

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Fidrus Eszter

Témavezető: Prof. Dr. Remenyik Éva



DEBRECENI EGYETEM
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	4
1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.2. Az UV sugárzás hatásai a humán bőrön.....	7
2.2.1. Az UVA és UVB sugárzás fizikai és általános élettani jellemzői	7
2.2.2. Ciklobután-pirimidin dimer fotolézisok és az UVB mutagenesis	8
2.2.3. Fotoszenzitizációs reakciók	10
2.3. A nukleotid excíziós repair (NER).....	11
2.3.1. A NER szerepe az UV-indukálta DNS léziók javításában.....	11
2.3.2. A NER működési mechanizmusa.....	11
2.3.3. NER gátló molekulák a klinikumban	14
2.4. Növényi molekulák felhasználása az UV-válasz módosításában	18
2.4.1. Általános áttekintés	18
2.4.2. A <i>Silybum marianum</i> növényi kivonatának (<i>silymarin</i>) felhasználása bőrgyógyászati vizsgálatokban.....	18
3. Célkitűzés.....	20
4. Anyagok és módszerek	21
4.1. Sejtkultúrák	21
4.2. A sejtek kezelése.....	21
4.2.1. Veliparib, resveratrol, spironolactone és arzén-trioxid kezelés	21
4.2.2. Silymarin kezelés	22
4.2.3. UV irradiáció	23
4.3. CPD-specifikus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	23
4.4. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay.....	24
4.5. Apoptosis assay	24
4.6. ROS (reaktív oxigéngyök) produkciós mérések	25
4.7. Sejtciklus analízis	25
4.8. HPRT gémutációs assay.....	25
4.9. Western blot	26
4.10. Az adatok statisztikai analízise	27
5. Eredmények.....	28
5.1. Az UVB mutagenesis csökkentése, valamint a sejt szintű UVB-válasz módosítása NER gátló hatású molekulák segítségével.....	28
5.1.1. A veliparib, a resveratrol, az arzén-trioxid és a spironolactone NER gátló hatásának igazolása.....	28
5.1.2. A CPD akkumuláció és mutagenesis kapcsolatának vizsgálata <i>in vitro</i>	29
5.1.3. Az UVB mutagén hatásának csökkenése veliparib, arzén-trioxid és spironolactone kezelés indukálta NER gátlást követően	31

5.1.4. A vizsgált molekulák hatása az UVB-indukálta apoptotikus sejtválaszra	32
5.1.5. A vizsgált molekulák hatása az UVB sugárzást követő sejtciklus blokkra.....	35
5.1.6. A vizsgált molekulák eltérő hatása az UVB sugárzás indukálta fehérje szintű változásokra	37
5.2. A silymarin módosító hatásai az UVA-indukálta sejt szintű folyamatokra	41
5.2.1. Különböző kompozíciójú silymarin oldatok hatásának vizsgálata az UVA-indukálta sejt elhalásra	41
5.2.2. Silymarin kezelés csökkentő hatása az UVA-indukálta reaktív oxigéngyök (ROS) termelésre ..	44
5.2.3. UVA-indukálta CPD akkumuláció és mutagenézis silymarin kezelést követően	46
6. Diskusszió	48
7. Összefoglalás	53
8. Summary	54
9. Irodalmi jegyzék	55
10. Tárgyszavak	62
11. Keywords	62
12. Köszönetnyilvánítás	63
13. Függelék	64

Rövidítések

6-4PP	6-4 pirimidin-pirimidon fotoproduktum
8-oxoG	8-oxoguanin
ABT-888	veliparib
As ₂ O ₃	arzén-trioxid
BCC	bazálsjtes carcinoma
CPD	ciklobután-pirimidin dimer
CSA/B	Cockayne szindróma csoport A/B protein
DHE	dihydro-ethidium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
DNS	deoxiribonukleinsav
DPBS	Dulbecco's foszfát-puffer sóoldat
GG/TC-NER	Globál-genom/traszkrpcióhoz kötött nukleotid excíziós repair
HPRT	Hypoxatin-guanin foszforiboziltranszferáz
NER	nukleotid excíziós repair
PARP1	Poly [ADP-ribóz] polimeráz 1
PI	Propidium-jodid
PTCH1	Patched-1 gén
ROS	reaktív oxigényök
RSV	resveratrol
SCC	laphámsejtes carcinoma
SP	spironolactone
UV	ultraibolya sugárzás
XPB/C	Xeroderma pigmentosum, kiegészítő csoport B/C fehérje

1. Bevezetés

A Napból érkező ultraibolya (UV) sugárzás számos élettani és patológias folyamatért felelős, egyebek mellett a szervezet D-vitamin szintézise, a napégés, a bőröregeedés (az ún. „fotoaging”) vagy a bőr különböző daganatos elváltozásai. A Föld felszínét elérő UV sugárzás magasabb hullámhosszúságú (315-400 nm), kisebb energiájú UVA tartománya ismereteink szerint leginkább a bőr felső rétegének (hám és irha) sejtjeiben megjelenő reaktív oxigéngyökök (ROS) képzésével, míg az alacsonyabb hullámhosszúságú (280-315 nm), ezáltal nagyobb energiájú UVB tartomány a hámsejtek DNS-ének direkt károsításával képes az említett patológias folyamatok kiváltására. Az UV sugárzás által indukált, DNS-t érintő elváltozások felhalmozódása a DNS szál torzulásának következtében hosszútávon tartós mutációk létrejöttét idézheti elő.

Az UV sugárzás indukálta DNS károsodás javítására, ezáltal a mutációk létrejöttének megelőzésére humán sejtekben a nukleotid excíziós repair (NER) rendszer alkalmas. Az említett protein komplex a károsodott DNS szakasz enzimatikus kivágásával, majd a komplementer szálról történő újbóli szintézisével képes helyreállítani a megfelelő DNS struktúrát. A komplex működése azonban egyes, az UV sugárzásra jellemző DNS léziók – pl. az ún. ciklobután pirimidin dimer (CPD) fotoléziók – javítása esetén meglehetősen lassú és alacsony hatékonyságú. Ennek köszönhetően ezen típusú léziók okozzák az UV sugárzás következtében kialakuló mutációk jelentős részét. A CPD léziók jelentőségét elsősorban az UVB sugárzással összefüggésben szokás említeni, azonban több tanulmány rámutatott, hogy UVA sugárzás esetén a CPD képződés ugyancsak megfigyelhető.

Minthogy a DNS lézió sejtszintű felismerése és a repair folyamat elindítása rendkívül összetett és sok tényezőt magába foglaló folyamat, a NER működése kémiaiilag számos módon befolyásolható. A nemzetközi szakirodalom több olyan molekulát azonosított, amelyek bizonyítottan képesek a NER működésének *in vitro* gátlására, ezáltal potenciálisan fokozhatják az UV sugárzás mutagén hatását. Némiképp ellentmondást jelent azonban, hogy az azonosított gátló hatású molekulák egy része egyéb tulajdonságai miatt használatban van az orvosi gyakorlatban csakúgy, mint klinikai tesztekben, azonban tudomásunk szerint nincs arra vonatkozó tapasztalat, hogy alkalmazásuk fokozott rizikót jelentene bőrdaganatok kialakulására.

Napjainkban ugyancsak jelentős az érdeklődés a különböző növényi eredetű hatóanyagok vizsgálatát illetően mind tudományos, mind társadalmi szinten. Ezen molekulák főként

kimutatható antioxidáns hatásuknak köszönhetően váltak a bőrgyógyászati vizsgálatok ígéretes célpontjaivá, ugyanakkor számos esetben a sejtszintű repair rendszerekre tett hatásuk is figyelemre méltó. Felhasználásuk azonban korlátozott, mind a tudományos eredmények esetenként felmerülő ellentmondásossága, mind egyes növényi hatóanyagok komplex összetétele és rendkívül nehézkes biohasznosulása következtében.

Jelen értekezés első részében a NER komplexre kémiai gátlást kifejtő molekulák - úgymint veliparib, resveratrol, spironolactone és arzén-trioxid – hatásaival foglalkozom UVB által besugárzott epitheliális sejteken. A munkám során vizsgált molekulák rendkívül változatos és komplex hatásmechanizmussal bírnak, valamint mindegyiknek megalapozott szakirodalma van biztonságos *in vivo* felhasználását illetően. Tanulmányaim során vizsgálom az említett molekulák potenciális hatásait az UVB indukálta mutagén folyamatokra, valamint kitérek az egyéb, a sejtszintű UV-választ módosítani képes útvonalakra. Az értekezés témája reményeim szerint közelebb visz az említett molekulák klinikai felhasználását övező ellentmondások feloldásához.

Az értekezés második részében a *Silibum marianum*-ból nyert növényi hatóanyag, a silymarin hatásaival foglalkozom UVA sugárzásnak kitett humán keratinocitákon. Az eredmények tárgyalása során kitérek a silymarin antioxidáns, fényérzékenyítő, valamint a NER működését módosító hatásaira is.

2. Irodalmi áttekintés

2.2. Az UV sugárzás hatásai a humán bőrön

2.2.1. Az UVA és UVB sugárzás fizikai és általános élettani jellemzői

A Napból érkező ultraviola sugárzást hullámhossztartományuk alapján három csoportba soroljuk: a legmagasabb energiájú, 190-280 nm hullámhosszúságú UV-C sugárzás a Föld ózonszűrője által megszűrve nem éri el a földfelszínt. Természetes körülmények között élettani szempontból ezért csak a 280-315 nm közé eső UVB, illetve a 315-400 nm közötti UVA sugárzásnak van jelentősége [1, 2]. A földfelszínt elérő UV sugárzás mindkét típusa fotokémiaiilag aktív, azaz az élő sejt számos szerves molekulája képes a sugárzást abszorbeálni (pl. DNS, porfirinek, melanin) [1, 3]. Az így létrejött gerjesztett állapot eredményezheti az adott molekula közvetlen károsodását (pl. DNS fotolézíók keletkezése) vagy a magasabb energiaállapotba került molekula kölcsönhatását egyéb molekulákkal (pl. ROS generálás) [1, 4].

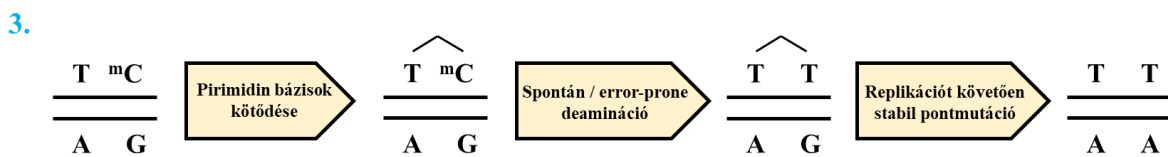
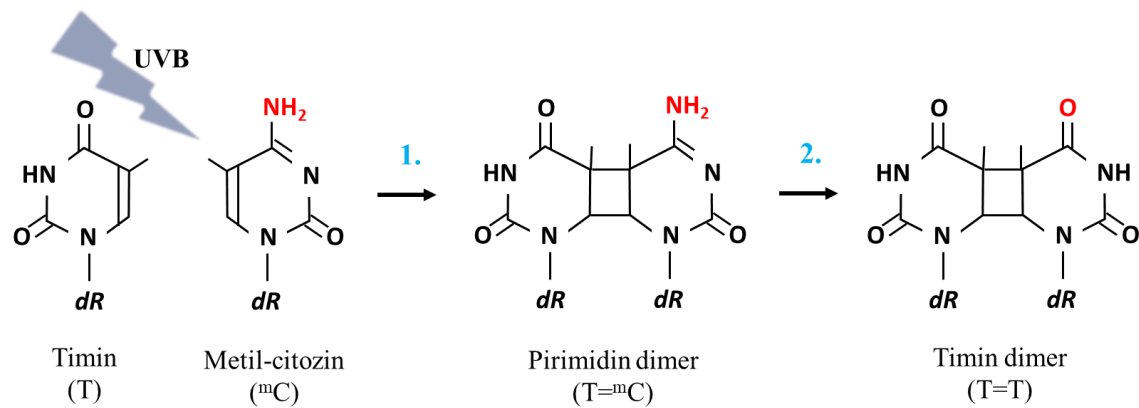
Az elsőként említett reakciót, azaz a sugárzás közvetlen abszorpcióját a DNS molekula által főként az UVB sugárzásnak szokás tulajdonítani [1]. Az UVB tartomány alacsonyabb hullámhossza révén hamarabb elnyelődik az epidermisben, a dermis sejtjeit jellemzően kevésbé érinti [5]. Az általa közvetített magasabb energia és a DNS molekulán történő jobb elnyelődése révén azonban az UVA-nál jóval kisebb dózisban képes sejtkárosító hatást kifejteni. Ezt támasztja alá, hogy bár a Földet érő UV sugárzás csupán megközelítőleg 5%-a esik az UVB hullámhossztartományába [4, 5], az UV-sugárzás által kiváltott patológiás folyamatok (pl. napégés, bőr carcinogenesis) kiváltásában az UVA-nál jóval jelentősebb szerepe van [1, 5]. Fontos azonban megjegyezni, hogy a szervezet D-vitamin szintézise ugyancsak szoros összefüggésben van a bőrt érő UVB sugárzással, ezáltal pozitív fiziológiai hatásai sem hagyhatók figyelmen kívül [6].

Az alacsonyabb energiájú UVA-t a DNS-től eltérő, endogén kromofór molekulák (pl. porfirinek, bilirubin, melanin, flavinok) képesek abszorbeálni [3]. Az így gerjesztett fotoszenzor vegyületek más molekulákkal léphetnek reakcióba, reaktív oxigéngyökök (ROS) létrejöttét eredményezve [1, 3]. Az így keletkezett reaktív oxigéngyökök többek között lipid peroxidációt [7], proteinek oxidatív módosulásait [8], illetve a DNS-en egyszálú törést és oxidatív báziskárosodást, ún. 8-oxoG (8-oxo-7,8-dihidroxi-guanin) léziók létrejöttét indukálják [1, 2]. Az UVA sugárzás hatásai szövetszinten kiterjedtebbek lehetnek, amennyiben magasabb hullámhossza révén a bőr mélyebb rétegeibe is képes penetrálni [5].

Az említett hatások következtében a bőrt érő, nagyobb dózisú UV-sugárzás akut formában napégést (erythema), hám hyperplasiát, pigmentációt és immunszuppressziót vált ki [2], a hosszú távú, krónikus UV-sugárzásnak való kitettség pedig jelentősen megnöveli a bőröregeedés, illetve a melanoma [2] és nem-melanoma [9, 10] típusú bőrdaganatok kialakulásának valószínűségét. Az utóbbi években emelkedő incidencia mutatható ki a bőrt érintő daganatos megbetegedések terén [11-14]. Ehhez a tendenciához nagymértékben hozzájárul a Föld ózonrétegének vékonyodásából adódó megemelkedett UV-terhelés [6, 15], valamint a napbarnította bőr divatja, és az ebből adódóan egyre inkább teret hódító szolárium-használat [16, 17].

2.2.2. *Ciklobután-pirimidin dimer fotolézisok és az UVB mutagenézis*

Az UVB sugárzás által kiváltott DNS léziók leggyakoribb formái az ún. ciklobután-pirimidin dimer (CPD), valamint 6-4 pirimidin-pirimidon (6-4PP) fotoproduktumok [18, 19]. Ezen fotolézisok létrejöttükor két szomszédos pirimidin bázis közötti stabil kötődés a DNS struktúra torzulását váltja ki a dipirimidin kötőhelyeknél, elsősorban ^mC->T (metil-citozin -> timin) transzverziót eredményezve [19, 20]. A transzverziók kialakulásának pontos mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, valószínűsíthetően a torzulás következtében az 5'-metilcitozin (^mC) bázisok spontán vagy a DNS polimeráz „*error-prone*” hibajavítása következtében létrejövő deaminációja történik. A deaminált citozin bázisból képződő timin így a DNS szál replikálódása során C->T (illetőleg a komplementer szálon G->A) szubsztitúcióval létrejövő pontmutációt eredményez [19, 20] (**1. ábra**). Tanulmányok szerint az UVB sugárzás következtében keletkezett pirimidin dimerek túlnyomó többsége CPD lézió, melyek mennyisége akár ötszöröse is lehet a hasonló módon kialakuló 6-4PP-knek [21, 22].



1. ábra: UVB-indukálta pirimidin dimerek és mutagenézis. (1) Az UVB által indukált fotoléziók egyik leggyakoribb formájának létrejöttékor stabil kötődés alakul ki a DNS két pirimidin bázisa, adott esetben egy timin (T) és egy metilált citozin (^mC) bázis között. (2) A metil-citozin deaminációját követően stabil T=T dimerek jönnek létre. (3) Az előbbieken felvázolt folyamatok eredményeképpen a transzverziót, illetve replikáció során a hibás bázisról történő DNS szintézist követően a károsodott sejt utódsejtjeiben stabil, potenciálisan öröklődő mutáció keletkezik. (dR=dezoxi-ribóz)

Ezt alátámasztandó számos vizsgálatban kimutatták, hogy az ilyen típusú – C->T transzverziós, vagy ún. UV-szignatúra – mutációk jóval nagyobb arányban vannak jelen az UV-sugárzásnak jobban kitett bőrfelületeken mind egészséges [23], mind melanómás bőrmintákban [24]. A különböző nem-melanoma típusú bőrdaganatok esetén ugyancsak szoros kapcsolat mutatható ki a tumoros szövetek oncogén szekvenciáiban kimutatható mutációk és az UV-sugárzásnak való kitettség között: egy korai tanulmány szerint a vizsgált basalsejtes karcinómás (BCC) betegek több mint 50%-a, míg a laphámsejtes karcinómás (SCC) betegek több mint 90%-a hordozott UV-szignatúra mutációt a p53 tumorszupresszor génben [25]. Más tanulmányok szerint a sporadikus BCC-s betegek kiugróan magas arányban – egyes vizsgálatok szerint akár a betegek 75%-ában - hordoznak mutációt a tumor formációban jól ismert PTCH1 oncogénben, amelyeknek jelentős hányada C->T transzverzió [26-28]. Xeroderma pigmentosumban, azaz az UV-indukálta DNS léziók javításáért felelős nukleotid excíziós repair (NER) bizonyos típusú deficienciájával járó genetikai megbetegedésben jelentősen megnő a korai életkorban kialakuló bőrdaganatok kockázata, amely ugyancsak az UV-sugárzás és a bőr tumoros megbetegedései közötti szoros kapcsoltságra utal. Ezen esetekben a karcinogén

folyamatokat kiváltó mutációk többsége szintén bipirimidin szakaszokon előforduló C->T pontmutáció [29].

Az UVB indukálta CPD fotoléziók mutagén hatása ezáltal széles körben alátámasztott. Mindezek mellett egyre inkább bizonyítást nyer, hogy az UVA sugárzás ugyancsak kiváltja a korábban kizárólag UVB-nek tulajdonított CPD fotoléziók képződését [30, 31]. Bár az indukció mechanizmusa nagy valószínűséggel eltér a két hullámhossztartomány esetében [32, 33], a CPD-k következtében létrejövő DNS mutációk kialakulásának rizikója ugyanúgy jelentős [33].

2.2.3. Fotoszenzitivizációs reakciók

Mint az a korábbiakban említésre került, az UV sugárzás direkt DNS általi abszorpciója mellett jelentős élettani hatással bírnak az ún. fotoszenzitivizációs vagy fényérzékenyítési reakciók. Ennek során jellemzően az UVA sugárzás elnyeléséről beszélhetünk a DNS-től eltérő, intracelluláris kromofór molekulák által [3]. Az abszorbáló molekula ezáltal magasabb energiaállapotba kerül (gerjesztődik), majd az alapállapotba történő visszatérés során a felszabaduló többlet energia reaktív oxigéngyökök képződését váltja ki a sejten belül.

A folyamat mechanizmusától függően a fényérzékenyítési reakciók két típusát különböztetjük meg: az I. típusú reakció során az UV abszorpció következtében elektron transzfer történik a gerjesztett molekula és egy, az elektron felvételére képes szubsztrát molekula között. A szubsztrát az így szerzett töltést oxigénnel történő reakció során adja le, így reaktív szabadgyökök (pl. szuperoxid- és hidroxilgyökök) keletkeznek, melyek egyéb makromolekulák degradációját, ezáltal közvetve citotoxikus folyamatok indukcióját eredményezik [4, 34, 35]. A II. típusú reakcióban ezzel ellentétben a gerjesztett molekula és a molekuláris oxigén között direkt energia-transzfer történik, amely során ún. szinglet oxigén molekulák keletkeznek. Ezek a reaktív gyökök nukleinsavak (főképp guanin), telítetlen zsírsavak és aminosavak oxidatív módosulásait váltják ki [34, 35].

Az utóbbi években jelentős tudományos érdeklődés volt megfigyelhető a különböző természetes [36, 37] és mesterséges [38-40] fényérzékenyítő tulajdonsággal bíró molekulák iránt. Ennek oka, hogy ezek a molekulák rendkívül jó hatékonysággal használhatók a különböző bőrdaganatok vagy ún. „*pre-cancerosus*”, azaz a daganatot megelőző állapotok kezelésében. Az úgynevezett fotodinámiás terápia során a fokozott proliferációs képességű *precancerosus* vagy daganatos sejtek a fényérzékenyítő molekulákat nagyobb mértékben képesek felvenni azok bőrre történő applikációja után. A megfelelő hullámhosszúságú gerjesztő fényvel való

besugárzást követően az ilyen módon érzékenyített tumoros sejtek elpusztulnak, ezáltal szelektív eliminálásuk valósítható meg [35]. A klinikumban számos fényérzékenyítő molekulát (pl. porfirinek és prekursoraik, klorinok, ftalocianinok) alkalmaznak, amelyek a megfelelő hullámhosszúságú besugárzó fényvel kombinálva igazolt tumorelles, illetve antibakteriális hatással rendelkeznek [41].

2.3. A nukleotid excíziós repair (NER)

2.3.1. A NER szerepe az UV-indukálta DNS léziók javításában

Humán sejtekben az UV-sugárzás által kiváltott fotoléziók javításáért a nukleotid excíziós repair enzim komplex felelős. A komplex működése során képes felismerni a DNS szálon keletkező, UV-károsodásból származó torzulásokat, majd a léziót tartalmazó nukleotidszakasz kivágásával és a komplementer szálról történő szintézisével helyreállítani a DNS struktúrát [42]. Tanulmányok kimutatták, hogy a NER rendkívül nagy hatékonyságú az UV-indukálta 6-4PP léziók javításban: 6 órával az UVB sugárzást követően a keletkező 6-4PP-k csaknem teljes része eliminálásra kerül. Ezzel szemben a CPD-k eltávolítása kevésbé eredményes, amennyiben a besugárzást követően 24 órával hozzávetőlegesen a keletkezett léziók 40%-a még detektálható a genomban [43, 44]. Ezek alapján az UV-sugárzás által kiváltott mutagén hatásokat jellemzően a CPD léziók keletkezésének szokás tulajdonítani [18, 19]. A kizárólagosan ezen típusú DNS léziók eltávolítására alkalmas CPD-specifikus fotoliáz enzimmel végzett kísérletek kimutatták, hogy az enzim bejuttatásával extrém módon megelőzhető az UV-sugárzás indukálta sejtelhalás és tumorigenezis. Ugyanezen hatások 6-4PP-specifikus fotoliáz bejuttatása esetén nem voltak megfigyelhetők [18, 45]. Mindezek felhívják a figyelmet a CPD léziók kiemelkedő, csaknem kizárólagos szerepére az UV-indukálta mutagenezisben.

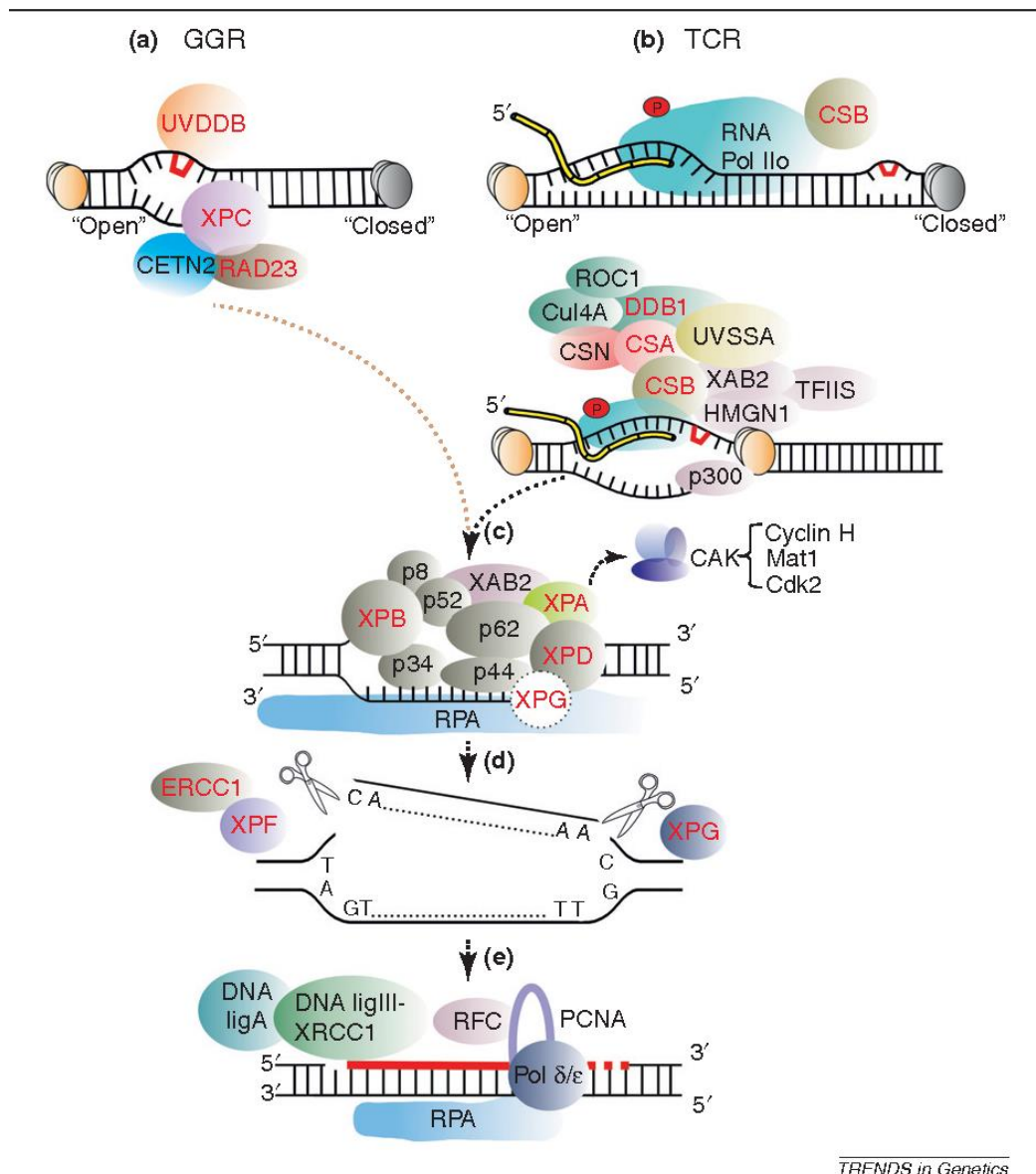
2.3.2. A NER működési mechanizmusa

Az eukariota sejtekben megtalálható NER repair rendszer a DNS-en keletkező nagyméretű, ún. „*bulky*” léziók javításáért felel, amelyek elegendően nagy mértékben torzítják a DNS struktúráját ahhoz, hogy az adott szakaszról történő transzkripciós folyamatok zavart szenvedjenek. A lézió felismerési mechanizmusa és a javítási folyamat iniciációja alapján alapvetően két típusát különböztetjük meg: a genom teljes részén repair funkciót ellátó „*global-*

genome (GG)”, illetve a transzkripciósan aktív gének éppen átíródó szálán jelen lévő léziók felismerésére képes „*transcription-coupled (TC)*” NER-t [42].

Az elsőként említett **GG-NER** az adott lézió típusára nem specifikus, magát a megváltozott DNS struktúrát ismeri fel, ennek következtében az UV-indukálta károsodásokon kívül számos egyéb típusú DNS torzulást is képes detektálni. Magát a felismerést a folyamat kulcsenzime, az XPC (*Xeroderma pigmentosum, complementation group C*) fehérje végzi, amely aztán egyéb fehérjék (pl. RAD23B; DDB2) segítségével stabil komplexet képez a léziót tartalmazó szállal szemközti, komplementer DNS szálon, megjelölve a lézió helyét a genomban [42, 46]. A **TC-NER** esetében ezzel szemben a lézió felismerését az aktívan átíródó szálon végighaladó RNS polimeráz II indítja el, amely a lézióhoz érve megtorpan. Ez odavonzza a repair folyamatot elindító CSA és CSB (*Cockayne syndrome group A és B*) faktorokat, amelyek kiváltják az TC-NER komplex tagjainak kapcsolódását és a javítási folyamat iniciációját [42, 47].

A lézió felismerését követően mindkét esetben a kettős DNS szál felnyitása történik a TFIIH, XPB és XPD helikáz enzimek által kb. 20 bázispár szélességben [46]. A léziót tartalmazó szálon a károsodástól mindkét irányban egyező távolságra (összesen 25-30 bázispár szélességben) az XPG és XPF-ERCC1 endonukleázok által a károsodást tartalmazó szakasz kihalászik a DNS szálból, majd a hiányzó részt az odakötődő DNS polimeráz az épen maradt komplementer szálról szintetizálja újra. Az újonnan keletkezett és az eredeti DNS szál ligálását egyéb faktorok mellett a ligáz 1/3 és XRCC1 fehérjék végzik [42, 47]. Természetesen a teljes javítási folyamatban az említettek mellett számos egyéb fehérje és molekuláris útvonal is közrejátsszik, jelen értekezésben csak a legfőbb folyamatok kerültek bemutatásra (**2. ábra**).



TRENDS in Genetics

2. ábra: A nukleotid excíziós repar (NER) komplex működési mechanizmusa. (a) A genom teljes hosszán működőképes GGR (*global-genome repair*) a lézió következtében torzult DNS szálát ismeri fel. **(b)** A TCR (*transcription-coupled repair*) ezzel szemben csak a genom transzkripciósan aktív régiókban képes a lézió detektálására az átírást végző RNS polimeráz elakadásának felismerése által. Bár a javítás iniciációját különböző enzimek végzik, a folyamat további részében mindkét esetben a léziót tartalmazó szimplaszálú DNS szakasz kihalítása, majd a komplementer szárról történő reszintézise és ligálása történik. A kép forrása: Kamileri I, Karakaslioti I, Garinis GA. Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet.* 2012 Nov;28(11):566-73. doi: 10.1016/j.tig.2012.06.004.

A NER egyes elemeinek ritka genetikai defektusai (pl. *Xeroderma pigmentosum* esetén az XPA-G, *Cockayne szindróma* esetén a CSA/B, illetve *Trichotiodystrophia* esetén az XPD/XPB/TTDN1 fehérjék funkcióvesztéses mutációja) az UV-indukálta DNS károsodások elégtelen javításából adódóan a bőr fokozott fényérzékenységet, neurológiai rendellenességeket

(pl. mozgászavar), illetve *Xeroderma pigmentosum* esetén a rosszindulatú bőrdaganatok korai életkorban történő megjelenését eredményezhetik [48].

Az előbbieket mellett fontos megemlíteni, hogy az eukariota sejtek UV károsodása és a CPD-léziók detektálása esetén a NER repair mellett számos egyéb sejtszintű mechanizmus is működésbe lép az UV-sugárzás hosszú távú, káros hatásainak megelőzése érdekében, amelyek a NER-rel összhangban, azt kiegészítve igyekeznek helyreállítani a sejt normális működését és megakadályozni a tumoros transzformációt. Az UV-indukálta sejtciklus blokk [49, 50], az apoptózis indukció [51] vagy a károsodott sejtorganellumok eliminálását célzó autofágia [52] a sérült genom utódsejtekbe történő továbbörökítését, ezáltal a DNS tartós, irreverzibilis változását hivatott megelőzni a repair folyamatok mellett. Számos tanulmány kimutatta, hogy az ezen folyamatokért felelős kulcsenzimek egymással szoros interakcióban vannak, a köztük lévő kapcsolatot egyes központi szabályzó molekulák (pl. p53, p21, PCNA, Gadd45) szolgáltatják [53-55].

2.3.3. NER gátló molekulák a klinikumban

A NER működése kémiai úton számos módon befolyásolható. A komplex kémiai gátlása – annak összetett működéséből adódóan – rendkívül változatos szerkezetű és működési mechanizmussal bíró molekula által kiváltható. Az utóbbi években megjelent tanulmányok alapján több molekula esetében igazolható, hogy képes a NER fehérjéinek *in vitro* gátlására, ezáltal a javítási folyamat hátráltatására [56-60]. Bár az inhibitor hatás *in vitro* bizonyított, a molekulák közül nem egy a klinikai gyakorlatban régóta használatban van (pl. a diuretikumként alkalmazott spironolactone [61]), míg mások klinikai tesztek alanyai egyéb ígéretes tulajdonságuk miatt (pl. a PARP1 specifikus inhibitoraként alkalmazott veliparib szolid tumorok kezelésére [62, 63]). Annak ellenére, hogy jelenleg nem áll rendelkezésünkre *in vivo* adat, amely megerősítené ezen hatóanyagok negatív hatásait az UV sugárzás által kiváltott carcinogén folyamatokra, bizonyított NER gátló tulajdonságuk miatt nem vethető el annak a lehetősége, hogy a molekulák *in vivo* alkalmazása esetén megnő az UV-indukálta tumorigenezis esélye.

Az értekezés további részében négy, az előbbieken említésre került jellemzővel bíró, éppen ezért potenciálisan ellentmondásos hatású molekula kerül részletesebb bemutatásra.

a) Veliparib

A veliparib a Poly [ADP-ribóz] polimeráz (PARP) fehérjecsald – köztük a DNS károsodás downstream folyamataiban aktívan részt vevő PARP1 protein - specifikus inhibitora [57, 64] (**3.A ábra**). A PARP1 a proteincsalád legjobban körülírt és a sejten belül legnagyobb számban előforduló tagja. A PARP1 a sejt DNS károsodását követően részt vesz a keletkezett DNS lézió felismerésében, a repair folyamat iniciációjában, valamint a folyamathoz nélkülözhetetlen kromatin remodellezésben. Az UV-indukálta DNS léziók létrejötte esetén a DDB2 [65, 66] és az XPC fehérjével [67] kölcsönhatva segíti a lézió eltávolítását a GG-NER által. Emellett a CSB (TC-NER kulcsenzime) proteinnel történő interakcióját is kimutatták [68]. A PARP1-indukálta poly(ADP-ribozil)ációnak ugyancsak jelentős szerepe van a repair iniciációt követően a léziót tartalmazó, szimpla-szálú nukleotid szakasz eliminálásában [66]. A PARP1 fehérje UV-repair folyamatokban betöltött kiemelkedő fontosságát igazolja, hogy tanulmányok szerint a PARP1 enzim gátlása esetén a sejtek jelentősen megnövekedett érzékenységet mutatnak UVB besugárzásra [57, 66]. Bár az előbbiek alapján feltételezhető a PARP1 aktivitás védő hatása az UVB-indukálta carcinogenezissel szemben, más vizsgálatokban a PARP1 jelentős overexpresszióját tapasztalták számos különféle tumoros szövetben [69-73] Utóbbi esetben a megnövekedett PARP1 kifejeződés sokszor rendkívül rossz prognózissal járt [70, 71, 74, 75]. A PARP1 aktiváció következtében megemelkedett tumor progressziót gyakran az NFkB útvonal serkentése által indukált gyulladáscsökkentő folyamatoknak, illetve megemelkedett sejttúlélésnek tulajdonítják [76]. Mindezek miatt a veliparib [62-64, 77, 78] és a PARP1 egyéb gátlószerei [70, 79-81] különféle tumoros megbetegedések kezelését célzó klinikai tesztek ígéretes alanyai. A PARP specifikus gátlását kiváltó Olaparibot 2020-ban mint elsőként választandó kezelést jelölték meg előrehaladott petefészekrákos betegek terápiája során [82].

b) Resveratrol

Napjainkban egyre növekvő érdeklődés figyelhető meg a különböző természetes eredetű fitofenol molekulák klinikai felhasználása iránt. Az elsősorban sötét színű bogyós gyümölcsökből izolálható resveratrol különösen intenzíven kutatott gyulladáscsökkentő [83-86], antioxidáns [86, 87] és anti-carcinogén [88-90] hatásai miatt (**3.B ábra**). Az UV-sugárzás által indukált tumor formációval szembeni védő hatását mindemellett azon képességének is tulajdonítják, hogy képes növelni a sejtek apoptotikus válaszát besugárzást követően, ezáltal csökkenteni a potenciálisan malignusan transzformálódó sejtek túlélésének esélyét [88, 91]. A

resveratrol UV-sugárzással összefüggő hátrányos hatásaira vonatkozóan jelenleg kevés ismerettel bírunk, bár egyes tanulmányok felhívják a figyelmet, hogy a molekula bizonyos körülmények között képes növelni az NFkB és IL-8 által indukált gyulladásos folyamatokat [92], valamint növelni a keratinocitákat ért oxidatív stresszt UVA sugárzást követően [93]. Mindezek mellett a resveratrol a 8-oxoguaninok, a szimplaszálú DNS törések, valamint a CPD léziók javítási hatékonyságát is bizonyítottan csökkenti [56]. Mindezek ellenére a resveratrol potenciálisan mutagén hatását *in vivo* bemutató vizsgálat tudomásunk szerint eddig nem készült.

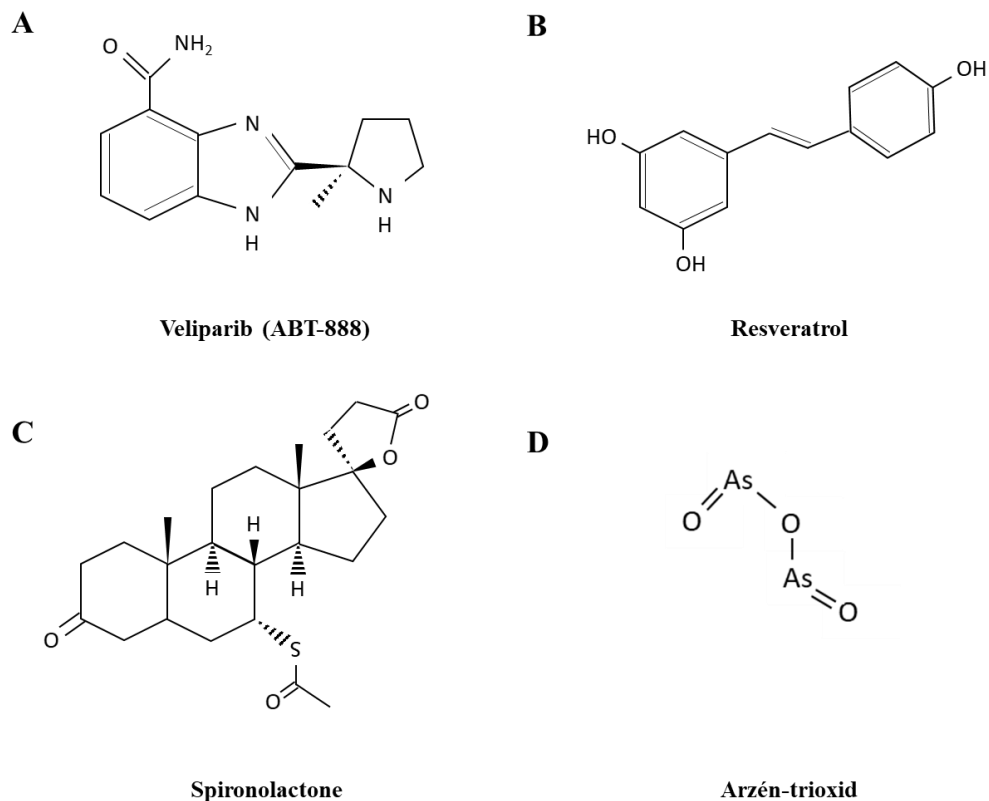
c) Spironolactone

A spironolactone mineralocorticoid antagonist a klinikumban kálium-megtakarító diuretikumként használatos a vesében található Na^+/K^+ pumpák specifikus gátlószereként [61] (**3.C ábra**). A gyógyászatban egyebek mellett progresszív szívelégtelenségben [94, 95] és hipertóniában szenvedő betegeknél alkalmazzák [94], illetve antagonist (tesztoszteron szintézis és androgen receptor gátló) tulajdonságait *off-label* használják ki - pl. *acne* kezelésére [96]. *In vitro* kísérletekben azonban sikerült bebizonyítani, hogy keratinocitákban a NER specifikus inhibitoraként is funkcionálhat, melynek során a komplex működésében szerepet játszó XPB fehérje gyors proteozómális lebomlását váltja ki. Ebből adódóan elégtelenné válik az UV-indukálta 6-4PP és CPD léziók DNS szárlól történő eliminálása, és fokozódik az UV-indukálta sejtelhalás [59, 60, 97]. A tanulmányok szerint a NER gátlás mechanizmusa nem feltétlenül függ össze a molekula minerokortikoid/androgén receptor gátló hatásával, amennyiben az androgén receptor más, strukturálisan hasonló inhibitorainál nem figyeltek meg ilyen irányú változásokat a sejtek repair kapacitásában [59, 97]. Bár a spironolactone *in vivo* alkalmazásakor az esetek igen kis százalékában fellépő fotoszenzitivizációs reakció már leírásra került [98, 99], nem rendelkezünk adatokkal arra nézve, hogy az inhibitor alkalmazása a DNS hibajavítási folyamatok elégtelenségéből adódóan megnövelné az UV-indukálta bőrrák kialakulásának kockázatát.

d) Arzén-trioxid

A különböző anorganikus arzén származékok jól ismert genotoxikus és mutagén vegyületek [100, 101], az UVB sugárzással összekötött ko-karcinogén tulajdonságuk pedig *in vitro* [102] és *in vivo* is bizonyított [103-105]. Utóbbiért a NER komplex egyes proteinjének gátlása legalábbis részben felelős lehet [58, 106, 107], bár a pontos molekuláris mechanizmus

egyelőre nem ismert. Az arzén-trioxid, mint anorganikus arzén származék egy rendkívül agresszív és ellentmondásos hatású molekula, amennyiben az előbbieken leírtak ellenére régóta eredményesen használják az akut promielocitás leukémia terápiájában [108-110], gyakran all-transz retinsavval kombinálva [111, 112] (**3.D ábra**). Ennek egyik oka, hogy az arzén-trioxid hatásosan fokozza a sejtszintű apoptotikus választ elsősorban a Bax/kaspáz-3 útvonalon keresztül [113, 114], amely hatás az úgynevezett multidrug-rezisztens sejtvonalakon is kimutatható [115]. Az arzén-trioxid citotoxikus és anti-tumorigén hatásaiban valószínűleg autofágia indukció [114, 116], ROS-mediálta folyamatok [113], illetve immunológiai változások [117, 118] is szerepet kapnak. Mindezek után az arzén-trioxid hatásának megítélése az UV-indukálta tumorigenezisre a tudományos szakirodalomban erősen ellentmondásos.



3. ábra: Az értekezés során tárgyalt, NER inhibitor hatású molekulák kémiai szerkezete. (A) A veliparib, (B) a resveratrol, (C) a spironolactone, illetve (D) az arzén-trioxid rendkívül különböző kémiai felépítéssel bíró, a klinikai gyakorlatban alkalmazott molekulák, melyek mindegyike bizonyítottan képes kiváltani az UV-indukálta fotoléziók javításában szerepet játszó NER komplex működésének gátlását.

2.4. Növényi molekulák felhasználása az UV-válasz módosításában

2.4.1. Általános áttekintés

Mint az a korábbiakban már röviden említésre került, a különböző növényi származású, természetes vegyületek rendkívül nagy társadalmi bizalomnak örvendenek a klinikai felhasználás terén, ez alól pedig az UV sugárzás káros hatásainak megelőzésére vagy kezelésére irányuló kutatások sem kivételek. Ezen vizsgálatok során legtöbbször az UV-indukálta ROS akkumuláció elkerülése végett alkalmaznak növényi komponenseket, mivel ezek a vegyületek sok esetben rendkívül hatásosak a keletkezett oxigéngyökök megkötésében (pl. bogyós gyümölcsökből kivont resveratrol [86, 87], *Polypodium leucotomos* páfránykivonat [119], epigallocatechin-3-gallát zöldteakivonat [120], valamint a számos zöldségben és fűszernövényben megtalálható luteolin [121]). Az ilyen, ún. ROS-scavenger molekulák alkalmazásával elkerülhető a celluláris kompartmentek oxidatív károsodása (pl. oxidatív DNS léziók keletkezése, lipid peroxidáció), amelyek különben az érintett sejtek elhalását okoznák [35]. Egyes tanulmányok azonban felvetik a lehetőségét, hogy a sejttúlélés támogatása a károsodást követően potenciálisan malignus transzformációnak adhat teret [122]. Példának okáért az előző fejezetben bemutatott növényi eredetű resveratrolt többek között éppen az apoptózist serkentő hatása miatt találták megfelelőnek az UV-indukálta tumorigenezis megelőzésére [89, 91]. A növényi eredetű molekulák UV-védelemben történő felhasználása során azok jelentős antioxidáns kapacitása mellett gyakran felmerülnek a különböző gyulladásos folyamatokra [84, 119] és autofágiára [90, 121] kifejtett előnyös tulajdonságaik is.

2.4.2. A *Silybum marianum* növényi kivonatának (silymarin) felhasználása bőrgyógyászati vizsgálatokban

A máriatövis (*Silybum marianum*) magjából nyert silymarin számos bioaktív komponenst tartalmazó (pl. silibinin, silychristin, silydianine, taxifolin) flavonoid komplex, amelynek antioxidáns [123, 124], gyulladáscsökkentő [124, 125], antifibrotikus [126] és immunmoduláns [127] hatása régóta ismert. Egyebek mellett ezen tulajdonságai teszik lehetővé hepatoprotektív hatóanyagként történő alkalmazását májkárosodást szenvedett betegeknél [128]. Az UVA-indukálta apoptotikus és carcinogén folyamatokra kifejtett védő hatását csakugyan kimutatták [129, 130], egyes komponensei pedig UVB-sugárzás esetén is

hatékonyak bizonyultak [131-133]. Ennek köszönhetően a silymarin hatóanyagának fényvédő szerként történő előállítása és formulázása rendkívül ígéretes.

Ennek ellenére a silymarin felhasználását illetően több tanulmány is fellelhető, amely megkérdőjelezi annak klinikai alkalmazhatóságát. Nem egy esetben a silymarin erős fényérzékenyítő hatását tapasztalták UV-sugárzásnak kitett keratinocitákon [134, 135], amely ellentmondást mutat a korábbi, a növényi kivonat fényvédő hatását leíró kutatásokkal. Elképzelhető, hogy az ellentmondás a különböző forrásokból származó silymarin bioaktív komponenseinek eltérő arányaival magyarázható, azaz hogy a különböző komponensek egymáshoz viszonyított mennyisége a földrajzi térség, illetve a felhasznált növényi részek függvényében eltérhet [136, 137]. A bőrön történő alkalmazás során szintén problémát jelent a silymarin rendkívül rossz vízdékonyságából származó alacsony biohasznosulása, ami a hatóanyag megfelelő, penetrációt segítő formulázása révén bizonyos mértékben kompenzálható lenne [138].

3. Célkitűzés

Az UV-sugárzás által indukált CPD képződés tehát a korábbiakban leírtak alapján nagymértékben hozzájárul a károsodott sejtek mutagenéziséhez, és ezáltal patológiás körülmények között a későbbi bőr tumorigenezishez. A CPD léziók hosszabb távú hatása nagyban függ a sejt belső repair mechanizmusainak működésétől, melyek közül az UV-indukálta DNS léziók esetén a nukleotid excíziós repair (NER) rendszert tekintjük a leghangsúlyosabbnak. Ezen rendszer működésének csökkentését vagy gátlását igen gyakran az UV sugárzás mutagén hatásának fokozódásával, valamint a bőrrák kialakulásának megemelkedett kockázatával szokás párhuzamba állítani.

A veliparib, a resveratrol, a spironolactone és az arzén-trioxid rendkívül különböző működési mechanizmussal bíró, a gyógyászatban *in vivo* használatos molekulák, melyek mindegyike bizonyítottan képes a NER működésének bizonyos fokú gátlására. Ennek ellenére a bőrrák kialakulásának fokozott rizikóját az alkalmazásukat követően még nem írták le, ami megkérdőjelezi a NER aktivitásának csökkenése és a mutagén folyamatok között korábban feltételezett lineáris kapcsolatot. A növényi eredetű silymarin bőrgyógyászati felhasználása hasonlóan ellentmondásos, amennyiben a hatóanyag antioxidáns és fényvédő tulajdonságait leíró tanulmányok mellett a kivonat fototoxikus mivoltáról is találunk adatokat. A silymarin sejtszintű repair aktivitásra, valamint UV-indukálta mutagenézisre kifejtett hatásáról rendkívül kevés információ áll rendelkezésünkre.

Kutatásaink során ezért a következő célokat tűztük ki:

1. A veliparib, a resveratrol, a spironolactone és az arzén-trioxid NER gátló képességének igazolását, valamint az oldatok UVB-mutagenézisre kifejtett hatásának vizsgálatát *in vitro* epitheliális sejt kultúrákon, a NER gátlás és az UV-indukálta mutációs teher közötti kapcsolat pontosabb feltárása érdekében.
2. Az előbbieken említett molekulák hatásának vizsgálatát az UVB-indukálta mutáció formációt befolyásoló egyéb útvonalakra (apoptosis, sejt ciklus blokk, autofágia).
3. A növényi eredetű silymarin kivonat hatásának vizsgálatát UVA és UVB irradiált humán keratinocita sejtek életképességére. A kísérletek során a silymarin oldat különböző, penetrációt segítő formulációit, valamint különböző forrásból származó silymarin porok hatásait is vizsgáltuk megegyező kísérletes rendszerben.
4. Különböző eredetű és formulációjú silymarin oldatok hatásának igazolását az UVA-indukálta ROS képződésre, CPD akkumulációra és mutációs rátára.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Sejtkultúrák

A kísérletekhez immortalizált, *in vitro* tenyésztett HaCaT (Cultured human keratinocyte; ATCC, Manassas, VA, USA) és CHO-K1 (Chinese hamster ovary) sejtvonalat használtunk. A CHO sejtvonal a Debreceni Egyetem ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetének ajándéka volt. A sejteket mindkét esetben 4500 mg/ml glükózt tartalmazó, L-glutaminnal kiegészített DMEM (Dulbecco's modified eagle media; Biosera, Budapest, HU) oldatban tenyésztettük, a komplett tápoldat ezen kívül 10% hő-inaktivált FBS-t (fetal bovine serum; Biosera) és 0,5% antibiotikum/antimikotikum oldatot (penicillin-streptomycin-amphotericin B; Biosera) tartalmazott. A sejteket 37°C-os, 5% CO₂-ot tartalmú környezetben tartottuk fenn.

4.2. A sejtek kezelése

4.2.1. Veliparib, resveratrol, spironolactone és arzén-trioxid kezelés

A CHO és HaCaT sejteket kísérlettől függően 6 vagy 24-lyukú plate-ekben tenyésztettük a 70-80%-os konfluenciaszint eléréséig. Ekkor a sejtek médiumához 25 µM veliparib (Selleckchem, Houston, TX, USA), 10-50 µM resveratrol (Abcam, Cambridge, UK), 5-25 µM spironolactone (Selleckchem) vagy 0,5-4 µg/ml arzén-trioxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmú oldatot adtunk hozzá. Az arzén-trioxidot 1 M NaOH oldatban oldottuk, majd DPBS-ben (Dulbecco's phosphate-buffered saline, Biosera) hígítottuk a törzsoldat végleges koncentrációjára (10 mg/ml). A többi oldat DMSO-ban (dimetil-szulfoxid, Sigma) került beoldásra, a sejtek kezeléséhez használt oldatokban a DMSO végkoncentrációja nem érte el az 1%-ot.

A veliparib (PARP1 inhibitor molekula) esetén a sejtek kezeléséhez azt a koncentrációt választottuk, amely korábbi kísérleteink alapján a PARP1 fehérje működésének teljes gátlását kiváltotta [57]. A többi, az előzőnél jóval sokrétűbb és részben ismeretlen hatású vegyület esetében három különböző koncentrációt választottunk, amelyek eltérő mértékben voltak képesek indukálni az általunk megfigyelt sejtszintű változásokat. A kezeléseket követően a sejteket 120 percig inkubáltuk az inhibitor jelenlétében mielőtt UVB besugárzásnak tettük ki őket.

4.2.2. Silymarin kezelés

A kísérletekhez háromféle forrásból származó silymarin port használtunk fel:

- a Sigma-Aldrich által, a *Silibum marianum* terméséből laboratóriumi felhasználásra előállított silymarin port (a sejtek kezeléséhez etanolban oldottuk be),
- a táplálék kiegészítőként kereskedelmi forgalomban lévő TEVA-Silegon (Teva Pharmaceutical Industries Ltd., HU) silymarin tartalmú tablettá porításával, majd etanolban történő beoldásával nyert silymarin oldatot,
- valamint a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karán működő Gyógyszertechnológia Tanszék munkatársai által előállított négy silymarin tartalmú oldatot. Utóbbi esetben a silymarin hatóanyagát *Silibum marianum* magjából nyerték ki [139], a bioaktív hatóanyagok HPLC-MS technológiával kerültek azonosításra [140]. Az oldatok összetétele a silymarin sejtekbe történő hatékonyabb penetrációját, ezáltal magasabb mértékű biohasznosulását hivatott kiváltani [138]. Az oldatok pontos összetételét az **1. táblázat** tartalmazza.

A silymarin kezelésekhöz HaCaT sejteket tenyésztettünk a kísérlet típusától függően 24 vagy 96-lyukú plate-ekben a 70-80%-os konfluenciaszint eléréséig. A tiszta silymarin oldatok esetében (Sigma/Teva) a sejteket 10-250 µg/ml hatóanyag koncentrációjú oldattal kezeltük. A penetrációt elősegítő oldatoknál minden esetben 250 µg/ml volt a silymarin végkoncentrációja a sejtek tenyésztőmédiumában. A kezeléseket követően a sejteket 30 percig inkubáltuk UVA besugárzás előtt.

Összetevők (g)	Oldatok sorszáma			
	1.	2.	3.	4.
Silymarin por	0,25	0,25	0,25	0,25
Transcutol	----	-----	0,71	0,71
Szukróz-észter SP50	0,15	----	0,15	---
Szukróz-észter SP70	---	0,15	---	0,15
Propilén-glikol	0,25	0,25	0,25	0,25
Sejttenyésztő oldat (DMEM)	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

1. táblázat: A kísérletek során felhasznált, a sejtekbe történő penetráció fokozását célzó, silymarin tartalmú oldatok összetétele

4.2.3. UV irradiáció

Az inkubációt követően a sejtek tenyésztőoldatát eltávolítottuk, a sejteket DPBS-sel átmostuk, majd vékony réteg 1 g/L glükózzal (Duchefa Biochemie, Haarlem, NE) 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. KG, Villingen-Schwenningen, DE) tettük ki. A besugárzást jégen végeztük a sejteket érő hő-sokk megelőzése és a repair folyamatok ideiglenes gátlása érdekében. A kontroll minták szintén jégen, de az UVA sugárzástól védve voltak a besugárzás ideje alatt.

A sejtek UVB irradiációja esetén a plate-eket kísérlettől függően 10 vagy 20 mJ/cm² UVB sugárzásnak (TL-20W/12 RS UVB csövek; Philips, Eindhoven, NE) tettük ki az előzőekkel megegyező módon. A besugárzás rövid időtartama miatt ebben az esetben nem volt szükség a sejtek jéggel történő hűtésére.

A sejteket érő pontos UV dózist mindkét esetben UVX Digital Radiometer (UVP Inc., San Gabriel, CA, USA) segítségével határoztuk meg. A besugárzást követően a korábbi (inhibitort tartalmazó) tápoldatot jutattuk vissza a sejtekre. Silymarin kezelés esetén a sejteket friss (silymarint nem tartalmazó) DMEM-ben tenyésztettük tovább.

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

24 órával az UV besugárzást követően a sejtek felülúszóját a benne található elhalt sejtekkel eltávolítottuk, majd az élő (letapadt) sejtekből genomi DNS-t izoláltunk. A DNS kivonását Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével végeztük a gyártó javaslatainak megegyező módon.

A CPD-specifikus ELISA mérésekhez *Boros et al.* által beállított protokollt használtuk [141]. A kísérletekhez lapos fenekű, 96-lyukú plate-eket használtunk, melyeket előzőleg 0,003%-os protamin-szulfát oldattal vontunk be, majd hagyunk kiszáradni. A vizsgálathoz használt DNS mintákat 10 perc 100°C-os hevítéssel denaturáltuk, majd 15 percre jégre helyeztük. Ezt követően mintánként 3x15 ng DNS-t vittünk fel a korábban leírt módon előkészített plate-re, majd 37°C-on hagytuk beszáradni. A plate-ek háromszoros PBS-T-vel (0,05% Tween-20-t (Amresco, Solon, OH, USA) tartalmazó PBS oldat) történő mosását követően, a nem-specifikus antigén kötődés megelőzése érdekében 150 µl/well 10%-os FBS oldattal 30 percig blokkoltuk a kötőhelyeket 37°C-on. A mintákat újabb mosás után inkubáltuk 100 µl/well anti-CPD monoklonális antitesttel (TDM-2, 1:1500 hígítás, Cosmo Bio Co., Ltd.,

Tokyo, Japan) 60 percig, majd – mosást követően – 30 percig HRP-konjugált anti-egér IgG másodlagos antitesttel (1:3000 hígítás, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A plate-eket háromszor mostuk PBS-T-vel, majd egyszer 150 $\mu\text{L}/\text{well}$ citrát-foszfát pufferral (0,51% $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ és 0,73% Na_2HPO_4 ioncserélt vízben oldva; pH 5.0). A színreakció létrejöttéhez 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ szubsztrát-oldatot (0,04% o-phenylenediamine (Sigma) és 0,006% H_2O_2 citrát-foszfát pufferban oldva, a H_2O_2 -ot közvetlenül felhasználás előtt adtuk hozzá) mértünk a mintákra. A színreakció létrejötte után 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 2N H_2SO_4 oldattal leállítottuk a folyamatot. A különböző minták abszorbancia értékeit 492 nm-en olvastuk le Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, Budapest, HU) segítségével.

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

Silymarin kezelést követően 24 órával mértük a HaCaT sejtek viabilitását MTT assay segítségével. A felülúszó leszívása után a sejteket PBS-sel mostuk, majd 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MTT-t (Thermo Fisher Scientific) tartalmazó, fenolred-mentes DMEM-mel (HyClone; GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, USA) borítottuk be. A sejteket 3 óráig inkubáltuk 37°C-on. Az inkubációs idő végén a felülúszót eltávolítottuk és 0,04 M izopropanolban oldott HCl oldatra cseréltük a keletkezett formazánkristályok feloldása céljából. Az abszorbancia értékeket 590 nm-en olvastuk le (háttér kivonás: 620 nm) Epoch Microplate Spectrophotometer segítségével.

4.5. Apoptosis assay

A sejtek viabilitását 24 órával UVA besugárzás vagy 48 órával UVB besugárzás után vizsgáltuk Alexa Fluor 488-konjugált Annexin V és propidium-jodid (Alexa FluorTM 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit, Thermo Fisher Scientific) kettős jelölést követő áramlási citometriás méréssel. A sejtek festését a gyártó útmutatásai szerint végeztük. A sejtek áramlási citometrias analíziséhez FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) áramlási citométert és CellQuestPro 5.2 szoftvert (Becton Dickinson) használtunk. A fluoreszcencia intenzitást FL-1 (Annexin V) és FL-3 (propidium-jodid) csatornán mértük, az adatok kiértékeléséhez FlowJo 10.6.2. (Becton Dickinson) szoftvert használtunk.

4.6. ROS (reaktív oxigéngyök) produkciós mérések

A sejtek intracelluláris ROS termelését DHE (dihydro-ethidium) festést követő áramlási citometriás méréssel végeztük. Közvetlenül UVA besugárzás után a sejteket DPBS-sel mostuk, majd 200 nM DHE-t (Thermo Fisher Scientific) tartalmazó PBS oldattal kezeltük. 30 min inkubációt követően a letapadt sejteket trypsin-EDTA (Biosera) oldattal begyűjtöttük. A sejtek áramlási citometrás analíziséhez FACS Calibur (Becton Dickinson) áramlási citométert és CellQuestPro 5.2 szoftvert (Becton Dickinson) használtunk, a fluoreszcencia intenzitást FL-3 csatornán mértük. Az adatok kiértékeléséhez FlowJo 10.6.2. (Becton Dickinson) szoftvert használtunk.

4.7. Sejtciklus analízis

A sejtciklus progresszió vizsgálatát UVB besugárzást követően 1, 3 és 6 nappal végeztük. A sejteket trypsin-EDTA oldattal begyűjtöttük, majd DPBS mosást követően jéghideg 80%-os etanolban (VWR, Radnor, PA, USA) fixáltuk. A mérés további részében minden mintából megegyező számú sejtet használtunk fel. A sejteket centrifugálást követően (5 min, 3500 rpm) szuszpendáltuk 50 μ L/minta DPBS-ben, kiegészítve 0,2 mg/mL RNase A (Sigma), 0,2% Triton-X 100 (Amresco, Solon, OH, USA) és 5 mg/mL PI oldattal. A sejteket 45 percig inkubáltuk 37°C-on, majd a mintákat 0,5% BSA (bovine serum albumin, VWR) oldattal egészítettük ki. A sejtciklus progresszió analíziséhez FACS Calibur (Becton Dickinson) áramlási citométert használtunk, a fluoreszcencia intenzitást FL-2 csatornán mértük. A mérési hibák elkerülése végett az elemzés során a doublet (összetapadt) sejtek kizárása kerültek. Az adatok kiértékeléséhez FlowJo 10.6.2. (Becton Dickinson) szoftvert használtunk.

4.8. HPRT gémutációs assay

A CHO sejteket HAT-tal (hypoxanthine-aminopterin-thymidine; HAT Media Supplement (50 \times) Hybri-Max™, Sigma) kiegészített szelektív DMEM-ben tenyésztettük egy hétig a sejt kultúrában található spontán HPRT-mutáns sejtek eliminálása céljából. A sejtek kezelését és UV irradiációját követően a sejt kultúrát további egy hétig fenntartottuk normál összetételű, komplett DMEM tenyésztőoldatban. Ezután a sejteket trypsin-EDTA oldattal begyűjtöttük, majd a kísérlet következő lépéseire minden minta esetében megegyező számú (~1x10⁶) sejtet vittünk tovább. A sejteket 100 mm átmérőjű műanyag petri-csészékbe raktuk

ki 5 μ M 6-thioguanine-t (6-TG; Sigma) tartalmazó szelektív DMEM-be. A HPRT génben tartós, funkcióvesztéssel járó mutációt hordozó sejtek (6-TG rezisztens sejtek) 10 napon belül szabad szemmel látható, kvantifikálható kolóniákat képeztek. Ezután a petri csészék felülúszóját eltávolítottuk, PBS-sel mostuk és 10 percig, 100%-os metanol oldattal fixáltuk a letapadt sejteket. A keletkezett kolóniákat May-Grünwald-Giemsa (Molar Chemicals, Halásztelek, HU) festéssel tettük láthatóvá. Pozitív kontrollként 10 μ M 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine-nel (MNNG; TCI Europe N.V., Zwijndrecht, Belgium) kezelt sejteket használtunk.

4.9. Western blot

A sejteket proteáz inhibitor koktéllal (hígítás: 1:1000) kiegészített RIPA puffer (Sigma) felhasználásával lizáltuk 2, 6, illetve 24 órával az UV irradációt követően. A lizátumokat 4°C-on centrifugáltuk (15.000 rpm; 5 min), a továbbiakban az oldatok felülúszójával dolgoztunk. A fehérje oldatok koncentrációját Pierce BCA assay kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztuk meg a gyártó utasításait követve. A koncentráció meghatározása után a mintákat 5X-ös loading pufferral (Bromophenol blue (0,25%), β -Mercaptoethanol (5%), Glycerol (50%), SDS (sodium dodecyl sulfate; 10%; Duchefa Biochemie) egészítettük ki, majd 10 percig 100°C-on forraltuk a fehérjék denaturálása céljából.

A proteinek méret szerinti szeparálását a vizsgált protein molekulatömegétől függően 7,5, 10 vagy 12,5%-os poliakrilamid gélen végeztük, a szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) vittük át. A membránokat TBS-T-vel (0,05% Tween-20-szal kiegészített TBS puffer) mostuk, majd 1 óráig blokkoltuk 5%-os zsírszegény tejpor oldatában a nem-specifikus antitest bekötődés megelőzése végett. A membránokat 4°C-on, „overnight” inkubáltuk a primer antitesttel 5%-os BSA oldatban. (A kísérletekhez használt antitestek leírását a **2. táblázat** tartalmazza.) TBS-T mosást követően a membránokat tormaperoxidázzal (HRP) konjugált kecske eredetű anti-egér/anti-nyúl) IgG szekunder antitesttel (Bio-Rad; hígítás: 1:2000) inkubáltuk 1 óráig, a membránok óvatos rázása mellett. Mosást követően a jelölt fehérjesávok vizualizálását Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) vagy SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük. Az adatok kvatifikálásához ImageJ 1.8.0 szoftvert használtunk.

Antitest	Klón	Hígítás	Gyártó
LC3I-II	D3U4C	1:100	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
mTOR	2972S	1:1000	Cell Signaling Technology
Foszfo-mTOR	S2481	1:1000	Cell Signaling Technology
p53	CM 042 C	1:1000	Biocare Medical, Pacheco, CA, USA
Foszfo-p53 ^{Ser15}	16G8	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-PAR (10H)	sc-56198	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
β-aktin	8H10D10	1:4000	Cell Signaling Technology

2. táblázat: A fehérjeexpressziós mérések során használt monoklonális antitestek adatai.

4.10. Az adatok statisztikai analízise

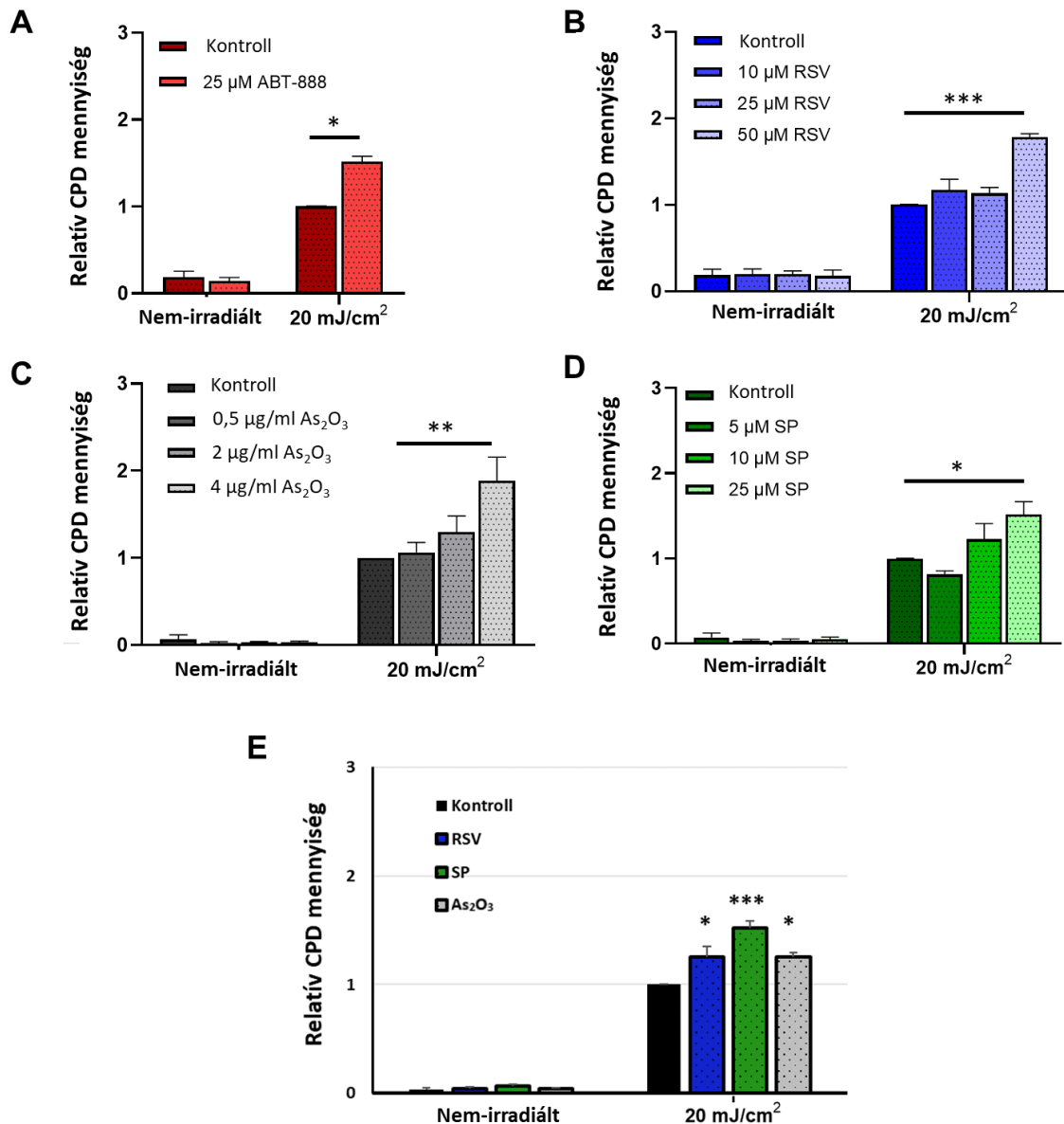
Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk teszttel határoztuk meg. Két csoport összehasonlítására – normális eloszlás esetén – független kétmintás t-próbát használtunk. Három vagy több csoport összehasonlítására Dunnett's post-hoc teszttel kiegészített egytényezős ANOVA-t végeztünk (amennyiben az adatok eloszlása normális volt). Nem-normál eloszlás esetén Dunn's post-hoc teszttel kiegészített Kruskal-Wallis tesztet használtunk. Az adatok statisztikai analízisét GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) és SPSS 25 szoftver (SPSS package for Windows, Release 25.; SPSS, Chicago, IL, USA) segítségével végeztük. Az értekezésben bemutatott ábrákon az egyes kísérletek adatainak átlagát ± SEM tüntettük fel, a statisztikailag szignifikáns eltéréseket *, ** és *** jelölésekkel láttuk el, melyek jelentése rendre $P < 0,05$, $P < 0,01$ és $P < 0,001$.

5. Eredmények

5.1. Az UVB mutagenesis csökkentése, valamint a sejt szintű UVB-válasz módosítása NER gátló hatású molekulák segítségével

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

Korábbi vizsgálatok szerint a veliparib [57], a resveratrol [56], az arzén-trioxid és egyéb arzéntartalmú vegyületek [58, 102, 107], valamint a spironolactone [59, 60, 97] egyaránt a NER rendszer működésének gátlását, ezáltal az UVB-indukálta CPD léziók akkumulációját idézheti elő az UV-expozíciónak kitett sejtekben. Kutatásaink során ennek igazolására UVB sugárzásnak kitett CHO sejteken végeztünk előkezelést a fent megnevezett molekulák oldataival 2 órával az UV besugárzást megelőzően. A sejteket 25 μM veliparib (ABT-888), 10-50 μM resveratrol, 5-25 μM spironolactone vagy 0,5-4 $\mu\text{g/ml}$ arzén-trioxid oldattal kezeltük, majd 20 mJ/cm^2 UVB sugárzásnak tettük ki. A besugárzást követően 24 órával detektáltuk a sejtek genomjában fennmaradó CPD léziók relatív mennyiségét. Az irradiált sejtek genomjában detektálható CPD-k száma minden esetben szignifikánsan magasabb volt a kezelést követően a kontroll (csak UVB besugárzáson átesett) sejtekhez viszonyítva. Egyes esetekben ez az emelkedés a kontrollhoz képest az 50%-ot is meghaladta (**4.A-D ábra**). A veliparib hatására bekövetkező fokozott CPD akkumulációt HaCaT sejtek esetében munkacsoportunk már egy korábbi kísérlet során is kimutatta [57]. Az eredmények megerősítése érdekében a többi inhibitorral végzett vizsgálatot is megismételtük HaCaT keratinocita sejtvonalon, minden kezelésnél a korábbi mérések során leghatásosabbnak bizonyult kezelési koncentrációt alkalmazva (**4.E ábra**). Az eredmények alapján az említett molekulák korábban leírt, a CPD léziók eliminálására kifejtett gátló hatása és a kezelés következtében a léziók emelkedett akkumulációja a genomban az általunk használt kísérletes rendszerben is igazolható volt.



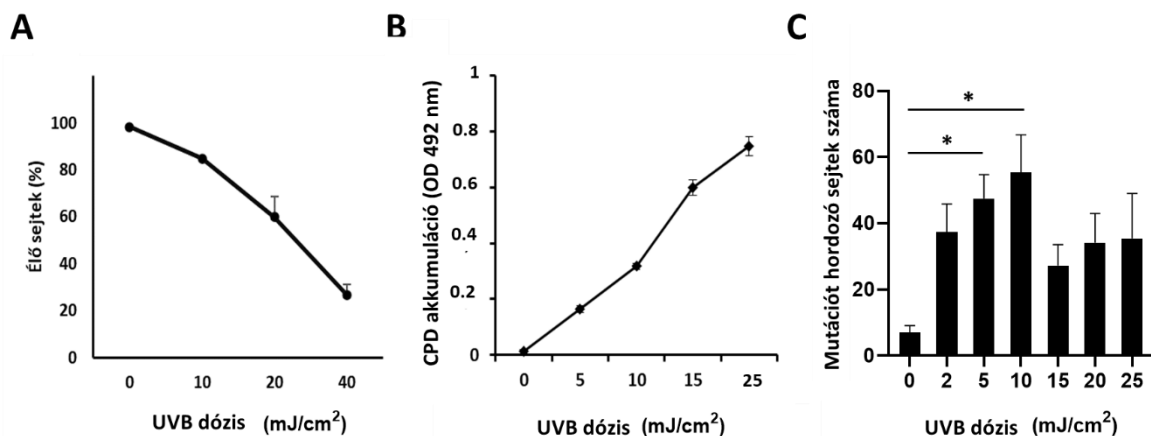
4. ábra: A CPD fotoléziók relatív mennyisége UVB besugárzást követően. (A) Veliparib (ABT-888), (B) resveratrol (RSV), (C) arzén-trioxid (As₂O₃) és (D) spironolactone (SP) kezelést követően CHO sejteket 20 mJ/cm² UVB sugárzásnak tettük ki, majd CPD-specifikus ELISA segítségével detektáltuk a sejtek DNS-ében található léziók számát 24 órával a besugárzást követően. (E) A kísérleteket megismételtük HaCaT sejteken az általunk leghatékonyabbnak talált RSV, SP és As₂O₃ koncentrációkkal történő kezelést követően. A CPD-k mennyiségét a kezelés nélküli (kontroll), UVB-irradiált minták értékeivel normalizáltuk. Az ábrák n_≥3 független kísérlet átlagát ± SEM mutatják, ahol *, ** és *** a statisztikailag szignifikáns eredményeket jelölik (p<0,05; p<0,01 és p<0,001).

5.1.2. A CPD akkumuláció és mutagenézis kapcsolatának vizsgálata in vitro

A következőkben szeretnénk volna felmérni az UV-indukálta CPD léziók genomi akkumulációja és a javítatlan léziókból adódó DNS mutációk kialakulása közötti kapcsolatot.

Az UVB-indukálta mutagenézis mértékének meghatározása érdekében HPRT génmutációs assay-t végeztünk. Az említett metodika segítségével egy adott sejtpopulációt szelektív tápközegbe helyezve kiszelektálhatók a sejtpopuláció azon egyedi sejtjei, amelyek valamely mutagén hatás következtében tartós, öröklődő mutációt szenvedtek a HPRT génjükben, így az arról átíródó HPRT enzim funkcióvesztése következett be. Fontos kiemelni, hogy ezen módszer alkalmazása során csak azok a sejtek kerülnek detektálásra, amelyek a genomjukban bekövetkező mutációk ellenére megőrizték élet- és proliferációs képességüket, ezáltal fiziológias körülmények között esetlegesen a tumorigenezis rizikóját hordozzák magukban [142].

Az UVB sugárzás mutagén hatásának kvantifikálása érdekében különböző dózisú sugárzásnak kitett CHO sejtek HPRT mutációs rátáját vizsgáltuk a fentebb leírt módszer segítségével. Eredményeink azt mutatják, hogy alacsonyabb (0-10 mJ/cm²) UVB besugárzás esetén a HPRT mutációt hordozó sejtek aránya az alkalmazott UVB dózissal párhuzamosan növekszik. Ennél magasabb (≥ 15 mJ/cm²) UVB dózis alkalmazása esetén azonban a detektálható mutációs ráta hirtelen lecsökken (**5.C ábra**), annak ellenére, hogy az UVB-indukálta CPD léziók mennyisége továbbra is egyenesen arányosan növekszik az UVB-dózis emelkedésével (**5.B ábra**). A növekvő UVB sugárzás által kiváltott toxicitási görbét az értekezés **5.A ábráján** tüntettük fel.



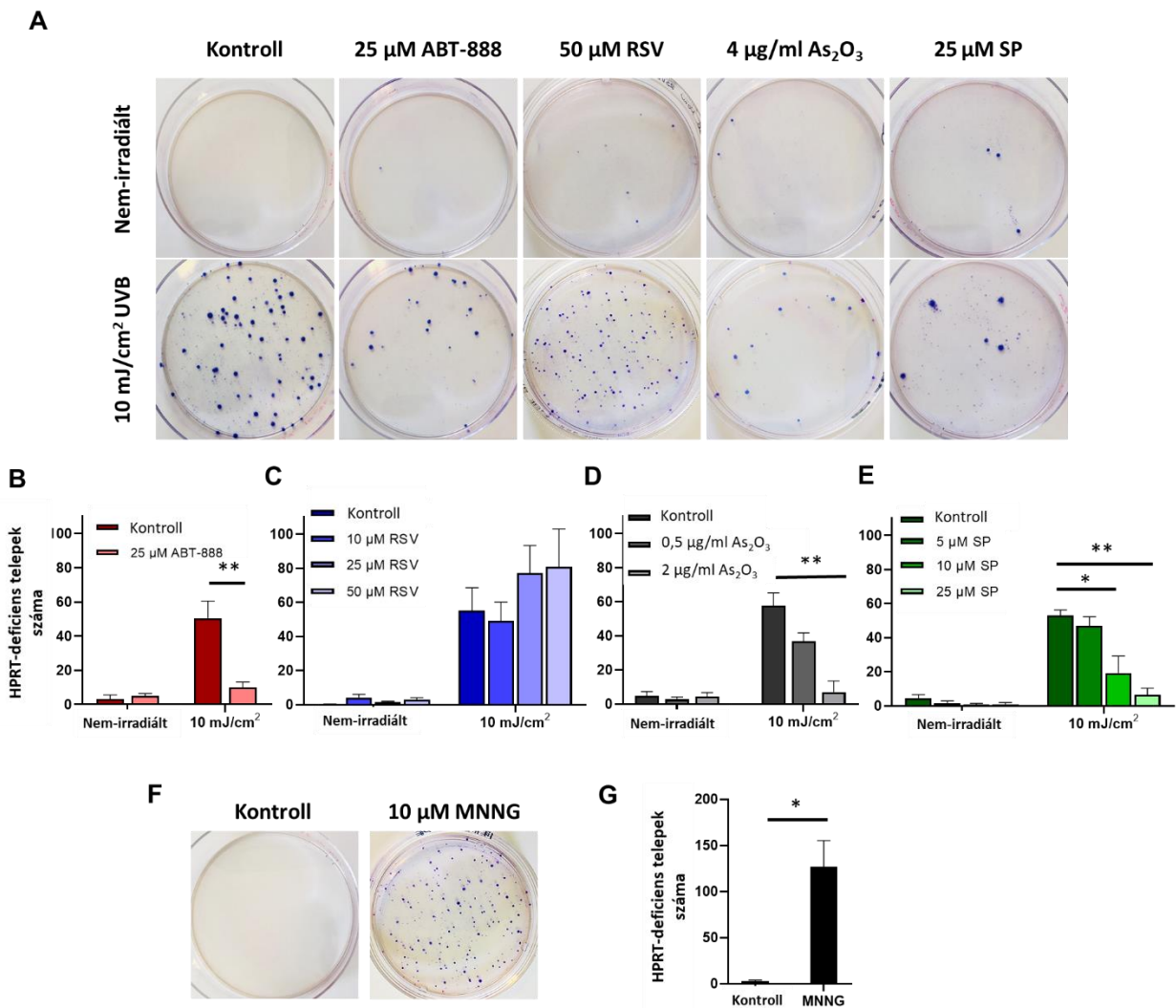
5. ábra: (A) UVB-indukálta toxicitási görbe, (B) CPD akkumuláció és (C) HPRT mutagenézis CHO sejtvonalon. A sejtek életképességét 48 óra után mértük Annexin V/PI festést követő áramlási citometriás vizsgálattal. A sejtek DNS-ében található CPD léziók mennyiségét 24 órával a besugárzást követően detektáltuk CPD-specifikus ELISA segítségével. Az ábrák $n \geq 3$ független kísérlet átlagát \pm SEM mutatják, ahol * a statisztikailag szignifikáns eredményeket jelöli ($p < 0,05$).

Ezek az eredmények valamelyest módosíthatják korábbi elképzelésünket arra vonatkozóan, hogy az UVB sugárzás erőssége és az általa indukált mutagén hatás szigorúan lineáris összefüggést mutat. Ezzel szemben arra utal, hogy az általunk használt kísérleti modellben az alacsonyabb citotoxikus hatást kiváltó UVB dózis nagyobb kockázatot jelent az UVB-indukálta mutagenezis szempontjából.

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

Az előzőekben felvázoltak alapján a korábban említett inhibitorok mutagén hatásának vizsgálatára az általunk leginkább mutagén hatásúnak ítélt, 10 mJ/cm² dózisú UVB besugárzást találtuk legmegfelelőbbnek. A kísérletekhez CHO sejtvonalat használtunk, melyeket a korábbiakkal megegyező módon kezeltünk az említett inhibitor hatású molekulákkal. Mivel a HaCaT sejtek kiemelkedően intoleránsnak bizonyultak a szelektív közegként alkalmazott 6-thioguanin iránt, az ebből adódó rendkívül alacsony kolóniaszám következtében ez a sejtvonal alkalmatlannak bizonyult a HPRT génmutációs assay elvégzésére.

Vizsgálataink során a várakozásokkal ellentétben a négy, korábbiakban repair inhibíciót kifejtő vegyület közül három (veliparib, arzén-trioxid, spironolactone) jelentős mértékben visszafogta az UVB-indukálta mutagén folyamatokat. A megfigyelt csökkenés egyes esetekben olyan mértékű volt, hogy a kezelés következtében a HPRT gén mutációs rátája csaknem a kontroll (UVB-sugárzásnak nem kitett) sejtekét közelítette (**6.A-B; D-E ábra**). A negyedik vizsgált molekula, a resveratrol nem okozott jelentős változást a sejtek HPRT mutációs szintjében (**6.C ábra**). Ezen eredmények rendkívül meglepőek voltak az ugyanezen kezelések következtében szignifikánsan megnövekvő CPD akkumuláció (**4. ábra**) tükrében. Emellett arra engednek következtetni, hogy az UVB-indukálta mutagén folyamatokat a DNS károsodás mértéke mellett egyéb, a sejt szintű UV-válasz más aspektusait érintő útvonalak is nagymértékben befolyásolják. Pozitív kontrollként 10 µM MNNG-vel (1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine) kezelt sejteket használtuk (**6.F-G ábra**).



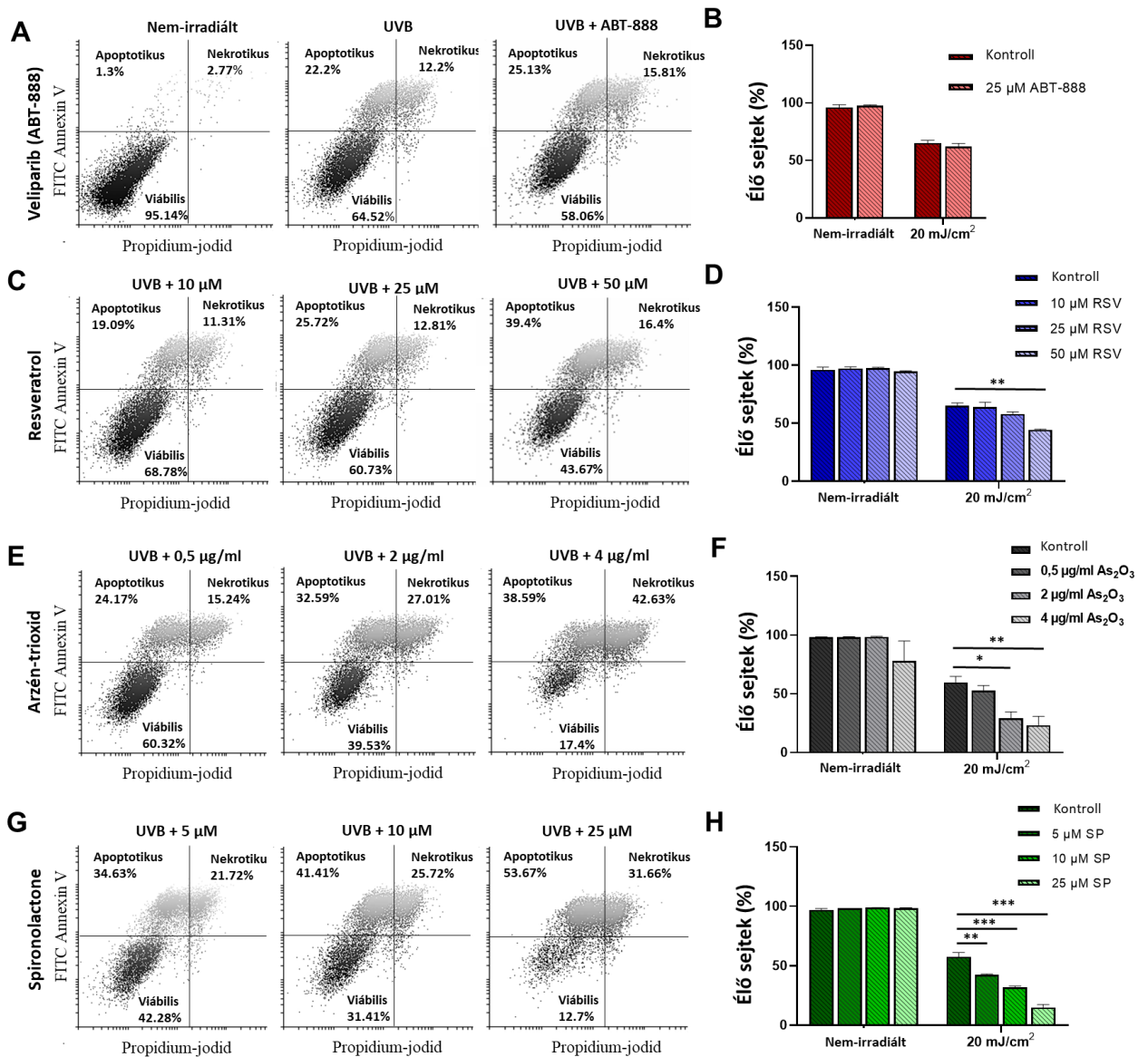
6. ábra: HPRT-mutagenesis UVB besugárzást követően. (A) A HPRT génmutációs assay-t az inhibitor kezelést és 10 mJ/cm^2 UVB besugárzást követően 7 nappal végeztük. A látható telepek száma megegyezik az 1×10^5 sejtől funkcióvesztéses HPRT mutációt hordozó sejtek számával. (B) A Veliparib (ABT-888), (C) resveratrol (RSV), (D) arzén-trioxid (As_2O_3) és (E) spironolactone (SP) kezelés hatását az UVB-indukálta mutációs rátára a diagramok szemléltetik. (F-G) Pozitív kontrollként MNNG kezeléssel átesett sejteket használtunk. Az ábrák $n \geq 3$ független kísérlet átlagát \pm SEM mutatják, ahol * és ** a statisztikailag szignifikáns eredményeket jelölik ($p < 0,05$ és $p < 0,01$).

5.1.4. A vizsgált molekulák hatása az UVB-indukálta apoptotikus sejtválaszra

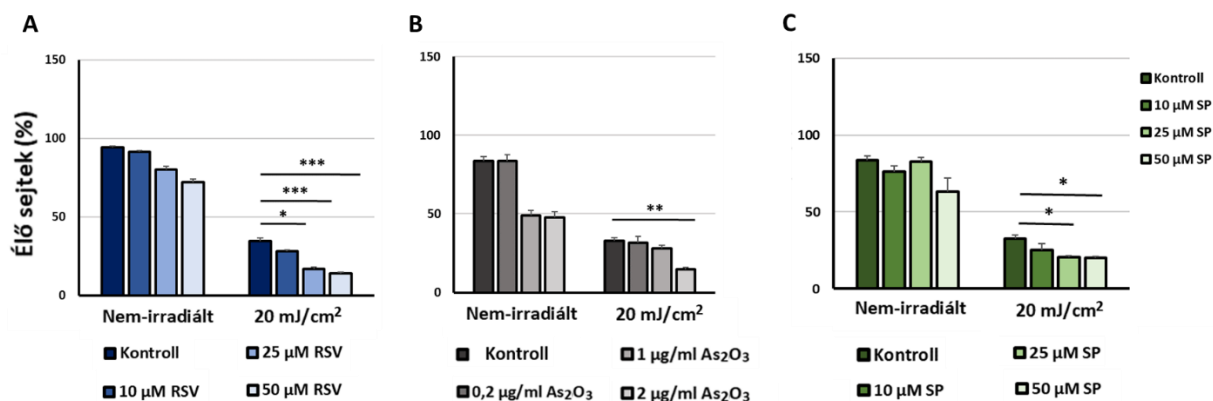
További vizsgálataink során azon folyamatok vizsgálatát tűztük ki célul, amelyek a direkt DNS károsító hatás ellenében, esetlegesen azt ellensúlyozva képesek az UVB mutagén hatásának csökkentésére. A különböző anorganikus arzén vegyületek rendkívül erős citosztatikumok [113, 116], az egyéb mutagén kezelésekkel (pl. UV sugárzással) kombinálva kifejtett ko-citotoxikus hatásuk szintén ismert [143]. A sejten belüli apoptózis indukció a

mutációt hordozó sejtek klonális expanzióját hivatott megelőzni, ezáltal védelmet nyújtva a sejteket érő genotoxikus hatásokkal szemben [122]. Ennek alapján feltételeztük, hogy az általunk használt kezelések következtében esetlegesen felerősödő fotoszenzitív reakciók részben magyarázatot adhatnak a csökkenő mutációs rátára alkalmazásukat követően.

A vizsgálatok során CHO és HaCaT sejteket kezeltünk a korábbiakkal megegyező összetételű oldatokkal, majd ezt követően 20 mJ/cm^2 UVB besugárzásnak tettük ki őket. 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. A CHO kultúrán végzett mérések során az arzén-trioxid és a spironolactone kezelés jelentősen – magasabb koncentrációk esetében akár ~40%-kal – csökkentette a túlélő sejtek arányát UVB besugárzást követően (**7.E-H ábra**), amíg a resveratrol enyhébb, megközelítőleg 20%-os visszaesést okozott a sejtek viabilitásában (**7.C-D ábra**). Ezek az adatok jól korrelálnak azokkal az eredményekkel, melyek szerint a korábbiakban az arzén-trioxid és a spironolactone kezelések az UVB-indukálta mutagenezist nagymértékben csökkentették, miközben a resveratrol nem volt hatással arra. Némiképp meglepő módon azonban a veliparib, amely korábban igen erősen befolyásolta a sejtek CPD-repair kapacitását és az UVB-indukálta mutagenezist, nem volt hatással a sejtek viabilitására (**7.A-B ábra**). HaCaT sejtek esetében hasonló változásokat tapasztaltunk a resveratrol, az arzén-trioxid és a spironolactone esetében is (**8.ábra**). Korábbi eredményeink alapján HaCaT sejteknél veliparib kezelést követően is megfigyelhető volt a sejtelhalás kisebb mértékű fokozódása [57].



7. ábra: CHO sejtek életképességének áramlási citometriás mérése. A sejteket 20 mJ/cm² UVB-irradiációt megelőzően (A-B) veliparibbal (ABT-888), (C-D) resveratrollal (RSV), (E-F) arzén-trioxiddal (As₂O₃) vagy (G-H) spironolactonnal (SP) kezeltük elő az ábrán jelölt koncentrációkban. 48 órával a besugárzást követően Annexin V/propidium-jodid (PI) kettős festést végeztünk, majd áramlási citometriás detektálás során elkülönítettük a mintákban található apoptotikus (Annexin V+/PI-), nekrotikus (annexin V+/PI+) és élő (Annexin V-/PI-) sejteket. Az oszlopok az adott mintában található élő sejtek arányát jelölik. Az ábrák n≥3 független kísérlet átlagát ± SEM mutatják, ahol *, ** és *** a statisztikailag szignifikáns eredményeket jelölik (p<0,05; p<0,01 és p<0,001).



8. ábra: HaCaT sejtek életképességének áramlási citometriás mérése. A sejteket UVB-irradiációt megelőzően (A) resveratrollal (RSV), (B) arzén-trioxid (As₂O₃) vagy (C) spironolactonnal (SP) kezeltük elő az ábrán jelölt koncentrációkban. 48 órával a besugárzást követően Annexin V/propidium-jodid (PI) kettős festést végeztünk. Az oszlopok az adott mintában található élő sejtek arányát jelölik. Az ábrák n_≥3 független kísérlet átlagát ± SEM mutatják, ahol *, ** és *** a statisztikailag szignifikáns eredményeket jelölik (p<0,05; p<0,01 és p<0,001).

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

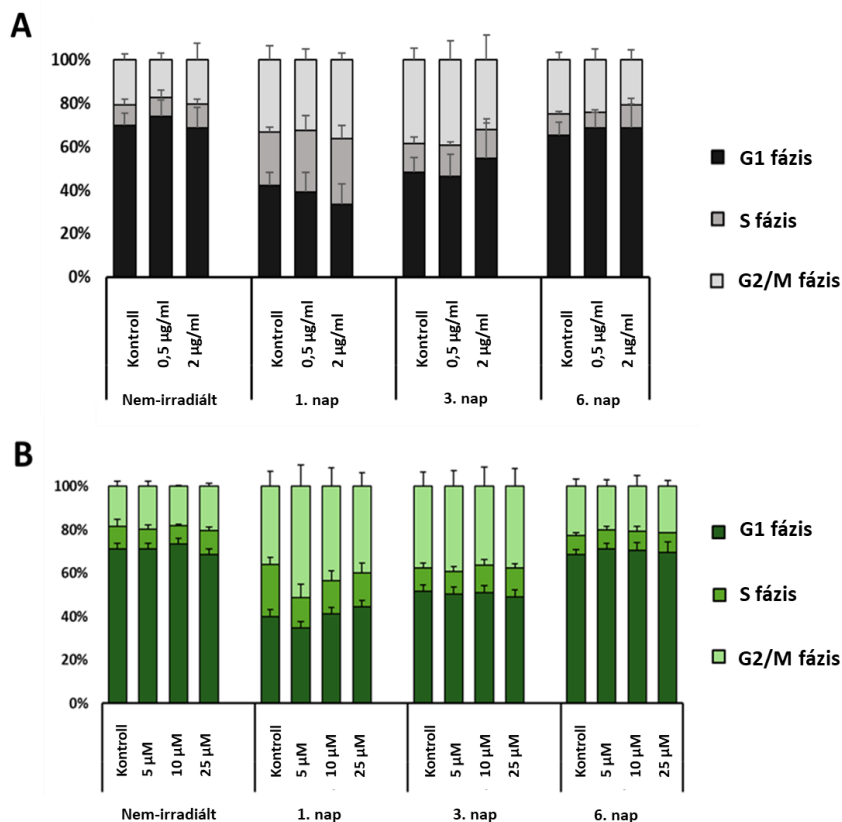
Az apoptózis indukció mellett a sejtciklus folyamatának blokkolása szintén hatékony mechanizmus egy esetleges mutagén hatás hosszú távú következményeinek enyhítésére. A folyamat során a sejtciklus továbbhaladása gátlódik azon sejtek esetében, amelyek nagyobb mennyiségű, javíthatlan DNS károsodást szenvedtek, ezáltal elkerülhető a károsodásból következő mutációk továbbörökítése a sejtosztódás során, valamint megnövelhető a sejt repair komplexei számára a léziók javítására fordítható idő [144, 145].

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatainak során már kimutatásra került, hogy a veliparib által kiváltott PARP1 inhibíció fokozhatja az UVB-indukálta sejtciklus blokkot HaCaT keratinocitákon [57]. Ebből kiindulva szeretnénk volna megvizsgálni az általunk alkalmazott többi kezelés hatását is az UVB besugárzást követő sejtciklus progresszióra, valamint megismételtük a veliparib hatásának vizsgálatát CHO sejtvonalon is. Az inhibitoros kezeléseket és az UVB expozíciót követően 1, 3 és 6 nappal a sejteken propidium-jodid festést végeztünk, majd áramlási citometriás méréssel vizsgáltuk az egyedi sejtekben található DNS mennyiséget. Ezáltal a sejtciklus különböző fázisaiban tartózkodó sejtek megkülönböztethetők, egymáshoz viszonyított arányuk meghatározható.

Egy nappal az UVB besugárzást követően minden vizsgált csoportban megnőtt G₂/M fázisban található sejtek aránya, amely megegyezik azon korábbi tanulmányok eredményeivel, melyek szerint az UVB-indukálta sejtciklus blokk főként G₂/M fázisban manifesztálódik [146].

A sejtciklus progresszió regenerálódása 3 nappal az UVB expozíció után már megfigyelhető, 6 napot követően pedig a sejtciklus különböző fázisaiban tartózkodó sejtek aránya közel megkülönböztethetetlen a kontroll (UVB sugárzásra nem átesett) sejtektől (**9-10.A ábra**).

Az arzén-trioxid és a spirinolactone kezelés nem volt hatással az UVB-indukálta sejtciklus progressziós változásokra (**9. ábra**). Amennyiben a sejteket 25 μM veliparibbal kezeltük elő, a CHO sejtek esetében is statisztikailag szignifikáns növekedést tapasztaltunk a G₂/M fázisban található sejtek számában 3 nappal az UVB expozíciót követően. Ez a különbség még 6 nappal a besugárzás után is kimutatható volt (**10.B ábra**). A resveratrol kezelés szintén kisebb mértékű növekedést váltott ki a G₂/M fázisban detektálható sejtek arányában, ez azonban csak 3 nappal az expozíciót követően volt megfigyelhető (**10.C ábra**).



9. ábra: Sejtciklus progresszió mérése UVB besugárzás követően arzén-trioxid és spirinolactone kezeléssel.

A sejteket 20 mJ/cm² UVB-irradiációt megelőzően (**A**) 0,5-2 $\mu\text{g/ml}$ arzén-trioxid oldattal vagy (**B**) 5-25 μM spirinolactonnal kezeltük. 1, 3 és 6 nappal az UVB besugárzást követően propidium-jodid (PI) festéssel vizsgáltuk az egyedi sejtek sejtciklus progresszióját. A mérések során a G₁, S, illetve G₂/M fázisos sejteket különítettük el a sejtek DNS tartalma alapján. Az ábrák $n \geq 3$ független kísérlet átlagát \pm SEM mutatják be.

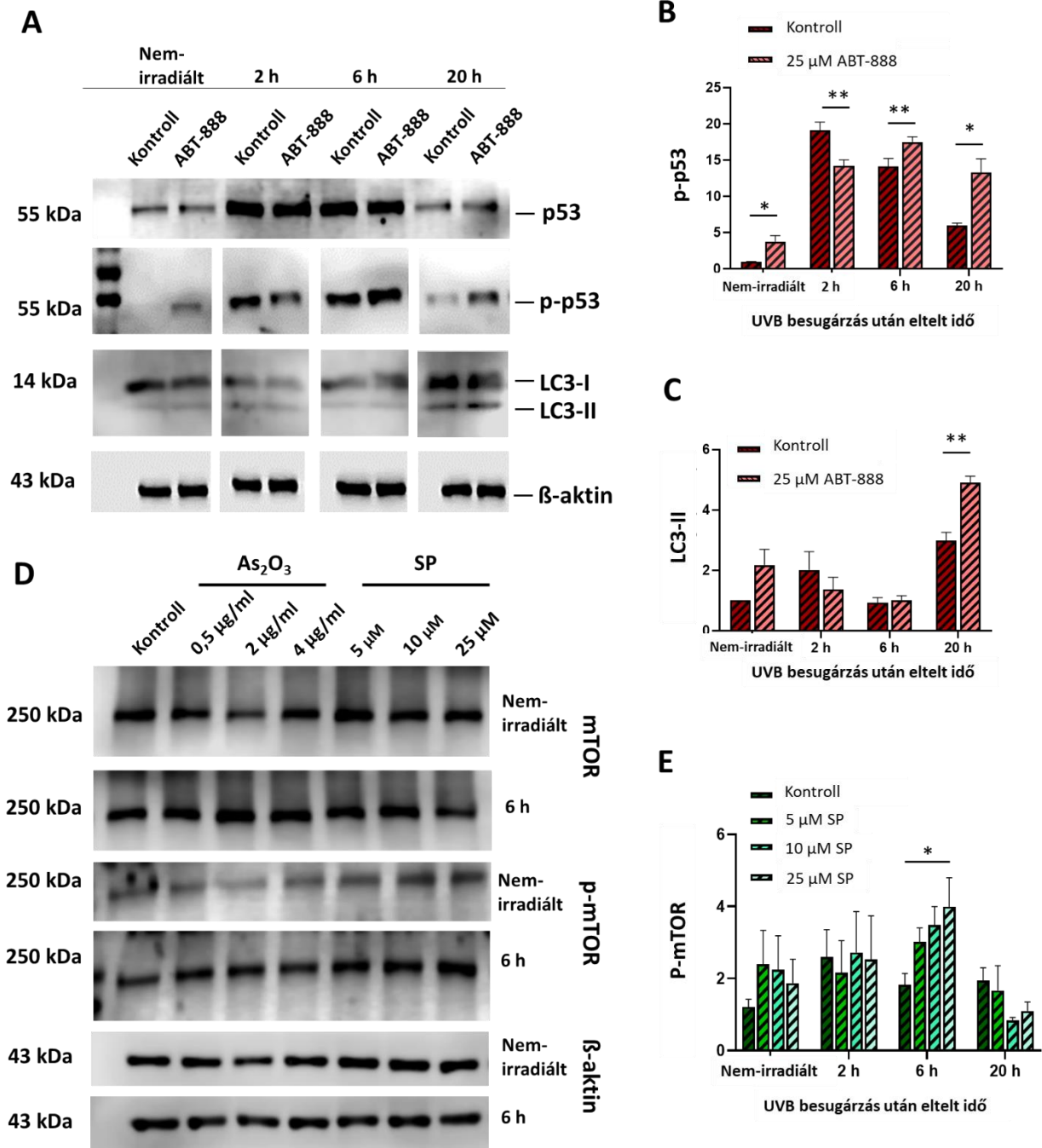
válaszban központi szerepet betöltő p53 protein foszforilációs szintjét vizsgáltuk, ami elengedhetetlen szerepet tölt be a bekövetkezett DNS károsodás felismerésében és az azt követő repair folyamatok iniciálásában [147]. Ezzel párhuzamosan méréseket végeztünk az LC3 („*phosphatidylethanolamine conjugated form of microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 protein*”) II izoformájának expressziós szintjét illetően, ami a sejten belüli autofágiás folyamatok elfogadott markerének tekinthető [148]. Ugyancsak vizsgáltuk az mTOR („mammalian target of rapamycin”) expressziós és aktivációs szintjének változását, amely a sejten belüli apoptotikus, szenescencia és autofágiás folyamatok egyik fő szabályozó molekulája. A p53-mal ellentétben, amely az apoptózis, illetve a sejtciklus blokk irányába tolja el a stressz-választ, az mTOR foszforilált formája a károsodott sejtek túlélését, illetve proliferációjának továbbhaladását segíti elő [149]. Az előbbieken leírt molekulák kifejeződését az UVB expozíciót követően 2, 6 és 20 órás időpontokban detektáltuk western blot segítségével, CHO sejtvonalon.

A mérések alapján 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 a fehérje teljes detektálható mennyiségében nem, annak foszforilációs szintjében azonban szignifikáns változásokat okozott minden vizsgált időpontban (**11.A-B ábra**). A várakozásokkal ellentétben a többi kezelés nem volt befolyással a p53 aktivációra (**12.A ábra**), ami némiképp meglepő az arzén-trioxid és a spironolactone által kiváltott nagymértékű foto-citotoxicitás fényében. Ebből kifolyólag elképzelhető, hogy az utóbbi két molekula által mediált változások valamely p53-tól független jelátviteli úton szabályozódnak.

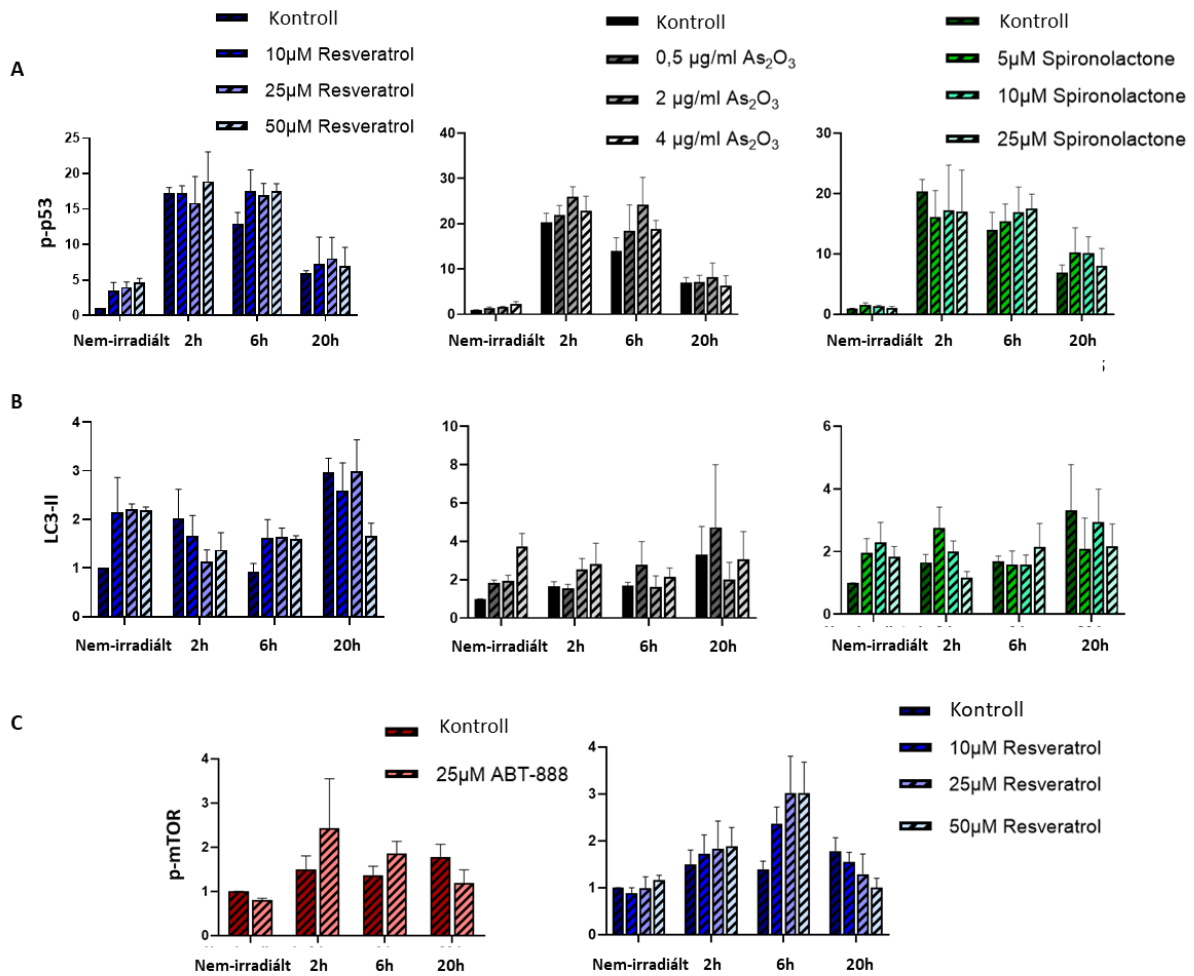
Hasonló változást figyeltünk meg az LC3-II autofágia marker vizsgálata során, ahol ugyancsak a veliparib esetében volt kimutatható szignifikáns változás a kezelés következtében. Az adatok alapján nagymértékű növekedés következett be a sejtek autofágiás folyamataiban az UVB sugárzás hatására, amely változás 20 órával az expozíció után volt leginkább kimutatható. A sejtek veliparibbal történő előkezelése tovább fokozta ennek mértékét (**11.A;C ábra**). Az általunk alkalmazott egyéb kezelések (resveratrol, arzén-trioxid, spironolactone) nem voltak hatással a sejtek LC3-II expressziós szintjére (**12.B ábra**).

Vizsgálataink során az arzén-trioxid, illetve a spironolactone kezelés hatására növekedett az mTOR foszforilációja, azonban ez a változás csak a spironolactone esetében bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. A teljes mTOR expressziós szint nem változott (**11.D-**

E ábra). A másik két vegyület (reveratrol, veliparib) nem okozott szignifikáns különbséget az mTOR foszforilációs szintjében (12.C ábra).



11. ábra: Protein expressziós és aktivációs változások UVB besugárzást követően. (A) A sejtekben detektálható teljes p53, foszfo-p53 (p-p53) és LC3-I/II szintet veliparib és UVB kezelést követően 2, 6 és 20 órával detektáltuk. Az ábrák az (B) aktivált p53 (p-p53) és (C) LC3 (LC3-II) szintet mutatják a kontroll (kezeletlen, nem-irradiált) mintákhoz képest. (D) A teljes mTOR és foszfo-mTOR (p-mTOR) szintjének változása 6 órával az UVB után arzén-trioxid és spironolactone kezelést követően. (E) Az aktivált mTOR (p-mTOR) szintjét UVB besugárzás után 2, 6 és 20 órával detektáltuk. Az adatokat a β -aktin szintjéhez normalizáltuk. Az ábrák $n \geq 3$ független kísérlet átlagát \pm SEM mutatják, ahol * és ** a statisztikailag szignifikáns eredményeket jelölik ($p < 0,05$ és $p < 0,01$).



12. ábra: Protein expressziós és aktivációs változások UVB besugárzást követően. Az ábrán (A) a p53 protein foszforilációs szintjében és (B) az LC3 fehérje aktivációjában (LC3-II forma) bekövetkező változásokat detektáltuk 20 mJ/cm² UVB besugárzást követően 2, 6 és 20 órával. A sejteket a besugárzást megelőzően resveratrol, arzén-trioxid vagy spironolactone oldattal kezeltük. (C) A sejtek mTOR foszforilációs szintjében bekövetkező változásokat szintén feltüntettük veliparib és resveratrol kezelést követően. Az adatokat minden esetben a β -aktin szintjéhez normalizáltuk. Az ábrák n \geq 3 független kísérlet átlagát \pm SEM mutatják.

Az elvégzett protein expressziós mérések alapján tehát elmondható, hogy az általunk vizsgált négy molekula egymástól rendkívül különböző módon volt hatással a sejtek génkifejeződési mintázatára csakúgy, mint az UV-indukálta apoptózisra és sejtciklus blokkra. Ennek alapján az UVB-indukálta mutációs teherre kifejtett kedvező hatásuk valószínűsíthetően nem vezethető vissza egyetlen, közös tulajdonságra.

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

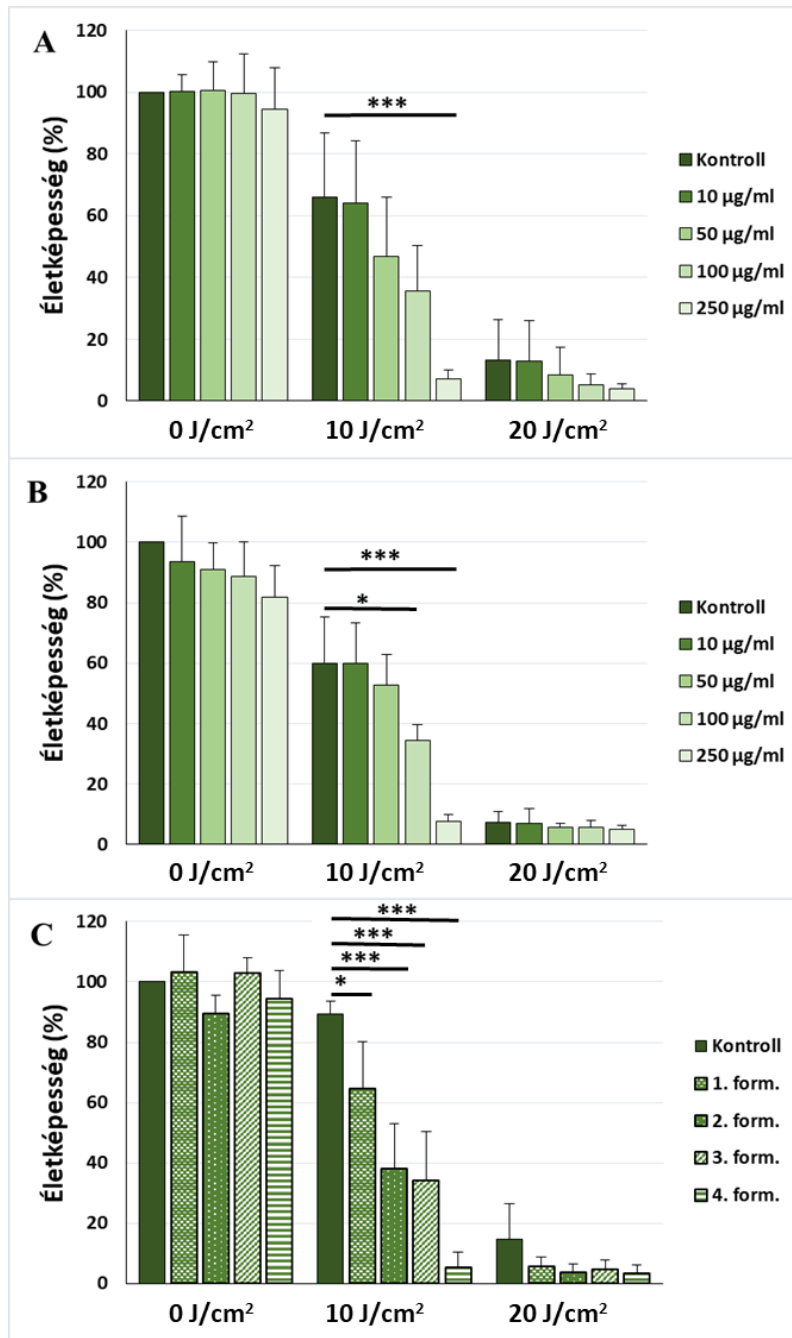
5.2.1. Különböző kompozíciójú silymarin oldatok hatásának vizsgálata az UVA-indukálta sejtelhalásra

Munkánk során különböző eredetű és összetételű, silymarin port tartalmazó oldatok hatását vizsgáltuk UVA és UVB sugárzásnak kitett HaCaT humán eredetű keratinocita sejtvonalon. A sejteket 30 percig inkubáltuk a vizsgált hatóanyagok jelenlétében, majd különböző dóziszú UVA vagy UVB sugárzásnak tettük ki. A sejtek kezeléséhez háromféle forrásból származó silymarin oldatot használtunk (részletes leírást lásd: *Anyagok és Módszerek* 4.2.2): 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 Gyógyszer technológiai Tanszékének munkatársai által formulázott, a sejtekbe történő penetrációt elősegítő összetétellel rendelkező silymarin oldatokat.

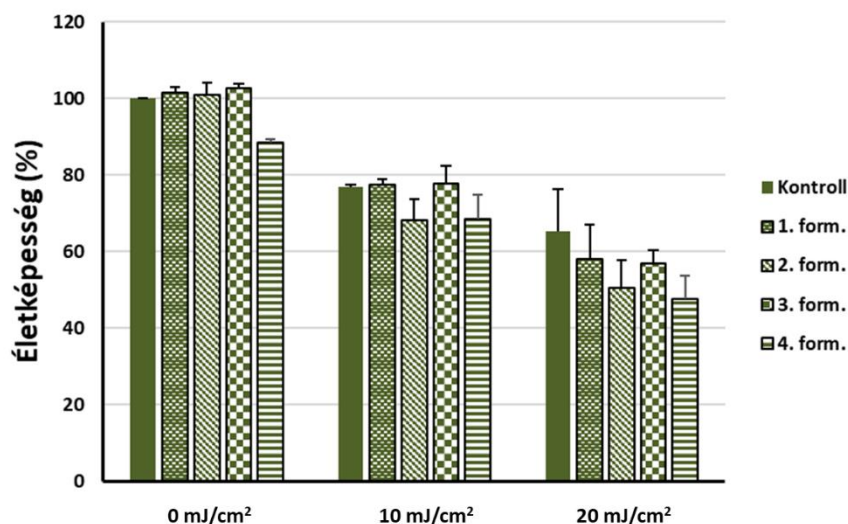
A kísérleteink első fázisában arra voltunk kíváncsiak, képesek-e az általunk használt silymarin oldatok valamilyen irányban befolyásolni a sejtek túlélését különböző dóziszú UVA/B sugárzást követően, azaz rendelkeznek-e valamilyen mértékű fényvédő vagy ellenkező esetben fototoxikus tulajdonsággal. A sejtek életképességének meghatározásához elsőként MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay-t használtunk, amely az adott mintában található élő sejtek együttes metabolikus aktivitása alapján kvantifikálja az életképes sejtek relatív mennyiségét [150]. A sejtek relatív életképességét minden esetben a besugárzást követően 24 órával vizsgáltuk.

A vizsgálatok során igen jelentős, dóziszfüggő csökkenés volt megfigyelhető a silymarin oldatokkal történő kezelést követően abban az esetben, ha a sejteket a kezelés után UVA besugárzásnak tettük ki (**13. ábra**). Az etanolban oldott, tiszta silymarin porok (Sigma; Silegon) megegyező mértékben fokozták az UVA foto-citotoxikus hatását, míg a silymarin penetrációt fokozó formulációi egymástól eltérő mértékben – valószínűsíthetően az adott oldat penetrációs hatékonyságától függően – serkentették az UVA-indukálta sejtelhalást.

Az előbbiekkal ellentétben a silymarin kezelés nem okozott szignifikáns változást a sejtek UVB besugárzást (10 és 20 mJ/cm²) követő túlélési arányában (**14. ábra**).

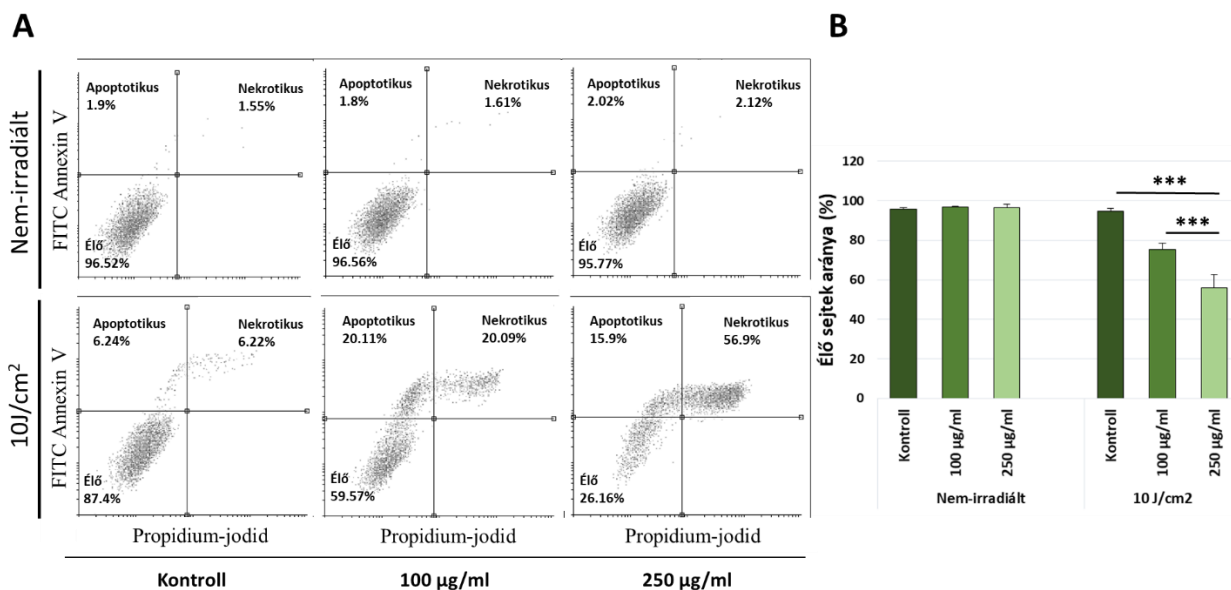


13. ábra: HaCaT sejtek életképessége silymarin kezelés és különböző dózisu UVA besugárzást követően. Az UVA irradiációt megelőzően a sejteket 30 percig előkezeltük (A) a Sigma-Aldrich által kutatási célra előállított és (B) a Silegon néven kereskedelmi formában kapható silymarin etanolos oldatával. (C) Ezen kívül méréseket végeztünk a silymarin négy különböző, sejtekbe történő penetrációt elősegítő formulációjával (1-4.form.). A sejtek életképességét a besugárzást követően 24 órával mértük MTT assay segítségével. Az ábrák n=3 független kísérlet átlagát \pm SEM mutatják, ahol * és *** a statisztikailag szignifikáns eredményeket jelölik ($p < 0,05$ és $p < 0,001$).



14. ábra: HaCaT sejtek életképessége silymarin kezelés és növekvő dózisú UVB besugárzást követően. Az UVB irradációt megelőzően a sejteket 30 percig előkezeltük négy különböző formulációjú, silymarint tartalmazó oldattal (1-4.form.). Az oldatok összetétele az egyébként gyenge vízzoldékonyságú silymarin sejtekbe történő penetrációját volt hivatott elősegíteni. A sejtek életképességét a besugárzást követően 24 órával mértük MTT assay segítségével. Az ábrákon n=3 független kísérlet átlagát ± SEM tüntettük fel.

A silymarin általunk tapasztalt fotoszenzitiváló hatását UVA besugárzást követően Annexin V/PI kettős festést követő áramlási citometriás méréssel erősítettük meg, ami az MTT assay-nél közvetlenebb információt nyújt a vizsgált sejtpopulációban bekövetkező apoptotikus folyamatokról. A mérésekhez a silymarin (Sigma) két, az előző kísérletek során leginkább fototoxikusnak talált koncentrációját (100 és 250 µg/ml) használtuk, az UVA dózis 10 J/cm² volt. A silymarin ebben az esetben is jelentős fényérzékenyítő tulajdonsággal bírt, amennyiben a választott UVA dózis által kiváltott viszonylag enyhe, megközelítőleg 10%-os sejtelhalás silymarin kezelést követően akár 40, illetve 70% fölé is ugorhatott (**15. ábra**).



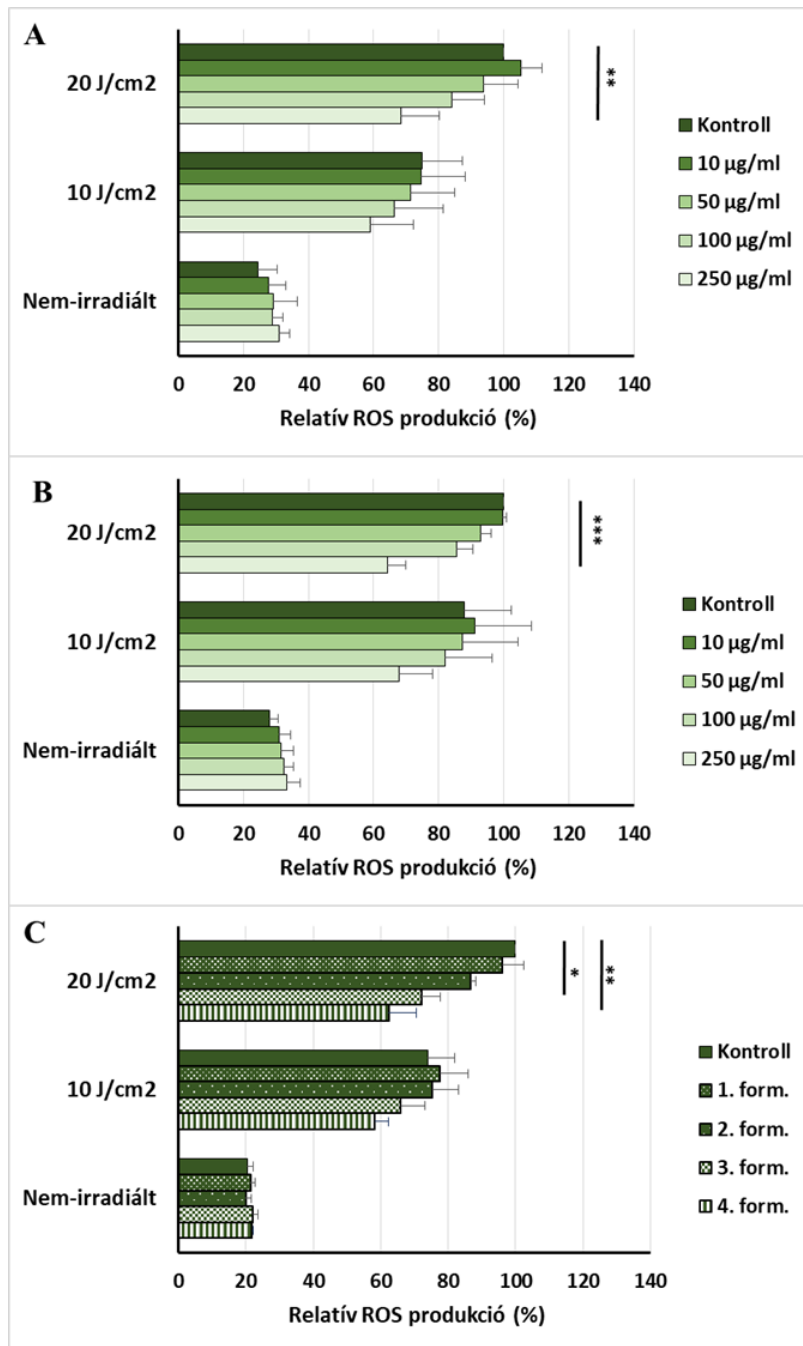
15. ábra: HaCaT sejtek életképességének áramlási citometriás mérése. A sejteket 10 J/cm² UVA-irradiációt megelőzően 100 vagy 250 µg/ml silymarin oldattal kezeltünk (Kontroll = nem kapott kémiai kezelést). (A) 24 órával a besugárzást követően Annexin V/propidium-jodid (PI) kettős festést végeztünk, majd áramlási citometriás detektálás során elkülönítettük a mintákban található apoptotikus (Annexin V+/PI-), nekrotikus (annexin V+/PI+) és élő (Annexin V-/PI-) sejteket. (B) Az oszlopok az adott mintában található élő sejtek arányát jelölik. Az ábrák n=3 független kísérlet átlagát ± SEM mutatják, *** a statisztikailag szignifikáns eredményeket jelöli (p<0,001).

5.2.2. Silymarin kezelés csökkentő hatása az UVA-indukálta reaktív oxigéngyök (ROS) termelésre

A silymarin kezelés után tapasztalt erős fototoxikus hatás UVA sugárzást követően valamelyest ellentmondást mutat azzal a ténnyel, hogy számos tanulmányban a hatóanyag jótékony hatását írták le annak kiemelkedő ROS-scavenger tulajdonságaiból adódóan [123, 124, 129, 130]. 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 [151].

Kísérleteink során a silymarin előkezelés szignifikánsan csökkentette a keratinociták ROS termelését magas dózisú (20 J/cm²) UVA besugárzást követően, amennyiben a legmagasabb alkalmazott silymarin koncentrációnál (250 µg/ml) körülbelül 30%-kal alacsonyabb volt a sejtek DHE intenzitása. A penetrációt serkentő formulációk esetében hasonló hatás volt megfigyelhető, ahol a korábbiak során leginkább fototoxikusnak bizonyult összetétel eredményezte a legnagyobb mértékű csökkenést a sejtek ROS termelésében. A

kontroll (nem-irradiált) sejtek ROS produkciójára a silymarin egyik vizsgált oldata sem volt hatással (16. ábra).

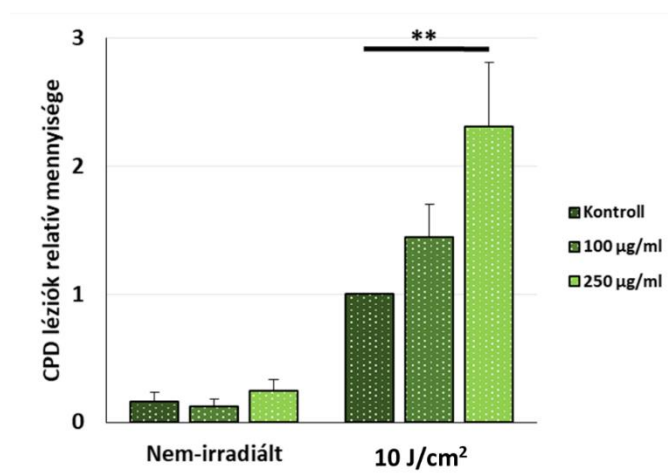


16. ábra: HaCaT sejtek relatív ROS tartalma silymarin kezelés és UVA besugárzást követően. Az UVA irradiációt megelőzően a sejteket 30 percig előkezeltük (A) a Sigma-Aldrich által kutatási célra előállított, (B) a Silegon néven kereskedelmi formában kapható silymarin etanolos oldatával, (C) valamint a silymarin négy különböző, sejtekbe történő penetrációt elősegítő formulációjával (1-4.form). A sejtekben mérhető reaktív oxigéngyökök mennyiségét közvetlenül a besugárzás után mértük DHE festést követő áramlási citometriás méréssel. Az ábrák n=5 független kísérlet átlagát ± SEM mutatják, ahol *, ** és *** a statisztikailag szignifikáns eredményeket jelölik (p<0,05; p<0,01 és p<0,001).

5.2.3. UVA-indukálta CPD akkumuláció és mutagenesis silymarin kezelést követően

Mivel az UV-indukálta ROS produkcióban bekövetkező változások nem szolgálnak magyarázattal a silymarin általunk tapasztalt, erős fotoxikus mivoltára, illetve más, fényérzékenyítő tulajdonsággal bíró anyagok esetében már kimutatták az UVA-sugárzást követően megemelkedett CPD akkumulációt [152, 153], a továbbiakban a kezelés UV-indukálta DNS károsodásra kifejtett hatásának vizsgálata mellett döntöttünk. Ennek megfelelően CPD-specifikus ELISA segítségével detektáltuk a sejtek DNS-ében kimutatható CPD léziók relatív mennyiségét 24 órával UVA besugárzást (10 J/cm^2) követően.

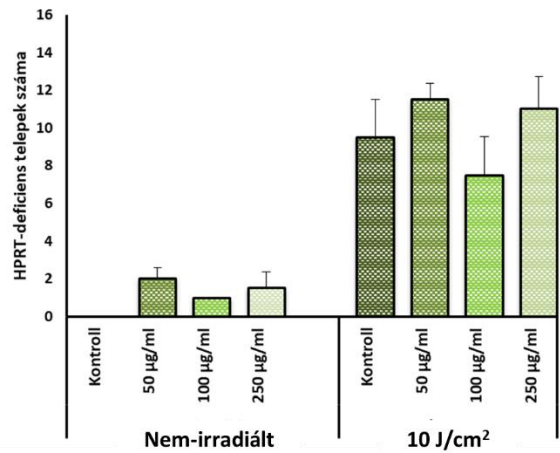
A méréseink során azt találtuk, hogy a silymarin kezelésen átesett sejtek CPD szintje szignifikánsan – egyes esetekben több mint 100%-kal – magasabb volt azokénál, amelyek csak UVA-besugárzásnak voltak kitéve egyéb kezelésekek nélkül (17. ábra). Az előbbi mérésekhez hasonlóan itt is a silymarin (Sigma) két, a korábbi kísérletek alapján leghatékonyabbnak bizonyult koncentrációját alkalmaztuk.



17. ábra: Relatív CPD mennyiség silymarin előkezelést követő UVA irradiáció után. A sejteket az ábrán jelölt koncentrációban kezeltük etanolban oldott, porított silymarin kivonattal (Sigma), majd 10 J/cm^2 UVA besugárzásnak tettük ki. A sejtek genomjában található CPD léziókat CPD-specifikus ELISA-val határoztuk meg 24 órával a besugárzást követően. Az ábrák $n=3$ független kísérlet átlagát \pm SEM mutatják.

A silymarin erős serkentő hatása az UVA-indukálta sejtjelhalásra, illetve CPD akkumulációra felvetette a lehetőségét, hogy a hatóanyag befolyással lehet az UVA-indukálta mutagén folyamatokra. Ennek felderítése érdekében HPRT génmutációs assay-t végeztünk, ahol UVA-irradiációnak kitétt, silymarinnal előkezelt CHO sejtvonalon vizsgáltuk a kezelésekek következtében megváltozott, hosszabb távú mutációs terhet. A kísérletek során a Sigma-

Aldrichtól származó silymarin por háromféle koncentrációban oldott változatát használtuk. Eredményeink alapján a silymarin a megemelkedett CPD terhelés ellenére nem befolyásolta a mutációt hordozó sejtek számát (**18. ábra**), amiben esetlegesen szerepe lehet a hatóanyag korábban tapasztalt markáns fototoxikus vagy ROS-scavenger hatásának.



18. ábra: A HPRT gén funkcióvesztéses mutációját hordozó sejtek száma 1×10^5 sejtől. A sejteket az ábrán jelölt koncentrációban kezeltük etanolban oldott, porított silymarin kivonattal, majd 10 J/cm^2 UVA besugárzásnak tettük ki. A mintákból további egy hét tenyésztés után 6-thioguanine segítségével szelektáltuk azon sejteket, amelyek nem rendelkeznek működőképes HPRT enzimmel, de megőrizték proliferációs képességüket. Az ábrák $n \geq 3$ független kísérlet átlagát \pm SEM mutatják.

6. Diskusszió

Munkánk során olyan molekulák vizsgálatát tűztük ki célul, amelyek az általunk használt sejtes rendszerben 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 a szakirodalomban elsőként kimutattuk a silymarin kezelés következtében megemelkedett CPD felhalmozódást UVA irradiáció hatására. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az általunk tanulmányozott molekulák közül három – a veliparib, a spironolactone és az arzén-trioxid – szignifikánsan mérsékelte az UVB-indukálta mutációk keletkezését. A molekulák anti-mutagén hatásában jelentős szerepe lehet az arzén-trioxid és a spironolactone kezelés erős pro-apoptotikus hatásának, amely a károsodott sejtek elhalását válthatja ki, valamint a veliparib esetében a megnövekedett időtartamú sejtciklus blokknak.

Kísérleteink alapján a NER kémiai gátlását követően az UVB-által indukált HPRT mutációt hordozó sejteknek erősen lecsökkent a túlélési és/vagy proliferációs képessége veliparib, spironolactone és arzén-trioxid kezelés következtében. Az UV-indukálta mutációk és a NER inhibíció ilyen irányú együttes hatása felveti az ún. „szintetikus letalitás” lehetőségét, amely a különböző daganatos megbetegedések terápiájának rendkívül újszerű és ígéretes megközelítését jelenti. A szintetikus letalitás elve alapján két, egymástól függetlenül funkcióképtelenné váló gén fehérjetermékének kiesése a tumoros sejt elhalásához vezet akkor is, ha az egyes gének önmagukban történő kiesése még tolerálható lenne a sejt számára. Amennyiben például a tumoros sejtben jelenlévő egyik mutáció önmagában a sejt daganatos burjánzását eredményezi, egy másik, hasonló funkciót betöltő géntermék párhuzamos kiütése az előzővel együtt már a sejt apoptózisát okozhatja [154]. A PARP1 fehérje gátlószereit jelenleg is vizsgálják BRCA1/2 mutációt hordozó tumorok terápiájában, ugyanis megfigyelések alapján a BRCA1/2 fehérje funkcióvesztése esetén a sejtek fokozottan érzékennyé válnak a PARP1 kémiai gátlására [155, 156]. Az értekezésben bemutatott eredmények szintén támogatják ezt az elképzelést, miszerint a genetikailag károsodott sejtek repair útvonalaiiban előidézett deficiencia képes lehet ezen sejtek szelektív eliminálására. Az előbbieket alapján az általunk tesztelt másik két anti-mutagén molekula – a spironolactone és az arzén-trioxid - vizsgálata szintén megfontolandó lehet a potenciálisan előidézett szintetikus letális hatás szempontjából – különös tekintettel az általánosan használt, a többi molekulához képest jelentősen 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. Ennek ellenére fontos megjegyezni, hogy több vizsgált molekula számos egyéb folyamatban is részt vesz, ami befolyással lehet a keletkezett károsodás végkimenetelére. Bár a veliparib célfehérjéje, a PARP1 jelentős szerepet játszik az UV-indukálta CPD léziók felismerésében a NER számos proteinjével (pl. XPC; DDB2; CSB) történő kölcsönhatása által [65-68], a bázis excíziós repair (BER) folyamatban történő közreműködését ugyancsak leírták [65]. Ennek alapján a gátlószer szintetikus letális hatása talán a különböző repair folyamatok komplex diszregulációjának eredményeként fogható fel. Ennek ellentétéként a spironolactone egyetlen fehérjére (XPB) hatva, annak gyors proteosomális degradációját okozva fejteti ki gátló hatását az UV-indukálta CPD repair folyamatokra, ami jóval közvetlenebb kapcsolatot feltételez a károsodott sejtek elhalása és a NER funkcióvesztése között [59, 60]. Az arzén-trioxid esetében a NER inhibitor hatás a veliparibhoz hasonlóan szintén az XPC gátlásához köthető [58, 107], azonban ez a molekula rendkívül sokrétű hatással bír a sejtek egyéb útvonalainak szabályozására is (pl. mitokondriális apoptózis indukció; ROS produkció; survivin downreguláció) [113, 114]. Így az UV-sugárzásnak kitett sejtekre gyakorolt citotoxikus hatása nagy valószínűséggel nem magyarázható kizárólagosan az XPC gátlásával.

Az általunk vizsgált negyedik molekula, a resveratrol az előzőekhez hasonlóan 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, azonban kiemelendő, hogy a resveratrol CPD indukcióra és repair folyamatokra kifejtett hatásáról meglehetősen keveset tudunk. Keuser et al. a sejtek kromatin struktúrájának szignifikáns kompaktálódását mutatta ki resveratrol kezelést követően, ami a repair fehérjék károsodott DNS-hez történő nehezebb hozzáférését, ezáltal a CPD-k és egyéb léziók akkumulációját eredményezte. Vizsgálataik szerint a resveratrol a hiszton-deacetilázok csoportjába tartozó sirtuin fehérjék aktiválása által fejtette ki ilyen irányú hatását [56].

A p53 proteint a genom védelmezőjeként („*guardian of the genome*”) is szokás említeni: ez a számos sejtszintű funkciót ellátó fehérje szabályozza a pro- és anti-apoptotikus szignálok közti egyensúlyt, a sejtciklus blokkját vagy továbbhaladását és a sejtek stresszválaszának számos egyéb aspektusát [147]. Kísérleteink során a veliparib kezelés szignifikánsan fokozta az UV-indukálta p53 foszforilációt, amely összhangban van azon tanulmányokkal, melyek szerint a PARP1 gátlók tumorelleses terápiában történő felhasználása jóval eredményesebb, amennyiben a tumoros sejtek a p53 gén funkcióvesztéses mutációját hordozzák [157, 158]. A

két fehérje együttes kiütésének ilyen irányú hatása nem meglepő annak fényében, hogy stresszválasz esetén az említett proteinek szoros, közvetlen molekuláris kölcsönhatásban állnak [159, 160]. A kísérleteink során tapasztalt, fokozott p53 aktiváció veliparib kezelést követően esetlegesen a PARP1 gátlásából adódó genomi instabilitás ellensúlyozásaként fogható fel, amely kontextusban jól értelmezhető a p53-deficiens sejtek fokozott érzékenysége a PARP1 gátlására [161, 162].

A veliparib kivételével a vizsgált inhibitorok nem befolyásolták a p53 foszforilációs szintjét UVB sugárzást követően, ami utalhat arra, hogy a resveratrol, a spironolactone és az arzén-trioxid által mediált folyamatok legalább részben p53-független útvonalon szabályzódnak. A spironolactone ezen kívül fokozta az UVB-indukálta mTOR foszforilációt. Mivel a foszforilált mTOR a károsodást követően a sejtek túlélését segíti elő [149], hipotézisünk szerint az emelkedett mTOR aktivációval a sejtek a spironolactone kezelés erős, UVB-vel kimutatható ko-citosztatikus hatását igyekeznek ellensúlyozni. A sejszintű autofágia – ami kísérleteink során veliparib kezelés hatására fokozódott – szintén a sejtek túlélését szolgálja a stresszválasz során [147]. Bár a folyamatról viszonylag kiterjedt ismeretekkel rendelkezünk, az autofágia szerepe a szövetek tumorigenezisében meglehetősen ellentmondásos: egyfelől alkalmas a károsodott sejtorganellumok eliminálásával csökkenteni a mutáció és a tumor formáció valószínűségét, ezzel egyidejűleg ellenben lehetővé teszi a „*pre-cancerous*” sejtek túlélését a metabolikus stressz és tápanyaghiány ellenére [52].

Bár az egyes NER inhibitor kezelések következtében tapasztalt nagymértékű csökkenés a sejtek mutációs rátájában első elgondolásra meglepőnek tűnhet, eredményeink rámutatnak, hogy az UVB sugárzás által indukált mutagenézis és a sejtek DNS-ében mérhető CPD akkumuláció között nem feltétlenül áll fent egyirányú kapcsolat. A sejtek repair aktivitása és a mutációt hordozó sejtek aránya közötti nem-lineáris kapcsolat egyben arra is utal, hogy egy adott kémiai ágens mutagén hatásának megítélésakor csupán a DNS-ben kimutatható léziók vagy mutációk számának meghatározása mellett egyéb faktorokat is szükséges figyelembe venni. További bizonytalanságot jelent, hogy a vizsgált molekulák *per os* alkalmazása során a hatóanyagok milyen koncentrációban jutnak el az epidermisbe, illetve milyen esetleges metabolikus módosulásokon esnek át a szervezetbe jutva.

Az előbbieken részletezett molekulákon kívül szintúgy az UV-indukálta CPD léziók fokozott felhalmozódását, valamint az apoptotikus sejtválasz serkentését figyeltük meg a növényi eredetű silymarin hatóanyag komplex alkalmazásakor. Ebben az esetben a növényi kivonat fotoszenzitiváló hatása kizárólag UVA besugárzás esetén volt kimutatható, amely a

nagymértékű CPD akkumulációval együtt rávilágít a pirimidin dimer képződés és a NER repair fontosságára az alacsonyabb energiájú, ezért sokszor kisebb figyelmet kiváltó UVA hullámhossz esetében is. A HPRT génmutációs assay eredményei pedig megerősítik azon tanulmányokat, amelyek szerint az UVB sugárzás mellett az UVA mutagén hatása ugyancsak jelentős [30, 163, 164].

A silymarin sejtszintű UV-válaszra kifejtett hatása a tudományos szakirodalomban is sok ellentmondást von maga után, amennyiben a hatóanyag UV sugárzással szembeni protektív [130, 165] és fényérzékenyítő [134, 135] hatása is leírásra került. Előbbit leggyakrabban a kivonat UV-indukálta ROS-produkcióra kifejtett jótékony hatásának tulajdonítják, amely az erős fototoxikus hatás ellenére a mi kísérletes rendszerünkben is kimutatható volt. Hipotézisünk szerint a silymarin kezelés diverz hatása összetevőinek változatosságából ered: a silymarin komplex számos különböző, változatos struktúrával rendelkező flavonolignán keveréke [166], amelyek ennél fogva rendkívül sokszínű biológiai hatással rendelkezhetnek. A hatóanyag megítélését tovább nehezíti, hogy a silymarin egyes alkotóinak (silibinin; 2,3-dehidro-silybin) fényérzékenyítő [134, 135] és ezzel párhuzamosan fotoprotektív [165, 167] hatása is leírásra került különböző tanulmányok által. A komplex végső hatása az UV-irradiált sejtek válaszára nagy valószínűséggel erősen függ a keverék egyes komponenseinek arányaitól, azok sejtmembránon történő penetrációs hatékonyságától és a vizsgálat egyéb körülményeitől. Ezt támasztják alá Dhanalakshmi et al. vizsgálatai, amelyek szerint a silymarin kezelés egyaránt csökkentheti vagy növelheti az UVB sugárzás által kiváltott apoptózis indukciót, az alkalmazott UV-dózistól függően [168].

Bár a silymarin potenciális dermatológiai felhasználását illetően a növényi kivonat leggyakrabban fényvédő komponensként kerül említésre [129, 130, 132, 138, 165, 167], az itt bemutatott erős fényérzékenyítő hatása miatt az ún. *pre-cancerosus* állapot kezelésére alkalmazott fotodinámiás terápiában (PDT) is ígéretes hatóanyag lehet. Bár a jelenleg alkalmazott fotodinámiás fényérzékenyítő szerek többségének abszorpciós maximuma a nagyobb penetrációs képességű infravörös hullámhossztartományba esik [169], az alacsony dózisú UVA-val kombinált PDT is használatos az előbbinél jóval erősebb citotoxikus hatása miatt [170, 171]. A komplex ilyen célú felhasználását megelőzően azonban elkerülhetetlenül fontos a fényérzékenyítési reakciót kiváltó körülmények pontos definiálása, ami az előző bekezdésben részletezett okok miatt máig tudományos viták tárgyát képezi. Mindemellert kérdéses, hogy a silymarin által indukált fokozott apoptotikus sejtválasz a besugárzást követően összefüggést mutat-e a sejteket érő genotoxikus hatás mértékével, azaz a kezelés fototoxikus

hatása szelektívvé tehető-e valamilyen mértékben a tumoros sejtekre az egészségesekkel szemben.

A silymarin kezelés következtében tapasztalt fokozott CPD akkumuláció és az ennek háttérében sejthető NER gátló hatás kiváltó oka egyelőre ismeretlen. Bár a szakirodalomban több hasonló tulajdonsággal rendelkező molekulát ismerünk (pl. carprofen; hydrochlorothiazide) [152, 153], ezen tanulmányok sem adnak választ a UVA sugárzás által indukált CPD formáció kémiai kezelés hatására történő emelkedésére. Mivel az előzőek során említett hatóanyagok mindegyike jelenleg is klinikai alkalmazásban van, a kutatások eredményei rávilágítanak az UVA-indukálta DNS károsodást követő repair folyamatok, illetve azok kémiai gátlásából adódó esetleges mellékhatások vizsgálatának fontosságára. A silymarin UVA-mutagenézisre kifejtett semleges hatása azonban mindenképpen felhívja rá a figyelmet, hogy a kezelést követően megemelkedett CPD szint mégsem feltétlenül jelenti a bőrrák kialakulásának fokozott kockázatát a kezelést követően. Ezzel együtt a silymarin hatóanyagainak bőrgyógyászati felhasználását a továbbiakban is számos kérdés övezi, alkalmazhatóságának megítéléséhez további vizsgálatok és alapos megfontolás szükséges.

7. Összefoglalás

Jelen értekezésben olyan molekulák vizsgálatával foglalkoztunk, amelyek képesek az UVA vagy UVB sugárzás következtében kialakuló ciklobután pirimidin dimer (CPD) fotolézisok eliminálásának gátlására, és az UV-indukálta sejtválasz valamely aspektusának módosítására. A munkánk során használt hatóanyagok mindegyike klinikai felhasználás alatt áll, így a bőr carcinogenezisre kifejtett esetleges befolyásoló 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 veliparib, a spironolactone és az arzén-trioxid az UVB-indukálta mutációs ráta szignifikáns csökkenését eredményezi az általunk használt sejtes rendszerben. Ezen eredmények háttérében esetlegesen a megfigyelt fokozott apoptotikus sejtválasz vagy a sejtciklus blokk időtartamának meghosszabbodása állhat, amelyek képesek lehetnek kompenzálni az emelkedett CPD szintből adódó genotoxikus hatást a károsodott sejtek túlélésének és proliferációjának megakadályozásával. A resveratrol a CPD repair gátlás ellenére nem befolyásolta az UVB-indukálta mutagenézist.

Vizsgálataink során bemutattuk a silymarin UVA-irradiációt követő ellenmondásos hatását: a növényi komplex egyfelől hatékony fényérzékenyítő és repair gátló szerként működött, másfelől szignifikánsan csökkentette az UVA-indukálta ROS képződést. A silymarin kezelés összességében nem befolyásolta az UVA sugárzás mutagén hatását sem pozitív, sem negatív irányban.

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

8. Summary

In this study, we investigated the effects of molecules that are able to prevent the removal of UVA- or UVB-induced CPD photolesions from the DNA and modify cellular stress-response upon UV radiation. All compounds used in our work are in clinical practice, thus their effect on skin carcinogenesis is of particular importance.

In this work, we examined the effects of veliparib, resveratrol, spironolactone and arsenic-trioxide on UVB-induced apoptosis, cell cycle arrest, autophagy, mutagenesis and protein expression. Besides, we investigated the effects of a well-known plant-derived extract, silymarin on UVA-irradiated keratinocytes.

We found that following veliparib, spironolactone and arsenic-trioxide treatment, CPD removal is impaired. Remarkably, all compounds caused significant reduction in the UVB-induced mutagenesis in our model system. The underlying alterations may result from increased apoptosis or enhanced cell cycle arrest after UVB irradiation. These changes may compensate for the genotoxic effects of elevated CPD level by reducing the proliferation of damaged cells and shifting DNA damage response towards apoptosis in response to chemical treatments. Although resveratrol also inhibited CPD repair, UVB-induced mutation level was not affected.

In our study, we demonstrated the controversial effects of silymarin treatment on UVA-irradiated cells. In one hand, the phyto-phenol complex acted as a photosensitizer and CPD-repair inhibitor molecule, on the other hand, it significantly diminished UVA-induced ROS production. Nevertheless, silymarin treatment did not affect UVA-induced mutagenesis.

In this study we have shown, that enhanced CPD formation does not necessarily associated with increased UV-induced mutagenesis. Despite their ability to inhibit DNA repair, none of the tested compounds augmented UV-induced mutation formation. Surprisingly, some of them even significantly reduced it. These data draw attention to the complex interplay between UV-induced carcinogenesis and DNA repair. In addition, it highlights the importance of other aspects of cellular stress-response beyond repair activity, which should be also taken into account when the mutagenic potential of a chemical treatment is evaluated.

9. Irodalmi jegyzék

1. de Gruijl, F.R., *Photocarcinogenesis: UVA vs UVB*. Methods Enzymol, 2000. **319**: p. 359-66.
2. Emri, G., et al., *Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: An update*. J Photochem Photobiol B, 2018. **185**: p. 169-175.
3. Wondrak, G.T., M.K. Jacobson, and E.L. Jacobson, *Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection*. Photochem Photobiol Sci, 2006. **5**(2): p. 215-37.
4. Brem, R., M. Guven, and P. Karran, *Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA*. Free Radic Biol Med, 2017. **107**: p. 101-109.
5. Day, C.P., et al., *Mouse models of UV-induced melanoma: genetics, pathology, and clinical relevance*. Lab Invest, 2017. **97**(6): p. 698-705.
6. Kimlin, M.G., *Geographic location and vitamin D synthesis*. Mol Aspects Med, 2008. **29**(6): p. 453-61.
7. Damiani, E., et al., *Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation*. J Photochem Photobiol B, 2006. **82**(3): p. 204-13.
8. Sander, C.S., et al., *Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(4): p. 618-25.
9. de Zwaan, S.E. and N.K. Haass, *Genetics of basal cell carcinoma*. Australas J Dermatol, 2010. **51**(2): p. 81-92; quiz 93-4.
10. Boukamp, P., *Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression?* Carcinogenesis, 2005. **26**(10): p. 1657-67.
11. Olsen, C.M., et al., *Trends in Melanoma Incidence Rates in Eight Susceptible Populations through 2015*. J Invest Dermatol, 2019. **139**(6): p. 1392-1395.
12. Glazer, A.M., et al., *Analysis of Trends in US Melanoma Incidence and Mortality*. JAMA Dermatol, 2017. **153**(2): p. 225-226.
13. Sacchetto, L., et al., *Trends in incidence of thick, thin and in situ melanoma in Europe*. Eur J Cancer, 2018. **92**: p. 108-118.
14. Apalla, Z., et al., *Epidemiological trends in skin cancer*. Dermatol Pract Concept, 2017. **7**(2): p. 1-6.
15. Abarca, J.F. and C.C. Casiccia, *Skin cancer and ultraviolet-B radiation under the Antarctic ozone hole: southern Chile, 1987-2000*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2002. **18**(6): p. 294-302.
16. O'Sullivan, D.E., et al., *Indoor tanning and skin cancer in Canada: A meta-analysis and attributable burden estimation*. Cancer Epidemiol, 2019. **59**: p. 1-7.
17. Calzavara-Pinton, P.G., M. Arisi, and P. Wolf, *Sunbeds and carcinogenesis: the need for new regulations and restrictions in Europe from the Euromelanoma perspective*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2019. **33 Suppl 2**: p. 104-109.
18. de Lima-Bessa, K.M., et al., *CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(2): p. 303-12.
19. Pfeifer, G.P., Y.H. You, and A. Besaratinia, *Mutations induced by ultraviolet light*. Mutat Res, 2005. **571**(1-2): p. 19-31.
20. Brash, D.E., *UV signature mutations*. Photochem Photobiol, 2015. **91**(1): p. 15-26.
21. Lo, H.-L., et al., *Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest*. BMC Cancer, 2005. **5**(1): p. 135.
22. Meador, J.A., R.B. Walter, and D.L. Mitchell, *Induction, distribution and repair of UV photodamage in the platyfish, Xiphophorus signum*. Photochem Photobiol, 2000. **72**(2): p. 260-6.
23. Wei, L., et al., *Ultra-deep sequencing differentiates patterns of skin clonogenic mutations associated with sun-exposure status*. 2020.
24. Krauthammer, M., et al., *Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma*. Nat Genet, 2012. **44**(9): p. 1006-14.
25. Brash, D.E., et al., *Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion*. J Invest Dermatol Symp Proc, 1996. **1**(2): p. 136-42.
26. Heitzer, E., et al., *UV fingerprints predominate in the PTCH mutation spectra of basal cell carcinomas independent of clinical phenotype*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(12): p. 2872-81.
27. Gailani, M.R., et al., *The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas*. Nat Genet, 1996. **14**(1): p. 78-81.

28. Pellegrini, C., et al., *Understanding the Molecular Genetics of Basal Cell Carcinoma*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(11): p. 2485.
29. Daya-Grosjean, L. and A. Sarasin, *The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2005. **571**(1): p. 43-56.
30. Douki, T., et al., *Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation*. Biochemistry, 2003. **42**(30): p. 9221-6.
31. Besaratinia, A., et al., *DNA lesions induced by UV A1 and B radiation in human cells: Comparative analyses in the overall genome and in the *p53* tumor suppressor gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(29): p. 10058.
32. Courdavault, S., et al., *Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2004. **556**(1): p. 135-142.
33. Rochette, P., et al., *UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells*. Nucleic acids research, 2003. **31**: p. 2786-94.
34. Baptista, M.S., et al., *Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways*. Photochem Photobiol, 2017. **93**(4): p. 912-919.
35. Abrahamse, H., et al., *Nanoparticles for Advanced Photodynamic Therapy of Cancer*. Photomedicine and Laser Surgery, 2017. **35**.
36. Semeraro, P., et al., *Chlorophyll a in cyclodextrin supramolecular complexes as a natural photosensitizer for photodynamic therapy (PDT) applications*. Materials Science and Engineering: C, 2018. **85**: p. 47-56.
37. Warowicka, A., et al., *Protoberberine compounds extracted from *Chelidonium majus* L. as novel natural photosensitizers for cancer therapy*. Phytomedicine, 2019. **64**: p. 152919.
38. Jung, H.S., et al., *A Mitochondria-Targeted Cryptocyanine-Based Photothermogenic Photosensitizer*. Journal of the American Chemical Society, 2017. **139**(29): p. 9972-9978.
39. Mao, D., et al., *Chemiluminescence-Guided Cancer Therapy Using a Chemically Excited Photosensitizer*. Chem, 2017. **3**(6): p. 991-1007.
40. Li, M., et al., *A lysosome-targeted BODIPY as potential NIR photosensitizer for photodynamic therapy*. Dyes and Pigments, 2017. **147**: p. 99-105.
41. Gellén, E., et al., *Immunological effects of photodynamic therapy in the treatment of actinic keratosis and squamous cell carcinoma*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2018. **24**: p. 342-348.
42. Schärer, O.D., *Nucleotide excision repair in eukaryotes*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(10): p. a012609.
43. Nakagawa, A., et al., *Three-dimensional visualization of ultraviolet-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(2): p. 143-8.
44. Nishiwaki, Y., et al., *Trichothiodystrophy Fibroblasts Are Deficient in the Repair of Ultraviolet-Induced Cyclobutane Pyrimidine Dimers and (6-4)Photoproducts*. Journal of Investigative Dermatology, 2004. **122**(2): p. 526-532.
45. Jans, J., et al., *Powerful skin cancer protection by a CPD-photolyase transgene*. Curr Biol, 2005. **15**(2): p. 105-15.
46. Reardon, J.T. and A. Sancar, *Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease*. Genes Dev, 2003. **17**(20): p. 2539-51.
47. Nospikel, T., *DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 994-1009.
48. Bergoglio, V. and T. Magnaldo, *Nucleotide excision repair and related human diseases*. Genome Dyn, 2006. **1**: p. 35-52.
49. Houtgraaf, J.H., J. Versmissen, and W.J. van der Giessen, *A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells*. Cardiovasc Revasc Med, 2006. **7**(3): p. 165-72.
50. Ablett, E., et al., *UVB-specific regulation of gene expression in human melanocytic cells: cell cycle effects and implication in the generation of melanoma*. Mutat Res, 1998. **422**(1): p. 31-41.
51. D'Errico, M., et al., *Apoptosis and efficient repair of DNA damage protect human keratinocytes against UVB*. Cell Death Differ, 2003. **10**(6): p. 754-6.
52. Lorin, S., et al., *Autophagy regulation and its role in cancer*. Semin Cancer Biol, 2013. **23**(5): p. 361-79.
53. Adimoolam, S. and J.M. Ford, *p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair*. DNA Repair, 2003. **2**(9): p. 947-954.

54. Cazzalini, O., et al., *Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2010. **704**(1): p. 12-20.
55. Salvador, J.M., J.D. Brown-Clay, and A.J. Fornace, Jr., *Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis*. Adv Exp Med Biol, 2013. **793**: p. 1-19.
56. Keuser, B., et al., *Influences of histone deacetylase inhibitors and resveratrol on DNA repair and chromatin compaction*. Mutagenesis, 2013. **28**(5): p. 569-76.
57. Hegedus, C., et al., *PARP1 Inhibition Augments UVB-Mediated Mitochondrial Changes-Implications for UV-Induced DNA Repair and Photocarcinogenesis*. 2019. **12**(1).
58. Holcomb, N., et al., *Inorganic arsenic inhibits the nucleotide excision repair pathway and reduces the expression of XPC*. DNA Repair (Amst), 2017. **52**: p. 70-80.
59. Kemp, M.G., et al., *Spironolactone Depletes the XPB Protein and Inhibits DNA Damage Responses in UVB-Irradiated Human Skin*. J Invest Dermatol, 2019. **139**(2): p. 448-454.
60. Ueda, M. and K. Matsuura, *Spironolactone-induced XPB degradation depends on CDK7 kinase and SCF(FBXL18) E3 ligase*. 2019. **24**(4): p. 284-296.
61. Carone, L., et al., *Spironolactone*. J Pain Symptom Manage, 2017. **53**(2): p. 288-292.
62. Kummar, S., et al., *A phase I study of veliparib in combination with metronomic cyclophosphamide in adults with refractory solid tumors and lymphomas*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(6): p. 1726-34.
63. Wahner Hendrickson, A.E., et al., *A Phase I Clinical Trial of the Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor Veliparib and Weekly Topotecan in Patients with Solid Tumors*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(4): p. 744-752.
64. Wagner, L.M., *Profile of veliparib and its potential in the treatment of solid tumors*. OncoTargets and therapy, 2015. **8**: p. 1931-1939.
65. Ray Chaudhuri, A. and A. Nussenzweig, *The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(10): p. 610-621.
66. Pines, A., et al., *PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1*. J Cell Biol, 2012. **199**(2): p. 235-49.
67. Robu, M., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase 1 escorts XPC to UV-induced DNA lesions during nucleotide excision repair*. 2017. **114**(33): p. E6847-e6856.
68. Thorslund, T., et al., *Cooperation of the Cockayne syndrome group B protein and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in the response to oxidative stress*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(17): p. 7625-36.
69. Swindall, A.F., J.A. Stanley, and E.S. Yang, *PARP-1: Friend or Foe of DNA Damage and Repair in Tumorigenesis?* Cancers, 2013. **5**(3): p. 943-958.
70. Li, X., et al., *High PARP-1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia and PARP-1 inhibitor and SAHA-bendamustine hybrid inhibitor combination treatment synergistically enhances anti-tumor effects*. EBioMedicine, 2018. **38**: p. 47-56.
71. Liu, Y., et al., *High PARP-1 expression is associated with tumor invasion and poor prognosis in gastric cancer*. Oncol Lett, 2016. **12**(5): p. 3825-3835.
72. Chow, J.P., et al., *PARP1 is overexpressed in nasopharyngeal carcinoma and its inhibition enhances radiotherapy*. Mol Cancer Ther, 2013. **12**(11): p. 2517-28.
73. Xu, F., et al., *Cytoplasmic PARP-1 promotes pancreatic cancer tumorigenesis and resistance*. 2019. **145**(2): p. 474-483.
74. Rojo, F., et al., *Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer*. Ann Oncol, 2012. **23**(5): p. 1156-64.
75. Mazzotta, A., et al., *Nuclear PARP1 expression and its prognostic significance in breast cancer patients*. Tumour Biol, 2016. **37**(5): p. 6143-53.
76. Martin-Oliva, D., et al., *Crosstalk between PARP-1 and NF-kappaB modulates the promotion of skin neoplasia*. Oncogene, 2004. **23**(31): p. 5275-83.
77. Lowery, M.A., et al., *Phase II trial of veliparib in patients with previously treated BRCA-mutated pancreas ductal adenocarcinoma*. Eur J Cancer, 2018. **89**: p. 19-26.
78. Ramalingam, S.S., et al., *Randomized, Placebo-Controlled, Phase II Study of Veliparib in Combination with Carboplatin and Paclitaxel for Advanced/Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(8): p. 1937-1944.
79. Fogelman, D.R., et al., *Evidence for the efficacy of Iniparib, a PARP-1 inhibitor, in BRCA2-associated pancreatic cancer*. Anticancer Res, 2011. **31**(4): p. 1417-20.
80. Marchetti, C., et al., *Olaparib, PARP1 inhibitor in ovarian cancer*. Expert Opin Investig Drugs, 2012. **21**(10): p. 1575-84.
81. Wang, L., et al., *Pharmacologic characterization of fluzoparib, a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor undergoing clinical trials*. 2019. **110**(3): p. 1064-1075.

82. *Lynparza approved in the EU as 1st-line maintenance treatment with bevacizumab for HRD-positive advanced ovarian cancer.* 2020 [cited 2021 13 January]; Available from: <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2020/lynparza-approved-in-the-eu-for-wider-ovarian-use.html>.
83. Sirerol, J.A., et al., *Topical treatment with pterostilbene, a natural phytoalexin, effectively protects hairless mice against UVB radiation-induced skin damage and carcinogenesis.* *Free Radic Biol Med*, 2015. **85**: p. 1-11.
84. Fujimura, A.T., et al., *Resveratrol-Loaded Liquid-Crystalline System Inhibits UVB-Induced Skin Inflammation and Oxidative Stress in Mice.* *J Nat Prod*, 2016. **79**(5): p. 1329-38.
85. Adhami, V.M., F. Afaq, and N. Ahmad, *Suppression of ultraviolet B exposure-mediated activation of NF-kappaB in normal human keratinocytes by resveratrol.* *Neoplasia*, 2003. **5**(1): p. 74-82.
86. Subedi, L., et al., *Resveratrol-Enriched Rice Attenuates UVB-ROS-Induced Skin Aging via Downregulation of Inflammatory Cascades.* 2017. **2017**: p. 8379539.
87. Afaq, F., V.M. Adhami, and N. Ahmad, *Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice.* *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003. **186**(1): p. 28-37.
88. Vitale, N., et al., *Resveratrol couples apoptosis with autophagy in UVB-irradiated HaCaT cells.* *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e80728.
89. Aziz, M.H., F. Afaq, and N. Ahmad, *Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin.* *Photochem Photobiol*, 2005. **81**(1): p. 25-31.
90. Back, J.H., et al., *Resveratrol-mediated downregulation of Rictor attenuates autophagic process and suppresses UV-induced skin carcinogenesis.* *Photochem Photobiol*, 2012. **88**(5): p. 1165-72.
91. Roy, P., et al., *Resveratrol enhances ultraviolet B-induced cell death through nuclear factor-kappaB pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **384**(2): p. 215-20.
92. Pastore, S., et al., *Resveratrol enhances solar UV-induced responses in normal human epidermal keratinocytes.* *Photochem Photobiol*, 2012. **88**(6): p. 1522-30.
93. Seve, M., et al., *Resveratrol enhances UVA-induced DNA damage in HaCaT human keratinocytes.* *Med Chem*, 2005. **1**(6): p. 629-33.
94. Struthers, A., H. Krum, and G.H. Williams, *A comparison of the aldosterone-blocking agents eplerenone and spironolactone.* *Clin Cardiol*, 2008. **31**(4): p. 153-8.
95. Lainscak, M., et al., *Safety profile of mineralocorticoid receptor antagonists: Spironolactone and eplerenone.* *Int J Cardiol*, 2015. **200**: p. 25-9.
96. Kim, G.K. and J.Q. Del Rosso, *Oral Spironolactone in Post-teenage Female Patients with Acne Vulgaris: Practical Considerations for the Clinician Based on Current Data and Clinical Experience.* *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 2012. **5**(3): p. 37-50.
97. Alekseev, S., et al., *A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIIH and the chemosensitization of tumor cells to platinum.* *Chem Biol*, 2014. **21**(3): p. 398-407.
98. Charny, J.W., J.K. Choi, and W.D. James, *Spironolactone for the treatment of acne in women, a retrospective study of 110 patients.* *Int J Womens Dermatol*, 2017. **3**(2): p. 111-115.
99. Dufner, K.S., L.A. Buss, and J. Kizito, *Drug-Induced Photosensitivity.* *Hospital Pharmacy*, 2006. **41**(2): p. 196-206.
100. Schuhmacher-Wolz, U., et al., *Oral exposure to inorganic arsenic: evaluation of its carcinogenic and non-carcinogenic effects.* *Crit Rev Toxicol*, 2009. **39**(4): p. 271-98.
101. Bhattacharjee, P., M. Banerjee, and A.K. Giri, *Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review.* *Environ Int*, 2013. **53**: p. 29-40.
102. Okui, T. and Y. Fujiwara, *Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells.* *Mutat Res*, 1986. **172**(1): p. 69-76.
103. Rossman, T.G., et al., *Arsenite is a cocarcinogen with solar ultraviolet radiation for mouse skin: an animal model for arsenic carcinogenesis.* *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001. **176**(1): p. 64-71.
104. Burns, F.J., et al., *Arsenic-induced enhancement of ultraviolet radiation carcinogenesis in mouse skin: a dose-response study.* *Environ Health Perspect*, 2004. **112**(5): p. 599-603.
105. Yamanaka, K., et al., *The role of orally administered dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, in the promotion and progression of UVB-induced skin tumorigenesis in hairless mice.* *Cancer Lett*, 2000. **152**(1): p. 79-85.
106. Applebaum, K.M., et al., *Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, arsenic exposure, and non-melanoma skin cancer in New Hampshire.* *Environ Health Perspect*, 2007. **115**(8): p. 1231-6.

107. Nollen, M., et al., *Impact of arsenic on nucleotide excision repair: XPC function, protein level, and gene expression*. Mol Nutr Food Res, 2009. **53**(5): p. 572-82.
108. Soignet, S.L., et al., *Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide*. N Engl J Med, 1998. **339**(19): p. 1341-8.
109. Soignet, S.L., et al., *United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia*. J Clin Oncol, 2001. **19**(18): p. 3852-60.
110. Gill, H., et al., *Long-term outcome of relapsed acute promyelocytic leukemia treated with oral arsenic trioxide-based reinduction and maintenance regimens: A 15-year prospective study*. 2018. **124**(11): p. 2316-2326.
111. Cicconi, L., et al., *Molecular remission as a therapeutic objective in acute promyelocytic leukemia*. Leukemia, 2018. **32**(8): p. 1671-1678.
112. Ravandi, F., et al., *Effective treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid, arsenic trioxide, and gemtuzumab ozogamicin*. J Clin Oncol, 2009. **27**(4): p. 504-10.
113. Kumar, S., C.G. Yedjou, and P.B. Tchounwou, *Arsenic trioxide induces oxidative stress, DNA damage, and mitochondrial pathway of apoptosis in human leukemia (HL-60) cells*. J Exp Clin Cancer Res, 2014. **33**: p. 42.
114. Chiu, H.W., Y.S. Ho, and Y.J. Wang, *Arsenic trioxide induces autophagy and apoptosis in human glioma cells in vitro and in vivo through downregulation of survivin*. J Mol Med (Berl), 2011. **89**(9): p. 927-41.
115. Wang, D.H., et al., *Arsenic trioxide overcomes apoptosis inhibition in K562/ADM cells by regulating vital components in apoptotic pathway*. Pharmacol Res, 2005. **52**(5): p. 376-85.
116. Qian, W., et al., *Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1*. Leuk Res, 2007. **31**(3): p. 329-39.
117. Deaglio, S., et al., *Evidence of an immunologic mechanism behind the therapeutical effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on myeloma cells*. Leuk Res, 2001. **25**(3): p. 227-35.
118. Thomas-Schoemann, A., et al., *Arsenic trioxide exerts antitumor activity through regulatory T cell depletion mediated by oxidative stress in a murine model of colon cancer*. J Immunol, 2012. **189**(11): p. 5171-7.
119. Mulero, M., et al., *Polypodium leucotomos extract inhibits glutathione oxidation and prevents Langerhans cell depletion induced by UVB/UVA radiation in a hairless rat model*. Exp Dermatol, 2008. **17**(8): p. 653-8.
120. Avadhani, K.S., et al., *Skin delivery of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and hyaluronic acid loaded nano-transfersomes for antioxidant and anti-aging effects in UV radiation induced skin damage*. Drug Delivery, 2017. **24**(1): p. 61-74.
121. Yan, M., et al., *Luteolin decreases the UVA-induced autophagy of human skin fibroblasts by scavenging ROS*. Mol Med Rep, 2016. **14**(3): p. 1986-92.
122. Zhang, W., et al., *UVB-induced apoptosis drives clonal expansion during skin tumor development*. Carcinogenesis, 2005. **26**(1): p. 249-257.
123. Saliou, C., et al., *Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line*. Free Radic Biol Med, 1999. **26**(1-2): p. 174-83.
124. Deep, G. and R. Agarwal, *Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer*. Integr Cancer Ther, 2007. **6**(2): p. 130-45.
125. Gupta, O.P., et al., *Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of silymarin acting through inhibition of 5-lipoxygenase*. Phytomedicine, 2000. **7**(1): p. 21-4.
126. Jia, J.-D., et al., *Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen α 1(I) and TIMP-1*. Journal of Hepatology, 2001. **35**(3): p. 392-398.
127. Vaid, M., et al., *Silymarin inhibits ultraviolet radiation-induced immune suppression through DNA repair-dependent activation of dendritic cells and stimulation of effector T cells*. Biochem Pharmacol, 2013. **85**(8): p. 1066-76.
128. Vargas-Mendoza, N., et al., *Hepatoprotective effect of silymarin*. World journal of hepatology, 2014. **6**(3): p. 144-149.
129. Svobodová, A., et al., *Flavonolignans from Silybum marianum moderate UVA-induced oxidative damage to HaCaT keratinocytes*. J Dermatol Sci, 2007. **48**(3): p. 213-24.
130. Katiyar, S.K., et al., *Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(8): p. 556-66.
131. Vostálová, J., E. Tinková, and D. Biedermann, *Skin Protective Activity of Silymarin and its Flavonolignans*. 2019. **24**(6).

132. Marchiori, M.C.L., et al., *Hydrogel containing silibinin-loaded pomegranate oil based nanocapsules exhibits anti-inflammatory effects on skin damage UVB radiation-induced in mice*. J Photochem Photobiol B, 2017. **170**: p. 25-32.
133. Rigby, C.M., et al., *Role of p53 in silibinin-mediated inhibition of ultraviolet B radiation-induced DNA damage, inflammation and skin carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2017. **38**(1): p. 40-50.
134. Narayanapillai, S., et al., *Silibinin is a potent sensitizer of UVA radiation-induced oxidative stress and apoptosis in human keratinocyte HaCaT cells*. Photochem Photobiol, 2012. **88**(5): p. 1135-40.
135. Rajnochová Svobodová, A., et al., *Phototoxic potential of silymarin and its bioactive components*. J Photochem Photobiol B, 2016. **156**: p. 61-8.
136. Martin, R.J., et al., *Factors influencing silymarin content and composition in variegated thistle (Silybum marianum)*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2006. **34**(3): p. 239-245.
137. Chambers, C.S., et al., *The silymarin composition... and why does it matter???* Food Research International, 2017. **100**: p. 339-353.
138. Fehér, P., et al., *Efficacy of Pre- and Post-Treatment by Topical Formulations Containing Dissolved and Suspended Silybum marianum against UVB-Induced Oxidative Stress in Guinea Pig and on HaCaT Keratinocytes*. Molecules, 2016. **21**(10).
139. *Process for isolation of hepatoprotective agent silymarin from the seeds of the plant Silybum marianum*. 2001 [cited 2021 January 13]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US-6309678-B1>.
140. Kuki, Á., et al., *Identification of Silymarin Constituents: An Improved HPLC-MS Method*. Chromatographia, 2011. **75**.
141. Boros, G., et al., *Transfection of pseudouridine-modified mRNA encoding CPD-photolyase leads to repair of DNA damage in human keratinocytes: a new approach with future therapeutic potential*. J Photochem Photobiol B, 2013. **129**: p. 93-9.
142. Johnson, G.E., *Mammalian cell HPRT gene mutation assay: test methods*. Methods Mol Biol, 2012. **817**: p. 55-67.
143. Lee, C.H., et al., *Effects and interactions of low doses of arsenic and UVB on keratinocyte apoptosis*. Chem Res Toxicol, 2004. **17**(9): p. 1199-205.
144. Eastman, A., *Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies*. J Cell Biochem, 2004. **91**(2): p. 223-31.
145. Paulovich, A.G., D.P. Toczyski, and L.H. Hartwell, *When Checkpoints Fail*. Cell, 1997. **88**(3): p. 315-321.
146. Pavey, S., T. Russell, and B. Gabrielli, *G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation*. Oncogene, 2001. **20**(43): p. 6103-6110.
147. Ryan, K.M., *p53 and autophagy in cancer: Guardian of the genome meets guardian of the proteome*. European Journal of Cancer, 2011. **47**(1): p. 44-50.
148. Tanida, I., T. Ueno, and E. Kominami, *LC3 and Autophagy*. Methods Mol Biol, 2008. **445**: p. 77-88.
149. Strozyk, E. and D. Kulms, *The role of AKT/mTOR pathway in stress response to UV-irradiation: implication in skin carcinogenesis by regulation of apoptosis, autophagy and senescence*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(8): p. 15260-15285.
150. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
151. Wang, Q. and M.-H. Zou, *Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS) and Mitochondrial ROS in AMPK Knockout Mice Blood Vessels*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2018. **1732**: p. 507-517.
152. Kunisada, M., et al., *Hydrochlorothiazide enhances UVA-induced DNA damage*. Photochem Photobiol, 2013. **89**(3): p. 649-54.
153. Robinson, K.S., et al., *Cyclobutane pyrimidine dimers are photosensitized by carprofen plus UVA in human HaCaT cells*. Toxicol In Vitro, 2010. **24**(4): p. 1126-32.
154. Li, S., et al., *Development of synthetic lethality in cancer: molecular and cellular classification*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020. **5**(1): p. 241.
155. Helleday, T., *The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: Clearing up the misunderstandings*. Molecular Oncology, 2011. **5**(4): p. 387-393.
156. Lord, C.J., A.N.J. Tutt, and A. Ashworth, *Synthetic Lethality and Cancer Therapy: Lessons Learned from the Development of PARP Inhibitors*. Annual Review of Medicine, 2015. **66**(1): p. 455-470.
157. Liu, Q., et al., *PARP-1 inhibition with or without ionizing radiation confers reactive oxygen species-mediated cytotoxicity preferentially to cancer cells with mutant TP53*. Oncogene, 2018. **37**(21): p. 2793-2805.

158. Vance, S., et al., *Selective radiosensitization of p53 mutant pancreatic cancer cells by combined inhibition of Chk1 and PARP1*. Cell Cycle, 2011. **10**(24): p. 4321-4329.
159. Kanai, M., et al., *Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosylation)*. Nature Cell Biology, 2007. **9**(10): p. 1175-1183.
160. Wesierska-Gadek, J., J. Wojciechowski, and G. Schmid, *Central and carboxy-terminal regions of human p53 protein are essential for interaction and complex formation with PARP-1*. J Cell Biochem, 2003. **89**(2): p. 220-32.
161. Valenzuela, M.T., et al., *PARP-1 modifies the effectiveness of p53-mediated DNA damage response*. Oncogene, 2002. **21**(7): p. 1108-1116.
162. Kubota, E., et al., *Low ATM protein expression and depletion of p53 correlates with olaparib sensitivity in gastric cancer cell lines*. Cell Cycle, 2014. **13**(13): p. 2129-2137.
163. Kappes, U.P., et al., *Short- and Long-Wave UV Light (UVB and UVA) Induce Similar Mutations in Human Skin Cells*. Journal of Investigative Dermatology, 2006. **126**(3): p. 667-675.
164. Ikehata, H., *Mechanistic considerations on the wavelength-dependent variations of UVR genotoxicity and mutagenesis in skin: the discrimination of UVA-signature from UV-signature mutation*. Photochem Photobiol Sci, 2018. **17**(12): p. 1861-1871.
165. Rajnochová Svobodová, A., et al., *UVA-photoprotective potential of silymarin and silybin*. Archives of Dermatological Research, 2018. **310**(5): p. 413-424.
166. Kvasnička, F., et al., *Analysis of the active components of silymarin*. Journal of Chromatography A, 2003. **990**(1): p. 239-245.
167. Vostálová, J., et al., *Skin Protective Activity of Silymarin and its Flavonolignans*. Molecules, 2019. **24**(6): p. 1022.
168. Dhanalakshmi, S., et al., *Dual efficacy of silibinin in protecting or enhancing ultraviolet B radiation-caused apoptosis in HaCaT human immortalized keratinocytes*. Carcinogenesis, 2004. **25**(1): p. 99-106.
169. Deng, K., et al., *Recent Progress in Near Infrared Light Triggered Photodynamic Therapy*. 2017. **13**(44).
170. Chen, J., et al., *Effects of low-dose ALA-PDT on fibroblast photoaging induced by UVA irradiation and the underlying mechanisms*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2019. **27**: p. 79-84.
171. Buchczyk, D.P., et al., *High efficiency of 5-aminolevulinate-photodynamic treatment using UVA irradiation*. Carcinogenesis, 2001. **22**(6): p. 879-883.

10. Tárgyszavak

UV sugárzás, nukleotid excíziós repair, veliparib, resveratrol, arzén-trioxid, spironolactone, silymarin, ciklobután-pirimidin dimer, mutagenesis

11. Keywords

UV radiation, nucleotide excision repair, veliprib, resveratrol, arsenic trioxide, spironolactone, silymarin, cyclobutane pyrimidine dimer, mutagenesis

12. Köszönetnyilvánítás

Ezúton 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. A PhD tanulmányaim során megszerzett tudás és kutatói gondolkodásmód jelenleg és reményeim szerint a jövőben is hozzájárul majd a laboratóriumi kutatás bármely területén folytatott munkám eredményességéhez.

Hasonló köszönettel tartozom a DE-ÁOK Bőrgyógyászati Klinikán működő valamennyi kutatócsoport minden tagjának – az általuk biztosított szakmai segítség és támogató közösség az itt bemutatott munka nélkülözhetetlen eleme volt. Munkatársaim közül külön szeretném kiemelni Hegedűs Csabát és Dr. Janka Esztert, akiknek mind széleskörű 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, amely nélkül a kutatás nem valósulhatott volna meg. 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. Szintén köszönet illeti Dr. Gellén Emesét, Kertész Józsefnét és Csapóné Sandra Ildikót, akik lehetővé tették számomra a szövettani minták feldolgozásában és tanulmányozásában való jártasság elsajátítását.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak az elmúlt években nyújtott támogatásukért és biztatásukért, ami nemkülönben pótolhatatlan része volt tanulmányaim sikerességének.

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.

13. Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/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., Tánczos, 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.



Poszterek és prezentációk

Fidrus Eszter, Hegedűs Csaba, Janka Eszter Anna, Paragh György, Emri Gabriella, Remenyik Éva. *A kémiai indukált repair gátlás csökkenti az UVB-indukálta mutagenézist - in vitro vizsgálat.* **A Magyar Dermatológiai Társulat 93. Nagygyűlése, 2020**; november 26-28; Online rendezvény (szóbeli előadás)

Fidrus Eszter, Hegedűs Csaba, Janka Eszter Anna, Emri Gabriella, Remenyik Éva. *Investigation of UV mutagenesis and repair inhibition in vitro.* **A Magyar Dermatológiai Társulat 92. Nagygyűlése, 2019**; november 28-30; Debrecen (szóbeli előadás)

Fidrus Eszter, Boros Gábor, Hegedűs Csaba, Janka Eszter Anna, Emri Gabriella, Karikó Katalin, Remenyik Éva. *Time-dependence of UVB induced cellular mechanisms in cultured human keratinocytes.* **49th ESDR (European Society for Dermatological Research) Annual Meeting, 2019**; 18-21 September; Bordeaux, France. (poszter)

Fidrus Eszter, Fehér Pálma, Hegedűs Csaba, Janka Eszter Anna, Paragh György, Bácskay Ildikó, Remenyik Éva. *Enhanced UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimer formation by silymarin without increased mutagenesis in cultured epithelial cells.* **49th ESDR (European Society for Dermatological Research) Annual Meeting, 2019**; 18-21 September; Bordeaux, France. (poszter)

Fidrus Eszter, Boros Gábor, Hegedűs Csaba, Janka Eszter Anna, Emri Gabriella, Karikó Katalin, Remenyik Éva. *Time-dependence investigation of UVB-induced, CPD-dependent cellular mechanisms in in vitro human keratinocytes.* **A Magyar Dermatológiai Társulat 91. Nagygyűlése, 2018**; november 29 – december 01; Budapest (szóbeli előadás)

Gellén Emese, Kollár Sándor, Péter Margit, Fidrus Eszter, Janka Eszter Anna, Emri Gabriella, Remenyik Éva. *Aktinikus keratosis immun infiltrátumának vizsgálata photodynamiás terápia előtt és után.* **A Magyar Dermatológiai Társulat 90. Nagygyűlése, 2017**; november 23-25; Budapest (szóbeli előadás)

Gellén Emese, Fidrus Eszter, Janka Eszter Anna, Barta Barbara, Emri Gabriella, Remenyik Éva. *Efficacy and photorejuvenation effect of conventional photodynamic therapy (PDT) and Er:YAG (erbium:yttrium-aluminium-garnet) ablative fractional laser – assisted PDT in multiple actinic keratosis.* **47th ESDR (European Society for Dermatological Research) Annual Meeting, 2017**; 27-30 September; Salzburg, Austria (poszter)