4):257-63.
139. Gupta A, Singh RL, Raghubir R. Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. *Mol Cell Biochem.* 2002; 241(1-2):1-7.
140. Mudge BP, Harris C, Gilmont RR, Adamson BS, Rees RS. Role of glutathione redox dysfunction in diabetic wounds. *Wound Repair Regen.* 2002; 10(1):52-8.
141. Musalmah M, Nizrana MY, Fairuz AH, NoorAini AH, Azian AL, Gapor MT, Wan Ngah WZ. Comparative effects of palm vitamin E and alpha-tocopherol on

- healing and wound tissue antioxidant enzyme levels in diabetic rats. *Lipids*. 2005; 40(6):575-80.
142. Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D, Galeano M, Deodato B, Colonna M, Torre V, Russo G, Sardella A, Urna G, Campo GM, Cavallari V, Squadrito G, Squadrito F. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes*. 2001; 50(3):667-74.
 143. Senel O, Cetinkale O, Ozbay G, Ahçioğlu F, Bulan R. Oxygen free radicals impair wound healing in ischemic rat skin. *Ann Plast Surg*. 1997; 39(5):516-23.
 144. Banerjee J, Lodhi N, Nguyen BN. The Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 in Cutaneous Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2019; 8(12): 634–643.
 145. El-Hamoly T, El-Denshary ES, Saad SM, El-Ghazaly MA. 3-aminobenzamide, a poly (ADP ribose) polymerase inhibitor, enhances wound healing in whole body gamma irradiated model. *Wound Repair Regen*. 2015; 23(5):672-84.
 146. El-Hamoly T, Hegedűs C, Lakatos P, Kovács K, Bai P, El-Ghazaly MA, El-Denshary ES, Szabó É, Virág L. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 delays wound healing by regulating keratinocyte migration and production of inflammatory mediators. *Mol Med*. 2014; 20(1):363-71.
 147. Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Hilz H, Hickey R, Malkas L, Applegren N, Wu Y, Bers G, Smulson ME. The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex. *Biochemistry*. 1996; 35(36):11622-33.
 148. Ahmad A, Olah G, Herndon DN, Szabo C. The clinically used PARP inhibitor olaparib improves organ function, suppresses inflammatory responses and accelerates wound healing in a murine model of third-degree burn injury. *Br J Pharmacol*. 2018; 175(2):232-245.
 149. Sarras MP Jr, Mason S, McAllister G, Intine RV. Inhibition of poly-ADP ribose polymerase enzyme activity prevents hyperglycemia-induced impairment of angiogenesis during wound healing. *Wound Repair Regen*. 2014; 22(5):666-70.
 150. Zhou X, Patel D, Sen S, Shanmugam V, Sidawy A, Mishra L, Nguyen BN. Poly-ADP-ribose polymerase inhibition enhances ischemic and diabetic wound healing by promoting angiogenesis. *J Vasc Surg*. 2017; 65(4):1161-1169.
 151. Wang Y, Wang L, Zhang F, Zhang C, Deng S, Wang R, Zhang Y, Huang D, Huang K. Inhibition of PARP prevents angiotensin II-induced aortic fibrosis in rats. *Int J Cardiol*. 2013; 167(5):2285-93.

152. Carter R, Sykes V, Lanning D. Scarless fetal mouse wound healing may initiate apoptosis through caspase 7 and cleavage of PARP. *J Surg Res.* 2009; 156(1):74-9.
153. Ross R, Gillitzer C, Kleinz R, Schwing J, Kleinert H, Förstermann U, Reske-Kunz AB. Involvement of NO in contact hypersensitivity. *Int Immunol.* 1998; 10(1):61-9.
154. Malanga M, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) molecules formed during DNA repair in vivo. *J Biol Chem.* 1994; 269(26):17691-6.
155. Bakondi E, Bai P, Szabó E E, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C, Virág L. Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50(1):91-8.
156. Pachernik J, Hampl A, Soucek K, Kovariková M, Andrysík Z, Hofmanová J, Kozubík A. Multiple biological effects of inhibitors of arachidonic acid metabolism on human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 2002; 293(12):626-33.
157. Cals-Grierson MM, Ormerod AD. Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide.* 2004; 10(4):179-93.
158. Bakondi E, Bai P, Erdélyi K, Szabó C, Gergely P, Virág L. Cytoprotective effect of gallotannin in oxidatively stressed HaCaT keratinocytes: the role of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Dermatol.* 2004; 13(3):170-8.
159. Bai P, Bakondi E, Szabó E, Gergely P, Szabó C, Virág L. Partial protection by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors from nitroxyl-induced cytotoxicity in thymocytes. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(12):1616-23.
160. Bakondi E, Gönczi M, Szabó E, Bai P, Pacher P, Gergely P, Kovács L, Hunyadi J, Szabó C, Csernoch L, Virág L. Role of intracellular calcium mobilization and cell-density-dependent signaling in oxidative-stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2003; 121(1):88-95.
161. Bai P, Hegedus C, Szabó E, Gyüre L, Bakondi E, Brunyánszki A, Gergely S, Szabó C, Virág L. Poly(ADP-ribose) polymerase mediates inflammation in a mouse model of contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 2009; 129(1):234-8.
162. Janssen OE, Hilz H. Differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes induced by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase and by related noninhibitory acids. *Eur J Biochem.* 1989; 180(3):595-602.
163. Hsu CL, Yen GC. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Mol Nutr Food Res.* 2006; 50(11):1072-9.

164. Szántó M, Bai P. The role of ADP-ribose metabolism in metabolic regulation, adipose tissue differentiation, and metabolism. *Genes Dev.* 2020; 34(5-6):321-340.
165. Rosenfield RL, Kentsis A, Deplewski D, Ciletti N. Rat preputial sebocyte differentiation involves peroxisome proliferator-activated receptors. *J Invest Dermatol.* 1999; 112(2):226-32.
166. Kim MJ, Deplewski D, Ciletti N, Michel S, Reichert U, Rosenfield RL Limited cooperation between peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptor agonists in sebocyte growth and development. *Mol Genet Metab.* 2001; 74(3):362-9.
167. Ju BG, Rosenfeld MG. A breaking strategy for topoisomerase IIbeta/PARP-1-dependent regulated transcription. *Cell Cycle.* 2006; 5(22):2557-60.
168. Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1780(11):1348-61.
169. Pemberton PW, Aboutwerat A, Smith A, Warnes TW. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis improves glutathione status but fails to reduce lipid peroxidation. *Redox Rep.* 2006; 11(3):117-23.
170. Spear N, Aust SD. Thiol-mediated NTA-Fe(III) reduction and lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 312(1):198-202.
171. Franco R, Navarro G, Martínez-Pinilla E. Antioxidant Defense Mechanisms in Erythrocytes and in the Central Nervous System. *Antioxidants (Basel).* 2019; 8(2):46.
172. Valaei K, Taherkhani S, Arazi H, Suzuki K. Cardiac Oxidative Stress and the Therapeutic Approaches to the Intake of Antioxidant Supplements and Physical Activity. *Nutrients.* 2021; 13(10):3483.
173. Neri M, Fineschi V, Di Paolo M, Pomara C, Riezzo I, Turillazzi E, Cerretani D. Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after myocardial infarction. *Curr Vasc Pharmacol.* 2015; 13(1):26-36.
174. Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative stress in COPD. *Chest.* 2013; 144(1):266-273.
175. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health.* 2013; 10(9):3886-90.
176. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010; 49(11):1603-16.

177. García N, Zazueta C, Aguilera-Aguirre L. Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2017: 5853238.
178. da Fonseca LJS, Nunes-Souza V, Goulart MOF, Rabelo LA. Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis: What the Future Might Hold regarding Novel Biomarkers and Add-On Therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 2019:7536805.
179. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res*. 2017: 39(1):73-82.
180. Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis*. 2014: 42 Suppl 3:S125-5.
181. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther*. 2021: 17(1):22-2.
182. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013: 12(12):931-47.
183. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010: 49(11):1603-16.
184. Sukkar SG, Rossi E. Oxidative stress and nutritional prevention in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev*. 2004: 3(3):199-206.
185. Khaitan BK, Sindhuja T. Autoimmunity in vitiligo: Therapeutic implications and opportunities. *Autoimmun Rev*. 2022: 21(1):102932.
186. Duarte-Delgado NP, Cala MP, Barreto A, Rodríguez C LS. Metabolites and metabolic pathways associated with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J Transl Autoimmun*. 2022: 5:100150.
187. Zhang CX, Wang HY, Yin L, Mao YY, Zhou W. Immunometabolism in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Transl Autoimmun*. 2020: 3:100046.
188. Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, Mikolajczyk TP. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J Physiol Pharmacol*. 2019: 70(6).
189. Darenskaya MA, Kolesnikova LI, Kolesnikov SI. Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. *Bull Exp Biol Med*. 2021:171(2):179-189.
190. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003:17(1):24-38.

191. Ivanov AV, Valuev-Elliston VT, Ivanova ON, Kochetkov SN, Starodubova ES, Bartosch B, Isaguliants MG. Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. *Oxid Med Cell Longev*. 2016: 8910396.
192. Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF, Fedorova MS, Pokrovsky AV, Melnikova NV, Kaprin AD, Moskalev AA, Snezhkina AV. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*. 2016: 7(29):44879-44905.
193. Cabello-Verrugio C, Simon F, Trollet C, Santibañez JF. Oxidative Stress in Disease and Aging: Mechanisms and Therapies 2016. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:4310469.
194. Koutsaliaris IK, Moschonas IC, Pechlivani LM, Tsouka AN, Tselepis AD. Inflammation, Oxidative Stress, Vascular Aging and Atherosclerotic Ischemic Stroke. *Curr Med Chem*. 2022: 29(34):5496-5509.
195. Trüeb RM. Oxidative stress and its impact on skin, scalp and hair. *Int J Cosmet Sci*. 2021: 43 Suppl 1:S9-S13.
196. Prie BE, Iosif L, Tivig I, Stoian I, Giurcaneanu C. Oxidative stress in androgenetic alopecia. *J Med Life*. 2016: 9(1):79-83.
197. Prie BE, Voiculescu VM, Ionescu-Bozdog OB, Petrutescu B, Iosif L, Gaman LE, Clatici VG, Stoian I, Giurcaneanu C. Oxidative stress and alopecia areata. *J Med Life*. 2015: 8 Spec Issue(Spec Issue):43-6.
198. Trüeb RM. The impact of oxidative stress on hair. *Int J Cosmet Sci*. 2015: 37 Suppl 2:25-30.
199. Dobrică EC, Cozma MA, Găman MA, Voiculescu VM, Găman AM. The Involvement of Oxidative Stress in Psoriasis: A Systematic Review. *Antioxidants (Basel)*. 2022: 11(2):282.
200. Medovic MV, Jakovljevic VL, Zivkovic VI, Jeremic NS, Jeremic JN, Bolevich SB, Ravic Nikolic AB, Milicic VM, Srejovic IM. Psoriasis between Autoimmunity and Oxidative Stress: Changes Induced by Different Therapeutic Approaches. *Oxid Med Cell Longev*. 2022: 2022:2249834.
201. Wójcik P, Gęgotek A, Źarković N, Skrzydlewska E. Oxidative Stress and Lipid Mediators Modulate Immune Cell Functions in Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021: 22(2):723.
202. Péter I, Jagicza A, Ajtay Z, Kiss I, Németh B. Psoriasis and oxidative stress. *Orv Hetil*. 2016:157(45):1781-1785.
203. Wang Y, Li S, Li C. Perspectives of New Advances in the Pathogenesis of Vitiligo: From Oxidative Stress to Autoimmunity. *Med Sci Monit*. 2019: 25:1017-1023.

204. He S, Xu J, Wu J. The Promising Role of Chemokines in Vitiligo: From Oxidative Stress to the Autoimmune Response. *Oxid Med Cell Longev*. 2022: 8796735.
205. Baek J, Lee MG. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Rep*. 2016; 21(4):164-9.
206. Lephart ED. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Res Rev*. 2016; 31:36-5.
207. Nakai K, Tsuruta D. What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and Oxidative Stress in Skin Diseases? *Int J Mol Sci*. 2021; 22(19):10799.
208. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005; 15(4):316-28.
209. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 482(3):419-425.
210. Wang Z, Li S, Cao Y, Tian X, Zeng R, Liao DF, Cao D. Oxidative Stress and Carbonyl Lesions in Ulcerative Colitis and Associated Colorectal Cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2016: 9875298.
211. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, Knight AR, Taylor EL, Oettrich J, Ruskovska T, Gasparovic AC, Cuadrado A, Weber D, Poulsen HE, Grune T, Schmidt HH, Ghezzi P. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2015; 23(14):1144-70.
212. Babbush KM, Babbush RA, Khachemoune A The Therapeutic Use of Antioxidants for Melasma. *J Drugs Dermatol*. 2020; 19(8):788-792.
213. Liu S, Luo W, Wang Y. Emerging role of PARP-1 and PARthanatos in ischemic stroke. *J Neurochem*. 2022; 160(1):74-8.
214. Kim DS, Camacho CV, Kraus WL. Alternate therapeutic pathways for PARP inhibitors and potential mechanisms of resistance. *Exp Mol Med*. 2021; 53(1):42-51.
215. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*. 2019; 99(1):665-706.
216. Rousselle P, Braye F, Dayan G. Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019; 146:344-365.
217. Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol*. 2007; 257:143-79.

218. Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(12):2085.
219. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012; 49(1):35-43.
220. Ogawa R. Keloid and Hypertrophic Scars Are the Result of Chronic Inflammation in the Reticular Dermis. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(3):606.
221. Cohen BE, Geronemus RG, McDaniel DH, Brauer JA. The Role of Elastic Fibers in Scar Formation and Treatment. *Dermatol Surg.* 2017; 43 Suppl 1:S19-S24.
222. Keskin ES, Keskin ER, Öztürk MB, Çakan D. The Effect of MMP-1 on Wound Healing and Scar Formation. *Aesthetic Plast Surg.* 2021; 45(6):2973-2979.
223. Bootun R. Effects of immunosuppressive therapy on wound healing. *Int Wound J.* 2013; 10(1):98-104.
224. Stechmiller JK. Understanding the role of nutrition and wound healing. *Nutr Clin Pract.* 2010; 25(1):61-8.
225. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol.* 2015; 173(2):370-8.
226. Liaudet L, Pacher P, Mabley JG, Virág L, Soriano FG, Haskó G, Szabó C. Activation of poly(ADP-Ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165(3):372-7.
227. Pemberton PW, Aboutwerat A, Smith A, Warnes TW. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis improves glutathione status but fails to reduce lipid peroxidation. *Redox Rep.* 2006; 11(3):117-23.
228. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2000; 5(1):40-6.
229. Redondo P, Bandrés E, Solano T, Okroujnov I, García-Foncillas J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and melanoma. N-acetylcysteine downregulates VEGF production in vitro. *Cytokine.* 2000; 12(4):374-8.
230. Redondo P, Jimenez E, Perez A, García-Foncillas J. N-acetylcysteine downregulates vascular endothelial growth factor production by human keratinocytes in vitro. *Arch Dermatol Res.* 2000; 292(12):621-8.
231. Pan SC, Wu LW, Chen CL, Shieh SJ, Chiu HY. Deep partial thickness burn blister fluid promotes neovascularization in the early stage of burn wound healing. *Wound Repair Regen.* 2010; 18(3):311-8.

- 232. Abd-El-Aleem SA, Ferguson MW, Appleton I, Kairsingh S, Jude EB, Jones K, McCollum CN, Ireland GW. Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers. *J Pathol.* 2000; 191(4):434-42.
- 233. Vorauer-Uhl K, Fürnschließ E, Wagner A, Ferko B, Katinger H. Reepithelialization of experimental scalds effected by topically applied superoxide dismutase: controlled animal studies. *Wound Repair Regen.* 2002; 10(6):366-71.
- 234. Chan WY, Brown LJ, Reid L, Joshua AM. PARP Inhibitors in Melanoma-An Expanding Therapeutic Option?. *Cancers.* 2021; 13(18):4520.
- 235. Ahmad A, Olah G, Herndon DN, Szabo C. The clinically used PARP inhibitor olaparib improves organ function, suppresses inflammatory responses and accelerates wound healing in a murine model of third-degree burn injury. *Br J Pharmacol.* 2018; 175(2):232-245.
- 236. Schäfer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res.* 2008 (2):165-71.

10. TÁRGYSZAVAK/ KEY WORDS

poli-ADP riboziláció/ poly-ADP ribosylation

PARP-1 enzim/ PARP-1 enzyme

oxidatív stressz/ oxidative stress

elhúzódó sebgyógyulás/ prolonged wound healing

peroxinitrit/ peroxynitrite

nitrotirozin/ nitrotyrosine

DNS károsodás/ DNA damage

biomolekula károsodás/ biomolecular damage

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom mindenkinek, aki segítette munkámat a laboratóriumban és az értekezés elkészítése során.

Ezúton szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Szabó Éva egyetemi docensnek az éveken át tartó sok segítségért, türelemért, támogatásért és biztatásért.

Nagyon köszönöm a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézet dolgozóinak a munkám során kapott sok segítségért. Külön köszönettel tartozom a szövettani, immunhisztokémiai vizsgálatokban nyújtott gyakorlati segítségért Herbály Mihályné Erzsike asszisztensnőnek.

Köszönöm kollegáimnak, a DE Bőrgyógyászati Klinika dolgozóinak a segítséget és együttműködést a kutatások megvalósításában.

Szívből köszönöm Dr. Remenyik Éva és Dr. Szegedi Andrea professzor asszonyoknak, a DE Bőrgyógyászati Klinika korábbi és jelenlegi igazgatóinak a támogatást, hogy a klinikum mellett PhD tanulmányokat folytathattam.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak: férjemnek és gyermekeimnek a rengeteg türelmet, biztatást és támogatást, amivel mindvégig mellettem álltak, illetve az időt, amit a dolgozatra fordíthattam.

12. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**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/352/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bodnár Edina

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bodnár, E.**, Bakondi, E., Kovács, K., Hegedűs, C., Lakatos, P., Robaszkiewicz, A., Regdon, Z., Virág, L., Szabó, É.: Redox Profiling Reveals Clear Differences between Molecular Patterns of Wound Fluids from Acute and Chronic Wounds.
Oxid. Med. Cell. Longev. 2018, 1-12, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2018/5286785>
IF: 4.868
2. Géhl, Z., Bai, P., **Bodnár, E.**, Emri, G., Remenyik, É., Németh, J., Gergely, P., Virág, L., Szabó, É.: Poly(ADP-ribose) in the skin and in malignant melanomas.
Histol. Histopath. 27, 651-659, 2012.
IF: 2.281

További közlemények

3. **Bodnár, E.**: Korunk népbetegsége: a körömgomba. Szisztémás antimikotikum vagy körömlakk segíthet?
Med. Tribune. 5, 17-19, 2018.
4. Pogácsás, L., Felföldi, N., **Bodnár, E.**, Csordás, A., Szabó, É.: A krónikus vénás elégtelenség klasszifikációja és korszerű kezelése.
Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 93 (3), 108-113, 2017.
5. Szima, G. Z., Janka, E. A., Kovács, A., Bortély, B., **Bodnár, E.**, Sawhney, I., Szabó, É., Remenyik, É.: Comparison of hair removal efficacy and side effect of neodymium: yttrium-aluminum-garnet laser and intense pulsed light systems (18-month follow-up).
J. Cosmet. Dermatol. 16 (2), 193-198, 2017.
IF: 1.529





6. Kiss, B. K., Bíró, T., Bai, P., Gáspár, K., **Bodnár, E.**, Kertész, Z., Szikszai, Z., Juhász, I., Remenyik, É., Hunyadi, J., Kiss, Á. Z.: A fizikai fényvédők biológiai hatásainak áttekintése = Overview of the biological effects of physical sunscreens.
Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 90 (3), 94-99, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2014.90.3.5>
7. **Bodnár, E.**: Gombás fertőzések kezelése a háziorvosi gyakorlatban.
Háziorv. Továbbk. Szle. 18, 251-256, 2013.
8. **Bodnár, E.**: Gombaellenes hatóanyagok.
Gyógyszerész. Továbbk. 6 (4), 25-28, 2012.
9. **Bodnár, E.**: Gombaellenes hatóanyagok.
Háziorv. Továbbk. Szle. 17 (5), 261-264, 2012.
10. Szikszai, Z., Kertész, Z., **Bodnár, E.**, Borbíró, I., Kiss, B. K., Angyal, A., Csedreki, L., Furu, E., Szoboszlai, Z., Kiss, Á. Z., Hunyadi, J.: Nuclear microprobe investigation of the penetration of ultrafine zinc oxide into human skin affected by atopic dermatitis.
Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res. B. 269 (20), 2278-2280, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nimb.2011.02.055>
IF: 1.211
11. Szegedi, A., **Bodnár, E.**, Remenyik, É.: Ustekinumabbal szerzett tapasztalatok a debreceni Bőrgyógyászati Klinikán = Our experiences with Ustekinumab at the Department of Dermatology in the University of Debrecen.
Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 87 (3), 102-106, 2011.
12. Szikszai, Z., Kertész, Z., **Bodnár, E.**, Major, I., Borbíró, I., Kiss, Á. Z., Hunyadi, J.: Nuclear microprobe investigation of the penetration of ultrafine zinc oxide into intact and tape-stripped human skin.
Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B-Beam Interact. Mater. Atoms. 268 (11-12), 2160-2163, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nimb.2010.02.040>
IF: 1.042
13. Szegedi, A., Herédi, E., **Bodnár, E.**, Remenyik, É.: Humira terápia bevezetése súlyos psoriasis vulgarisban szenvedő betegeknél.
Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 85 (4), 193-195, 2009.
14. **Bodnár, E.**, Irinyi, B., Barta, Z., Hunyadi, J., Remenyik, É., Szegedi, A.: Psoriasis és gluténszenzitív enteropathia együttes előfordulása = coexistence of psoriasis and coeliac disease.
Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 84 (4), 120-123, 2008.
15. Herédi, E., **Bodnár, E.**, Schmidt, E., Hunyadi, J., Szegedi, A.: Biológiai terápia psoriasis vulgarisban történő alkalmazása során szerzett tapasztalataink.
Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 83 (3), 97-101, 2007.





16. Juhász, I., **Bodnár, E.**, Péter, Z., Erdei, I.: Az időskori égések sajátosságai: az égések élettani jelentősége.

Magy. Orv. 13 (5), 20-24, 2005.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,931

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,149**

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

Debrecen, 2023.07.19.

