

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az ultraibolya sugárzás által kiváltott ciklobután-
pirimidin dimer (CPD) függő folyamatok vizsgálata**

Fidrus Eszter

Témavezető: Dr. Remenyik Éva



DEBRECENI EGYETEM

Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

AZ ULTRAIBOLYA SUGÁRZÁS ÁLTAL KIVÁLTOTT CIKLOBUTÁN- PIRIMIDIN DIMER(CPD) FÜGGŐ FOLYAMATOK VIZSGÁLATA

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében

Egészségtudományok tudományágban

Írta: Fidrus Eszter, okleveles biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok doktori iskolája

(Megelőző Orvostan és Népegészségtan programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Remenyik Éva

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, MTA doktora

Dr. Szatmári István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, MTA doktora

tagok: Dr. Medvecz Márta, PhD

Dr. Bacsó Zsolt, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Bőrgyógyászati Klinika tanterme

2021. szeptember 16. 13 óra

1. Bevezetés

Az ultraibolya (UV) sugárzás számos élettani és patológiás folyamatért felelős. Az általa indukált, DNS-t érintő elváltozások - 6-4 fototermékek (6-4PP), ciklobután pirimidin dimerek (CPD) - felhalmozódása a DNS szál torzulásának következtében tartós mutációk létrejöttét idézheti elő. A DNS károsodás javítását humán sejtekben a nukleotid excíziós repair (NER) rendszer végzi. A NER működése kémiaiailag különböző módokon befolyásolható. Számos molekula esetében kimutatták, hogy képesek a NER működésének *in vitro* gátlására. Ezen gátló hatású molekulák egy része az orvosi gyakorlatban is használt, például a kemoterápiás szerként alkalmazott veliparib és arzén-trioxid, vagy a diuretikus hatású spironolactone. Napjainkban ugyancsak jelentős az érdeklődés a különböző növényi eredetű hatóanyagok vizsgálatát illetően. A *Silibum marianum* magjából nyert silymarin antioxidáns hatásának köszönhetően a bőrgyógyászati vizsgálatok ígéretes célpontja. Felhasználása azonban korlátozott a hatóanyagok nehézkes biohasznosulása következtében.

1.1. Az UV sugárzás hatásai a humán bőrön

A földfelszínre elérő UV sugárzás (UVA és UVB) mindkét típusa fotokémiaiailag aktív. Az alacsonyabb hullámhosszúságú UVB tartomány elnyelődik az epidermiszben, a dermis sejteit kevésbé érinti. Magasabb energiája révén azonban az UVA-nál jóval kisebb dózisban képes sejtkárosító hatást kifejteni. Jellemzően DNS léziók létrejöttét eredményezi. Az UVB sugárzás által kiváltott léziók leggyakoribb formái a ciklobután-pirimidin dimer (CPD), valamint 6-4 pirimidin-pirimidon (6-4PP) fotoproduktumok. Az alacsonyabb energiájú UVA-t endogén kromofór molekulák (pl. porfirinek, bilirubin, melanin, flavinok) abszorbeálják. Ezek a fotoszenzor vegyületek más molekulákkal lépnek reakcióba, így reaktív oxigéngyököket (ROS) képződését idézik elő.

A bőrt érő, nagyobb dózisú UV-sugárzás akut formában napégést (dermatitis solaris), hám hyperplasiát, pigmentációt és immunszuppressziót vált ki. A hosszú távú, krónikus UV-sugárzásnak való kitettség pedig jelentősen megnöveli a bőröregeedés, illetve a melanoma és nem-melanoma típusú bőrdaganatok kialakulásának valószínűségét.

1.2. A nukleotid excíziós repair (NER)

Humán sejtekben az UV-sugárzás által kiváltott CPD és 6-4PP fotoléziók javítását a nukleotid excíziós repair enzim komplex végzi. A komplex képes felismerni a DNS szálon keletkező torzulásokat, majd a léziót tartalmazó nukleotidszakasz kihalásával és a komplementer szárról történő szintézisével helyreállítani a DNS struktúrát. A NER a 6-4PP-k javításában

megfelelően, a CPD léziók javításában viszont jóval kevésbé hatékony. Emiatt a CPD léziók szerepe az UV-indukálta mutagenézisben kiemelkedő. A NER-nek két típusát különböztetjük meg: a genom teljes részén funkcionáló „*global-genome (GG)*” a genom teljes részén, a „*transcription-coupled (TC)*” NER pedig a transzkripciósan aktív régiókban képes működni. Az eukariota sejtekben a NER repair mellett számos egyéb sejszintű mechanizmus is létezik, ami segít megelőzni az UV-sugárzás hosszú távú, káros hatásait és a sejt tumoros transzformációját. Az UV-indukálta sejtciklus blokk, az apoptózis indukció és az autofágia a sérült genom utódsejtekbe történő továbbörökítését, ezáltal a DNS tartós, irreverzibilis változását hivatott megelőzni a repair folyamatok mellett.

1.3.NER gátló molekulák a klinikumban

A NER működése kémiai úton befolyásolható. Az utóbbi években több molekula esetében igazolták, hogy képes a NER egyes fehérjéinek *in vitro* gátlására és a javítási folyamat akadályozására. Ezen molekulák közül nem egy a klinikai gyakorlatban is használatban van. A bizonyított NER gátló tulajdonság miatt fennáll a lehetősége, hogy az ilyen molekulák *in vivo* alkalmazása megnövelheti az UV-indukálta tumorigenezis esélyét.

A *veliparib* a Poly [ADP-ribóz] polimeráz (PARP) fehérjecsald – köztük a DNS károsodás downstream folyamataiban aktívan részt vevő PARP1 protein - specifikus inhibitora. Tanulmányok szerint a PARP1 ezim gátlása a sejtek megnövekedett érzékenységét váltja ki UVB besugárzásra. A PARP1 aktivitás védő hatása az UVB-indukálta carcinogenezissel szemben ez alapján feltételezhető. Ennek ellenére a PARP1 jelentős overexpresszióját különféle tumoros szövetben megfigyelték, amely rendkívül rossz prognózzal jár. Emiatt a *veliparib*ot és a PARP1 egyéb gátlószereit tumoros megbetegedések kezelését célzó klinikai tesztek során alkalmazzák.

A *resveratrol* növényi eredetű, gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatású molekula. Ezen kívül képes növelni a sejtek apoptotikus válaszát UV besugárzást követően, így csökkentheti a malignusan transzformálódó sejtek túlélését. Mindezek mellett a *resveratrol* a 8-oxoguaninok, a szimplaszálú DNS törések, valamint a CPD léziók javítási hatékonyságát is bizonyítottan csökkenti. Utóbbiak miatt a *resveratrol* hatása az UVB-indukálta mutagenézisre ellentmondásos.

A *spironolactone* mineralocorticoid antagonist a klinikumban kálium-megtakarító diuretikumként használatos. A gyógyászatban progresszív szívelégtelenségben és hipertóniában alkalmazzák. *In vitro* kísérletekben azonban bizonyították, hogy keratinocitákban a NER részét képező XPB protein gyors proteozómális lebomlását váltja ki.

Bár a spironolactone *in vivo* régóta használatos, nincsenek adataink arra nézve, hogy az inhibitor alkalmazása megnövelné az UV-indukálta bőrrák kialakulásának kockázatát.

A különböző anorganikus arzén származékok jól ismert genotoxikus és mutagén vegyületek, az UVB sugárzással összekötött ko-karcinogén tulajdonságuk szintén bizonyított. Utóbbiért a NER komplex XPC fehérjéjének gátlása részben felelős lehet. Az *arzén-trioxidot* az előbbieket ellenére régóta eredményesen használják az akut promielocitás leukémia terápiájában. Az arzén-trioxid fokozza a sejt szintű apoptotikus választ multidrug-rezisztens sejtvonalakon is, valamint hatásai között autofágia indukció, ROS-mediálta folyamatok, illetve immunológiai változások is szerepet kapnak. Emiatt az arzén-trioxid hatása az UV-indukálta tumorigenezisre ellentmondásos.

1.4. A silymarin felhasználása bőrgyógyászati vizsgálatokban

A máriatövis (*Silybum marianum*) magjából nyert silymarin számos bioaktív komponenset tartalmaz (pl. silibinin, silychristin, silydianine, taxifolin). A komplex antioxidáns, gyulladáscsökkentő, antifibrotikus és immunmoduláns hatásai régóta ismertek. Emellett kimutatták védő hatását az UV-indukálta apoptotikus és carcinogén folyamatokra. Más tanulmányokban viszont a silymarin erős fényérzékenyítőként viselkedett UV-sugárzásnak kitett keratinocitákon. A bőrön történő alkalmazás során szintén problémát jelent a silymarin rendkívül rossz vízoldékonysága, és az ebből adódó rendkívül alacsony biohasznosulása. Utóbbi a hatóanyag megfelelő, penetrációt segítő formulázása révén bizonyos mértékben kompenzálható.

2. Célkitűzés

Az UV-sugárzás által indukált CPD képződés nagymértékben hozzájárul a károsodott sejtek mutageneziséhez, és ezáltal patológiás körülmények között a későbbi bőr tumorigenezishez. A CPD léziók hosszabb távú hatása nagyban függ a sejt belső repair mechanizmusainak működésétől. Ezen rendszer működésének csökkenése vagy gátlása az UV sugárzás mutagén hatásának fokozódását eredményezheti.

A veliparib, a resveratrol, a spironolactone és az arzén-trioxid a gyógyászatban *in vivo* alkalmazott molekulák, melyek mindegyike bizonyítottan képes a NER működésének gátlására. A növényi eredetű silymarin bőrgyógyászati felhasználása hasonlóan ellentmondásos, amennyiben a hatóanyag antioxidáns és fényvédő tulajdonságait mellett a kivonat fototoxikus tulajdonságait is leírták.

Kutatásaink során ezért a következő célokat tűztük ki:

1. A veliparib, a resveratrol, a spironolactone és az arzén-trioxid NER gátló képességének igazolása és az oldatok UVB-mutagenezisre kifejtett hatásának vizsgálata *in vitro* epitheliális sejt kultúrákon.
2. Az előbbi molekulák hatásának vizsgálata az UVB-indukálta apoptózisra, sejtciklus blokkra, autofágiára és protein expressziós változásokra.
3. Különböző eredetű silymarin kivonatok hatásának vizsgálata UVA és UVB irradiált humán keratinocita sejtek életképességére.
4. Különböző eredetű és formulációjú silymarin oldatok hatásának vizsgálata az UVA-indukálta ROS képződésre, CPD akkumulációra és mutációs rátára.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejtkultúrák

A kísérletekhez immortalizált HaCaT (Cultured human keratinocyte) és CHO (Chinese hamster ovary) sejtvonalat használtunk. A sejteket 4500 mg/ml glükózt tartalmazó, L-glutaminnal kiegészített DMEM (Dulbecco's modified eagle media) oldatban tenyésztettük, amelyet 10% hő-inaktivált FBS-sel (fetal bovine serum) és 0,5% antibiotikum/antimikotikum oldattal (penicillin-streptomycin-amphotericin B) egészítettünk ki.

3.2. A sejtek kezelése

A CHO és HaCaT sejteket UV irradiációt megelőzően 25 μ M veliparib, 10-50 μ M resveratrol, 5-25 μ M spironolactone vagy 0,5-4 μ g/ml arzén-trioxid oldattal kezeltük. A silymarinnal végzett kísérletekhez háromféle forrásból származó hatóanyagot használtunk fel: laboratóriumi felhasználásra előállított (Sigma) silymarin port (10-250 μ g/ml); a táplálék kiegészítőként kereskedelmi forgalomban lévő TEVA-Silegon tablettá porításából származó silymarin oldatot (10-250 μ g/ml); valamint a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karán működő Gyógyszertechnológia Tanszék munkatársai által előállított négy, különböző formulációjú silymarin tartalmú oldatot (250 μ g/ml). Utóbbi esetben az oldatok összetétele a silymarin sejtekbe történő hatékonyabb penetrációját segíti elő.

3.3. UV irradiáció

A sejteket vékony réteg 1 g/L glükózzal kiegészített DPBS-sel fedtük le a besugárzás időtartamára. UVA besugárzás esetén a sejteket egyszeri 10-20 J/cm² UVA sugárzásnak (PUVA 800, H. Waldmann GmbH & Co.) tettük ki. A sejtek UVB irradiációja esetén kísérlettől függően 10 vagy 20 mJ/cm² UVB sugárzást (TL-20W/12 RS UVB csövek) alkalmaztunk.

3.4. CPD-specifikus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

24 órával az UV besugárzást követően a sejtek felülúszóját eltávolítottuk, majd az élő (letapadt) sejtekből genomi DNS-t izoláltunk. A DNS kivonásához Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kitet használtunk. A CPD-specifikus ELISA mérésekhez a korábban Boros et al. által beállított protokollt alkalmaztuk. A CPD léziók detektálása anti-CPD monoklonális antitesttel (TDM-2, 1:1500 hígítás, Cosmo Bio Co., Ltd.) történt.

3.5. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay

24 órával a besugárzást követően a sejtek felülúszóját eltávolítottuk, a sejteket PBS-sel mostuk, majd 100 µL/well 200 µg/mL MTT-t tartalmazó, fenolred-mentes DMEM- borítottuk be. A sejteket 3 óráig inkubáltuk 37°C-on. A keletkezett formazánkristályokat 0,04 M izopropanolban oldott HCl oldattal oldottuk fel. Az abszorbancia értékeket 590 nm-en olvastuk le (háttér kivonás: 620 nm).

3.6. Apoptosis assay

A sejtek viabilitását 24/48 órával besugárzás után vizsgáltuk Alexa Fluor 488-konjugált Annexin V és propidium-jodid kettős jelölést követő áramlási citometriás mérésrel. A sejtek festését a gyártó útmutatásai szerint végeztük. A sejtek áramlási citometriás analizéséhez FACS Calibur (áramlási citométert és CellQuestPro 5.2 szoftvert használtunk. A fluoreszcencia intenzitást FL-1 (Annaxin V) és FL-3 (propidium-jodid) csatornán mértük, az adatok kiértékeléséhez FlowJo 10.6.2. szoftvert használtunk.

3.7. ROS (reaktív oxigéngyök) produkciós mérések

A sejtek intracelluláris ROS termelését DHE (dihydro-ethidium) festést követő áramlási citometriás mérésrel végeztük. UVA besugárzás után a sejteket DPBS-sel mostuk, majd 200 nM DHE-t tartalmazó PBS oldattal kezeltük 30 percig. A sejtek áramlási citometriás analizéséhez FACS Calibur áramlási citométert és CellQuestPro 5.2 szoftvert használtunk, a fluoreszcencia intenzitást FL-3 csatornán mértük.

3.8. Sejtciklus analízis

A sejtciklus progresszió vizsgálatát UVB besugárzást követően 1, 3 és 6 nappal végeztük. A sejteket 80%-os etanolban fixáltuk. Mintaként megegyező számú sejtet centrifugáltunk (5 min, 3500 rpm), szuszpendáltuk 50 µL/minta DPBS-ben, kiegészítve 0,2 mg/mL RNase A, 0,2% Triton-X 100 és 5 mg/mL PI oldattal. A sejteket 45 percig inkubáltuk 37°C-on. A sejtciklus progresszió analizéséhez FACS Calibur áramlási citométert használtunk, a fluoreszcencia intenzitást FL-2 csatornán mértük. Az elemzés során a doublet (összetapadt) sejtek kizárása kerültek.

3.9. HPRT gémutációs assay

A sejt kultúrában található, spontán HPRT-mutáns sejtek eliminálását HAT-tal (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) kiegészített szelektív DMEM-ben végeztük. A sejtek kezelését és UV

irradiációját követően a sejt kultúrát egy hétig fenntartottuk normál összetételű, komplett DMEM tenyésztőoldatban. Mintaként azonos számú sejtet 5 μM 6-thioguanine-t (6-TG) tartalmazó szelektív DMEM-be raktunk ki. A HPRT génben funkcióvesztéssel járó mutációt hordozó sejtek (6-TG rezisztens sejtek) 10 napon belül szabad szemmel látható, kvantifikálható kolóniákat képeztek. A keletkezett kolóniákat metanolos fixálást követően May-Grünwald-Giemsa festéssel tettük láthatóvá. Pozitív kontrollként 10 μM 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine-nel (MNNG) kezelt sejteket használtunk.

3.10. Western blot

A sejtek lízise proteáz inhibitor koktéllal (hígítás: 1:1000) kiegészített RIPA puffer felhasználásával történt 2, 6, illetve 24 órával az UV irradiációt követően. A mintákat 5X-ös loading pufferral (Bromophenol blue (0,25%), β -Mercaptoethanol (5%), Glycerol (50%), SDS (sodium dodecyl sulfate; 10%) egészítettük ki, majd 10 percig 100°C-on forraltuk a fehérjék denaturálása céljából. A proteinek méret szerinti szeparálását molekulatömegtől függően 7,5, 10 vagy 12,5%-os poliakrilamid gélen végeztük, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra vittük át. A membránokat 1 óráig blokkoltuk 5%-os zsírszegény tejpor oldatában. A membránokat 4°C-on, „overnight” inkubáltuk a primer antitesttel (anti-LC3I-II 1:100; anti-mTOR 1:1000; anti-(p-mTOR) 1:1000; anti-p53 1:1000; anti-(p-p53) 1:1000; anti-PAR 1:500; β -aktin 1:4000). A membránokat tormaperoxidázzal (HRP) konjugált kecske eredetű anti-egér/anti-nyúl IgG szekunder antitesttel inkubáltuk 1 óráig óvatos rázás mellett. A jelölt fehérjesávok vizualizálását követően az adatok kvantifikálását ImageJ 1.8.0 szoftver segítségével végeztük.

3.11. Statisztikai analízis

Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk teszttel határoztuk meg. Két csoport összehasonlítására – normális eloszlás esetén – független kétmintás t-próbát használtunk. Három vagy több csoport összehasonlítására Dunnett’s post-hoc teszttel kiegészített egytényezős ANOVA-t végeztünk (amennyiben az adatok eloszlása normális volt). Nem-normál eloszlás esetén Dunn’s post-hoc teszttel kiegészített Kruskal-Wallis tesztet használtunk. Az adatok statisztikai analízisét GraphPad Prism 7 és SPSS 25 szoftver segítségével végeztük.

4. Eredmények

4.1. Az UVB mutagenézis csökkentése, valamint a sejtszintű UVB-válasz módosítása NER gátló hatású molekulák segítségével

Korábbi vizsgálatok szerint a veliparib, a resveratrol, az arzén-trioxid, valamint a spironolactone a NER rendszer működésének gátlását, ezáltal az UVB-indukálta CPD léziók akkumulációját idézheti elő az UV-expozíciónak kitett sejtekben. Kutatásaink során UVB sugárzásnak kitett sejteken végeztünk előkezelést a fent megnevezett molekulák oldataival 2 órával az UV besugárzást megelőzően, majd 10-20 mJ/cm² UVB sugárzásnak tettük ki.

4.1.1. *A veliparib, a resveratrol, az arzén-trioxid és a spironolactone NER gátló hatásának igazolása*

20 mJ/cm² UVB besugárzást követően 24 órával detektáltuk a sejtek genomjában fennmaradó CPD léziók relatív mennyiségét. A veliparib, resveratrol, arzén-trioxid és spironolactone kezeléssel átesett sejtek genomjában a CPD-k száma minden esetben szignifikánsan magasabb volt a kontroll (csak UVB besugárzással átesett) sejtekhez viszonyítva. Az emelkedés HaCaT és CHO sejtek esetén is megfigyelhető volt. UVB irradiáció nélkül a kezelések nem okoztak változást a sejtekben kimutatható CPD-k számában. Ennek alapján a molekulák gátló hatása az UVB-indukálta CPD eliminációra igazolható volt.

4.1.2. *A CPD akkumuláció és mutagenézis kapcsolatának vizsgálata*

Az UVB-indukálta mutagenézis mértékének meghatározásához HPRT génmutációs assay-t végeztünk. A kezelt sejteket szelektív tápközegbe helyezve elkülöníthetők a sejtpopuláció azon egyedi sejtjei, amelyek a mutagén hatás következtében öröklődő, funkcióvesztéses mutációt szenvedtek a HPRT génjükben. Emellett kizárólag azok a sejtek kerülnek detektálásra, amelyek megőrizték élet- és proliferációs képességüket. Munkánk során különböző dózisu sugárzásnak kitett CHO sejtek HPRT mutációs rátáját vizsgáltuk. Alacsonyabb (0-10 mJ/cm²) UVB besugárzás esetén a HPRT mutációt hordozó sejtek aránya az alkalmazott UVB dózissal párhuzamosan növekedett. Ennél magasabb (≥ 15 mJ/cm²) UVB dózis esetén a mutációs ráta lecsökkent, az UVB-indukálta CPD léziók mennyiségének növekedése ellenére. Ez arra utal, hogy az alacsonyabb citotoxikus hatást kiváltó UVB dózis nagyobb kockázatot jelent az UVB-indukálta mutagenézisre.

4.1.3. Az UVB mutagén hatásának csökkenése veliparib, arzén-trioxid és spironolactone kezelés indukálta NER gátlást követően

A korábban említett inhibitorok mutagén hatásának vizsgálatára 10 mJ/cm² dózisú UVB besugárzást alkalmaztunk. CHO sejteket kezeltünk az említett inhibitor hatású molekulákkal. Vizsgálataink során a várakozásokkal ellentétben a négy, repair inhibíciót kifejtő vegyület közül három (veliparib, arzén-trioxid, spironolactone) jelentős mértékben csökkentette az UVB-indukálta mutagén folyamatokat. A kezelések következtében a HPRT gén mutációs rátája sok esetben csaknem a kontroll (UVB-sugárzásnak nem kitett) sejtekéhez volt hasonló. A resveratrol nem okozott jelentős változást a sejtek HPRT mutációs szintjében UVB besugárzás után.

4.1.4. Az inhibitor molekulák hatása az UVB-indukálta apoptotikus sejtválaszra

CHO és HaCaT sejteket kezeltünk az inhibitorokkal, majd ezt követően 20 mJ/cm² UVB besugárzást alkalmaztunk. 48 óra elteltével a sejteken Annexin V és propidium-jodid kettős jelölést alkalmaztunk, majd áramlási citometriás méréssel detektáltuk az adott mintában megtalálható élő, apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát. Az arzén-trioxid és a spironolactone kezelés akár 40%-kal csökkentette a túlélő sejtek arányát UVB besugárzást követően. A resveratrol enyhébb, megközelítőleg 20%-os visszaesést okozott a sejtek viabilitásában. A veliparib kezelés nem volt hatással a sejtek viabilitására.

4.1.5. A vizsgált molekulák hatása az UVB sugárzást követő sejtciklus blokkra

Az inhibitoros kezeléseket és az UVB expozíciót követően 1, 3 és 6 nappal propidium-jodid festést végeztünk a sejteken. Ezután áramlási citometriás méréssel vizsgáltuk az egyedi sejtekben található DNS mennyiséget. Ezáltal a sejtciklus különböző fázisaiban tartózkodó sejtek megkülönböztethetők. Egy nappal az UVB besugárzást követően minden vizsgált csoportban megnőtt G2/M fázisban található sejtek aránya. A sejtciklus progresszió regenerálódása 3 nappal az UV expozíció után már megfigyelhető volt. 6 napot követően a különböző fázisban tartózkodó sejtek aránya közel azonos volt a kontroll (UVB sugárzáson nem átesett) sejtekével. Veliparib kezelés esetén szignifikáns növekedés volt megfigyelhető a G2/M fázisos sejtek számában 3 és 6 nappal az UVB expozíciót követően. A resveratrol kezelés kisebb mértékű növekedést váltott ki a G2/M fázisban detektálható sejtek arányában 3 nappal

az expozíciót követően. Az arzén-trioxid és a spironolactone kezelés nem volt hatással az UVB-indukálta sejtciklus progressziós változásokra.

4.1.6. A vizsgált molekulák hatása az UVB sugárzás indukálta fehérje szintű változásokra

A továbbiakban néhány központi szabályozó fehérje aktivációs szintjét vizsgáltuk. Méréseket végeztünk a stressz-válaszban központi szerepet betöltő p53 protein foszforilációs, az LC3 („microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 protein”) II izoformájának expressziós, valamint az mTOR („mammalian target of rapamycin”) expressziós és aktivációs szintjét illetően. A méréseket az UVB expozíciót követően 2, 6 és 20 órával detektáltuk. A p53 emelkedett expressziós szintet mutatott az UVB besugárzást követően 2-6 órával, majd szintje normalizálódott 20 órával az expozíciót követően. A veliparibbal történő előkezelés szignifikáns változást okozott a fehérje foszforilációs szintjében minden vizsgált időpontban. A többi kezelés nem volt befolyással a p53 aktivációra. Az LC3-II autofágia marker vizsgálata során szintén szignifikáns emelkedés volt kimutatható veliparib kezelést követően. Az arzén-trioxid, illetve a spironolactone kezelés hatására növekedett az mTOR foszforilációja, azonban ez a változás csak a spironolactone esetén volt statisztikailag szignifikáns.

4.2. A silymarin módosító hatásai az UVA-indukálta sejtszintű folyamatokra

Munkánk során különböző eredetű, silymarin port tartalmazó oldatok hatását vizsgáltuk UVA és UVB sugárzásnak kitett HaCaT keratinocita sejtvonalon. A sejteket 30 percig inkubáltuk a hatóanyagok jelenlétében, majd különböző dózisú UVA vagy UVB sugárzásnak tettük ki. A sejtek kezeléséhez háromféle forrásból származó silymarin oldatot használtunk: 1) a Sigma-Aldrich-tól rendelt, laboratóriumi felhasználásra készült silymarin port, 2) a Silegon néven kereskedelmi forgalomban lévő silymarin tablettá porított oldatát, valamint 3) a Debreceni Egyetem Gyógyszertechnológiai Tanszékének munkatársai által formulázott, a sejtekbe történő penetrációt elősegítő összetételű silymarin oldatokat.

4.2.1. A különböző kompozíciójú silymarin oldatok fokozzák az UVA-indukálta sejtelhalást

A sejtek életképességének meghatározásához elsőként MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay-t használtunk 24 órával UVA vagy UVB besugárzás után. A silymarin kezelés nem volt hatással az UVB-indukálta sejtelhalásra. UVA besugárzás után

jelentős, dózisfüggő csökkenést figyeltünk meg a silymarin oldatokkal történő kezelést követően. Az etanolban oldott silymarin porok (Sigma; Silegon) megegyező mértékben fokozták az UVA foto-citotoxikus hatását, míg a silymarin penetrációt fokozó formulációi egymástól eltérő mértékben serkentették az UVA-indukálta sejtelhalást. A silymarin fotoszenzitizáló hatását UVA besugárzást követően Annexin V/PI kettős festést követő áramlási citometriás méréssel erősítettük meg.

4.2.2. A silymarin kezelés csökkenti az UVA-indukálta reaktív oxigéngyök (ROS) képződést

Annak érdekében, hogy felmérjük az általunk használt silymarin oldatok hatását az UVA-indukálta ROS-képződésre, a sejtek DHE festését követően áramlási citometriás méréssel detektáltuk az intracelluláris szuperoxid- és hidrogén-peroxid gyököket. A silymarin előkezelés szignifikánsan csökkentette a keratinociták ROS termelését magas dózisú (20 J/cm²) UVA besugárzást követően. A csökkenés mindegyik silymarin oldat esetében kimutatható volt. A kontroll (nem-irradiált) sejtek ROS produkciójára a silymarin kezelések nem voltak hatással.

4.2.3. UVA-indukálta CPD akkumuláció és mutagenézis silymarin kezelést követően

CPD-specifikus ELISA segítségével detektáltuk a sejtek DNS-ében kimutatható CPD léziók relatív mennyiségét 24 órával UVA besugárzást (10 J/cm²) követően. Eredményeink alapján a silymarin kezelés szignifikánsan növelte a sejtek UVA besugárzást követő CPD akkumulációját. A mérésekhez a silymarin (Sigma) két, a korábbi mérések alapján leghatékonyabbnak bizonyult koncentrációját alkalmaztuk.

HPRT génmutációs assay segítségével vizsgáltuk a kezelések hatását az UVA-indukálta mutációs teherre. A kísérletek során a Sigma-Aldrichtól származó silymarin por háromféle koncentrációban oldott változatát használtuk. A silymarin a megemelkedett CPD akkumuláció ellenére nem befolyásolta a mutációt hordozó sejtek számát.

5. Diszkusszió

Munkánk során olyan molekulák vizsgálatát tűztük ki célul, amelyek képesek a nukleotid excíziós repair (NER) komplex működésének gátlására, ezáltal az UV-sugárzás által indukált CPD akkumuláció fokozására. Kísérleteink során igazoltuk a veliparib, a resveratrol, az arzén-trioxid és a spironolactone NER gátló hatását UVB besugárzás után, illetve kimutattuk a silymarin kezelés következtében megemelkedett UVA-indukálta CPD felhalmozódást. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az általunk tanulmányozott molekulák közül három – a veliparib, a spironolactone és az arzén-trioxid – szignifikánsan mérsékelte az UVB-indukálta mutációs terhet. A megfigyelt anti-mutagén hatás összefüggésbe hozható az arzén-trioxid és a spironolactone kezelés erős pro-apoptotikus, valamint a veliparib anti-proliferációs hatásával. Az UV-indukálta mutációk és a NER inhibíció együttes hatása felveti az ún. „szintetikus letalitás” lehetőségét. A szintetikus letalitás elve alapján egyetlen gén mutációja még tolerálható a sejt számára, azonban két különböző gén funkcióvesztése már a tumoros sejt elhalásához vezet. A PARP1 fehérje gátlószereit jelenleg is vizsgálják BRCA1/2 mutációt hordozó tumorok terápiájában. Ennek oka, hogy a BRCA1/2 fehérje funkcióvesztése esetén a sejtek fokozottan érzékennyé válnak a PARP1 kémiai gátlására. Az értekezésben bemutatott eredmények szintén támogatják az elképzelést, miszerint a genetikailag károsodott sejtek repair útvonalaiban előidézett deficiencia képes az UV-indukálta mutációt hordozó sejtek szelektív eliminálására. Ennek alapján a másik két anti-mutagén molekula (a spironolactone és az arzén-trioxid) esetleges szintetikus letális hatásának vizsgálata megfontolandó - különös tekintettel az enyhébb mellékhatásokkal bíró spironolactone esetében.

Munkánk során bemutattuk, hogy a sejteket érő genotoxikus hatás következtében mutációkat hordozó sejtek száma eredményesen csökkenthető a NER komplex gátlásával. A veliparib célfehérjéje, a PARP1 jelentős szerepet játszik az UV-indukálta CPD léziók felismerésében a NER különböző proteinjeivel (pl. XPC; DDB2; CSB) történő kölcsönhatása által. A spironolactone a NER egyetlen fehérjéjének (XPB) gyors proteozomális degradációját okozza. Az arzén-trioxid esetében a NER inhibitor hatás a veliparibhoz hasonlóan szintén az XPC gátlásához köthető, azonban ez a molekula sokrétű hatással bír a sejtek egyéb útvonalaira is (pl. mitokondriális apoptózis indukció; ROS produkció; survivin downreguláció). Így az UV-sugárzásnak kitett sejtekre gyakorolt citotoxikus hatása nagy valószínűséggel nem magyarázható kizárólagosan az XPC gátlásával. A resveratrol szintén csökkentette az UVB-indukálta CPD-k javítási hatékonyságát, azonban a többi kezelésnél megfigyelt anti-mutagén

hatás nélkül. Ennek oka esetlegesen a resveratrol csekély mértékű hatása az UV-irradiált sejtek apoptotikus válaszára vagy proliferációjára a többi oldathoz képest.

Kísérleteink során a veliparib kezelés szignifikánsan fokozta az UV-indukálta p53 foszforilációt. Ez összhangban van azon tanulmányokkal, melyek szerint a PARP1 gátlók tumorelles terápiaiban történő felhasználása jóval eredményesebb, amennyiben a tumoros sejtek a p53 gén funkcióvesztéses mutációját hordozzák. A kísérleteink során tapasztalt, fokozott p53 aktiváció veliparib kezelést követően esetlegesen a PARP1 gátlásából adódó genomi instabilitás ellensúlyozásával magyarázható. A többi inhibitor molekula nem befolyásolta a p53 foszforilációs szintjét UVB sugárzást követően. Ez arra utal, hogy a resveratrol, a spironolactone és az arzén-trioxid által mediált folyamatok legalább részben p53-független útvonalon szabályzódnak. A spironolactone fokozta az UVB-indukálta mTOR foszforilációt. Mivel a foszforilált mTOR a károsodást követően a sejtek túlélését segíti elő, az emelkedett mTOR aktiváció a sejtek válasza lehet a spironolactone kezelés erős fototoxikus hatására. A sejtszintű autofágia veliparib kezelés hatására fokozódott, ami hozzájárulhat a veliparib anti-mutagén hatásához. Bár az autofágia szerepe a szövetek tumorigenezisében ellentmondásos: egyfelől a károsodott sejtorganeliumok eliminálásával csökkentheti a mutáció és a tumor formáció valószínűségét, másfelől lehetővé teszi a „*pre-cancerous*” sejtek túlélését a metabolikus stressz és tápanyaghiány esetén.

A NER inhibitor kezelések következtében bekövetkező nagymértékű csökkenés az UVB-irradiált sejtek mutációs terhében rámutat, hogy az UVB-indukált mutagenézis és a CPD akkumuláció között nem feltétlenül áll fent lineáris kapcsolat. Eredményeink arra utalnak, hogy egy kémiai ágens mutagén hatásának megítélésakor csupán a DNS-ben kimutatható léziók számának meghatározása mellett egyéb faktorokat is szükséges figyelembe venni.

Az előbbiekhöz hasonlóan az UV-indukálta CPD léziók fokozott felhalmozódását, valamint az apoptotikus sejt válasz serkentését figyeltük meg a növényi eredetű silymarin hatóanyag komplex alkalmazásakor. A növényi kivonat fotoszenzitiváló hatása kizárólag UVA besugárzás esetén volt kimutatható. Ez rávilágít a pirimidin dimer képződés és a NER repair fontosságára az alacsonyabb energiájú, ezért sokszor kevésbé veszélyesnek vélt UVA hullámhossz esetében is. A HPRT génmutációs assay eredményei alátámasztják, hogy az UVB sugárzás mellett az UVA mutagén hatása ugyancsak jelentős.

A silymarin sejtszintű UV-válaszra kifejtett hatása ellentmondásos: a hatóanyag UV sugárzással szembeni fotoprotektív és fényérzékenyítő hatása szintúgy leírásra került. Előbbinek oka valószínűsíthetően a kivonat UV-indukálta ROS-produkcióra kifejtett jótékony

hatása, amely a mi kísérletes rendszerünkben is kimutatható volt. Ezt azonban hipotézisünk szerint az emelkedett CPD akkumuláció ellesúlyozni képes, ami így az UVA-indukálta apoptózis fokozódását eredményezi. A silymarin kezelés diverz hatása feltehetően összetevőinek változatosságából ered: a silymarin komplex számos különböző struktúrával rendelkező flavonolignán keveréke, amelyek sokszínű biológiai hatással rendelkeznek. A komplex végső hatása az UV-irradiált sejtek válaszára erősen függhet továbbá a keverék egyes komponenseinek arányaitól, azok sejtmembránon történő penetrációs hatékonyságától és a vizsgálat egyéb körülményeitől. A silymarin a jövőben fényérzékenyítő hatása miatt az ún. pre-cancerosus állapot kezelésére alkalmazott fotodinámias terápiaiban (PDT) is ígéretes hatóanyag lehet. A jelenleg alkalmazott fotodinámias fényérzékenyítő szerek többségének abszorpciós maximuma az infravörös hullámhossztartományba esik, az alacsony dózisú UVA-val kombinált PDT is használatos az előbbinél jóval erősebb citotoxikus hatása miatt.

A silymarin kezelés következtében tapasztalt fokozott CPD akkumuláció kiváltó oka egyelőre ismeretlen. A silymarin UVA-mutagenézisre kifejtett semleges hatása azonban felhívja rá a figyelmet, hogy a kezelést követően megemelkedett CPD szint nem feltétlenül jelenti a bőrrák kialakulásának fokozott kockázatát a kezelést követően. Ennek ellenére a silymarin hatóanyagainak bőrgyógyászati felhasználásához további vizsgálatok és alapos megfontolás szükséges.

6. Összefoglalás

Az értekezésben olyan molekulák vizsgálatával foglalkoztunk, amelyek képesek az UVA vagy UVB sugárzás következtében kialakuló ciklobután pirimidin dimer (CPD) fotoléziók eliminálásának gátlására, és az UV-indukálta sejtválasz módosítására. A munkánk során használt hatóanyagok mindegyike klinikai felhasználás alatt áll, így a bőr carcinogenezisre kifejtett esetleges hatásuk különleges jelentőséggel bír. A tanulmány során vizsgáltuk a veliparib, a resveratrol, a spironolactone és az arzén-trioxid hatását az UVB sugárzást követő sejtelhalásra, proliferációs gátlásra, autofágiára, mutációs rátára és fehérje expresszióra. Ezen kívül foglalkoztunk a silymarin, mint növényi kivonat hatásaival UVA irradiációt követően.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a sejtek DNS-ében képződő CPD léziók számának növekedése nem feltétlenül jár együtt az UV-indukálta mutagenézis emelkedésével. Emellett megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált molekulák egyike sem volt képes fokozni az UV-indukálta mutáció formációt a szignifikáns repair gátlás ellenében, sőt némelyikük szignifikánsan csökkentette azt. Eredményeink felhívják a figyelmet az UV-indukálta carcinogenezis és a repair folyamatok kölcsönhatásának összetettségére, illetve rámutatnak a sejt szintű stresszválasz egyéb aspektusainak fontosságára egy kémiai ágens potenciális mutagén hatásának megítélésékor.

7. 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/73/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Fidrus Eszter

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fidrus, E.**, Hegedűs, C., Janka, E. A., Paragh, G., Emri, G., Remenyik, É.: Inhibitors of Nucleotide Excision Repair Decrease UVB-Induced Mutagenesis - an In Vitro Study.
Int. J. Mol. Sci. 22 (4), 1638-, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22041638>
IF: 4.556 (2019)
2. **Fidrus, E.**, Ujhelyi, Z., Fehér, P., Hegedűs, C., Janka, E. A., Paragh, G. J., Vasas, G., Bácskay, I., Remenyik, É.: Silymarin: friend or foe of UV exposed keratinocytes?
Molecules. 24 (9), 1-12, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24091652>
IF: 3.267

További közlemények

3. Hegedűs, C., Juhász, T., **Fidrus, E.**, Janka, E. A., Juhász, G., Boros, G., Paragh, G. J., Uray, K., Emri, G., Remenyik, É., Bai, P.: Cyclobutane pyrimidine dimers from UVB exposure induce a hypermetabolic state in keratinocytes via mitochondrial oxidative stress.
Redox Biol. 38, 1-17, 2021.
IF: 9.986 (2019)
4. Hegedűs, C., Boros, G., **Fidrus, E.**, Kis, G., Antal, M., Juhász, T., Janka, E. A., Jankó, L., Paragh, G. J., Emri, G., Bai, P., Remenyik, É.: PARP1 Inhibition Augments UVB-Mediated Mitochondrial Changes-Implications for UV-Induced DNA Repair and Photocarcinogenesis.
Cancers (Basel). 12 (1), 1-29, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12010005>
IF: 6.126 (2019)





5. Gellén, E., **Fidrus, E.**, Janka, E. A., Kollár, S., Paragh, G. J., Emri, G., Remenyik, É.: 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy with and without Er:YAG laser for actinic keratosis: changes in immune infiltration.
Photodiagnosis Photodyn. Ther. 26, 270-276, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.010>
IF: 2.894
6. Gellén, E., **Fidrus, E.**, Péter, M., Szegedi, A., Emri, G., Remenyik, É.: Immunological effects of photodynamic therapy in the treatment of actinic keratosis and squamous cell carcinoma.
Photodiagnosis Photodyn. Ther. 24, 342-348, 2018.
IF: 2.589
7. Mudambi, S., Pera, P., Washington, D., Remenyik, É., **Fidrus, E.**, Shafirstein, G., Bellnier, D., Paragh, G. J.: Photodynamic therapy does not induce cyclobutane pyrimidine dimers in the presence of melanin.
Photodiagnosis Photodyn. Ther. 22, 241-244, 2018.
IF: 2.589
8. Szemán-Nagy, G., Tánzos, B., **Fidrus, E.**, Tálás, L., Bánfalvi, G.: Chemically Induced Cell Cycle Arrest in Perfusion Cell Culture.
In: Cell cycle synchronization : methods and protocols. Ed.: by Gaspar Banfalvi, Humana Press, New York, 161-176, 2017.
9. Tálás, L., Bánfalvi, G., **Fidrus, E.**, Máthéné Szigeti, Z., Szemán-Nagy, G.: Mycoplasma infection followed by time-lapse microscopy.
Med. Hypotheses. 108, 154-158, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2017.09.004>
IF: 1.12

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 33,127

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,823

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, 2021.03.01.



8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Remenyik Évának támogatásáért, tanácsaiért és bizalmáért, ami nem csak lehetővé tette a jelen értekezésben bemutatott tudományos eredmények létrejöttét, de megalapozta a kísérletes bőrgyógyászat és a fotobiológia területén szerzett tapasztalataimat és érdeklődésemet is. Hasonló köszönettel tartozom a DE-ÁOK Bőrgyógyászati Klinikán működő valamennyi kutatócsoport minden tagjának – az általuk biztosított szakmai segítség és támogató közösség munkám nélkülözhetetlen eleme volt. Külön szeretném kiemelni Hegedűs Csabát és Dr. Janka Esztert, akiknek mind módszertani ismeretei, mind emberi támogatása rendkívül meghatározó volt tanulmányaim során. Ugyancsak szeretném megköszönni Prof. Dr. Bácskay Ildikónak és Dr. Fehér Pálmának a silymarin kivonat vizsgálata során nyújtott magas szintű szakmai segítségét. Továbbá szeretném megköszönni Dr. Emri Gabriella és Dr. Paragh György támogatását, akik ötleteikkel és tapasztalatukkal jelentősen növelték az értekezés alapját képező tudományos közlemények szakmai színvonalát. Végezetül szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak az elmúlt években nyújtott támogatásukért és biztatásukért.

A munkámhoz szükséges anyagi háttérrel a Nemzetközi Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal K120206 számú OTKA pályázata, az Európai Unió Európai Regionális Fejlesztési Alapjának GINOP- 2.3.2-15-2016-00005 számú pályázata, valamint az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-4 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatása biztosította.