

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**UV-IRRADIÁCIÓT KÖVETŐ DNS-KÁROSODÁS ÉS REPARÁCIÓ A BŐR  
SEJTJEIBEN. IN VITRO VIZSGÁLATOK**

*Dr. Emri Gabriella*

**Témavezetők: Prof. Dr. Horkay Irén, Dr. Remenyik Éva**

**DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
BŐR- ÉS NEMIKÓRTANI KLINIKA**

**DEBRECEN, 2004**

## BEVEZETÉS

A napfény számos élettani és kórélettani hatásáért (D-vitamin szintézis, antigénspecifikus immuntolerancia, napégés, fotoallergiás, fototoxikus, fotoaggravált kórképek, photoaging, fotokarcinogenezis etc.) elsősorban az UV-sugárzás a felelős. A háttérben álló sejtbiológiai hatások: mint a fotokémiai reakciók, membránreceptorokon végbemenő változások, lipid- és fehérjemódosítások, illetve a DNS-károsodás típusa, mennyisége hullámhossz-függő, ami alapján három spektrumterületet különítünk el: az UVC-t (200-280 nm), az UVB-t (280-320 nm) és az UVA-t (320-400 nm). Közülük a DNS-károsodás kulcsfontosságú. Egyrészt a genetikai tartalom megváltozásának lehetősége miatt, mely a daganatképződés fontos eleme, másrészt, mert a DNS-léziók szignálként szerepelnek a sejtet, illetve a szervezet integritását védő DNS-reparációs folyamatok, sejtciklus-szabályozó, ellenőrző funkciók, apoptózis aktiválásához, az immunfolyamatok módosulásához, immunszuppresszió vagy éppen napfényallergia kialakulásához, a melanocyták (MC)-ban a melanin-szintézis indukálásához. Az UV-sugárzás DNS-en kifejtett hatásai sok tényezőtől függenek a sejtípustól, a sejt-proliferációs státusztól, az anyagcsere állapottól, a DNS-reparációs kapacitástól, valamint endogén és exogén fotoszenzibilizátorok jelenlététől is. Ezért alapvetően fontosak azok a tanulmányok, melyek a különböző tényezőket nemcsak külön-külön, hanem együttesen is figyelembe véve vizsgálják az UV-sugárzás emberi bőrön kifejtett hatásait.

Az UVC- és UVB-fotonok a DNS-ben elnyelődve ciklobután-pirimidin-dimerek (CPD)-et és pirimidin-(6-4)-pirimidon fotoproduktumok ((6-4)-PD)-at indukálnak. Az UVC-sugárzást az ózon elnyeli, így az atmoszférát, és így a bőrt ez a sugártartomány már nem éri el. Az ózonszint jelenleg is észlelhető károsodása, elvékonyodása miatt azonban a rövidebb hullámhosszú UVB-sugárzás nagyobb részarányban éri el a földet, mely biológiai hatásában jelentős.

Az említett DNS-léziók a nukleotid excíziós reparáció (NER) révén javíthatóak ki. Az elégtelen reparáció mellett is tovább folyó replikáció közben DNS-hurkok, majd egyszálú DNS-gap-ek keletkeznek a dimerek helyén, melyek endonukleázokkal szemben nagyon érzékenyek. Így kettősszálú DNS-törések jönnek létre, ezek révén pedig az UVB-sugárzásra jellemző kromatid típusú kromoszóma aberrációk. A CPD és (6-4)-PD felismerése együtt jár a sejtciklus ellenőrző pontjainak aktiválódásával, ami a sejtciklus késleltetésével időt biztosít a DNS-reparáció befejezésére, ennek elégtelensége esetén pedig programozott sejthalált indít el.

A hosszú hullámú UVA-tartományból a DNS már csak nagyon kis mennyiséget nyel el. Ezért a direkt DNS-károsodás képződése nem számottevő, ezzel szemben megnő a valószínűsége a sejtmembránok lipidjeinek, illetve a citoplazma polimerjeinek excitációjára, mely különböző típusú szabad gyökök képződéséhez vezet. A következmény egyszálú, esetleg kettősszálú DNS-törések, bázismódosulások (8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanozin, abázikus helyek), DNS-fehérje keresztkötések (DPC)). Az egyszálú DNS-törések gyorsan visszakapcsolódhatnak, a báziskárosodások a bázis excíziós reparáció révén javíthatóak ki, a DPC-et enzimek hasíthatják. Bár a CPD, (6-4)-PD hiányában a DNS-károsodás kevésbé súlyosnak tűnik, pontmutációk, sőt kromoszómakárosodás is létrejöhetnek, ugyan ezeknek mértékéről, típusáról kevesebbet tudunk. A bőrdaganatok molekuláris analízise a genetikai módosítások széles spektrumát mutatja, ezekből néhányat ismerten az UV-fény indukál. Az még nem tisztázott azonban, hogy az UV-spektrum mely része mely defektusokat okozza, illetve, hogy az UV-sugárzás milyen mennyiségű kromoszóma aberrációt indukál. Az UVA okozta DNS-károsodás azonban azért nagy jelentőségű, mert a napfény UV-spektrumában ez a tartomány nagy részarányt (95 %) képvisel. Másrészt, az UVB-t hatékonyan elnyelő fényvédők biztosították hosszabb idejű napfényen tartózkodás és a szolárium-lámpák is plusz UVA-terhelést jelentenek. Emellett az UVA penetrációja a bőrbe jóval kifejezettebb és

mélyebb, mint az UVB-sugárzásé. Mindezek alapján az UVA-sugárzás ma már nem tartható ártalmatlannak.

Az epidemiológiai és kísérleti adatok arra utalnak, hogy a humán bőrtumorok incidenciájának növekedése, legalábbis részben, a bőr fokozódó napfény expozíciójához fokozódásához kapcsolódik. Ez főleg a nem-melanoma bőrtumorokra (aktinikus keratózis, bazalioma, spinalioma) vonatkozik. A melanoma kialakulásában, progressziójában az UV-sugárzás szerepe kevésbé tisztázott. A fotokarcinogenezis manapság elfogadott modellje soklépcsős folyamatot tételez fel a tumor kifejlődésének hátterében, amelyben nemcsak az UVB, hanem az UVA is fontos szerepet játszik, illetve a gyógyszerek, kozmetikumok, egyéb környezeti tényezők és az UV-sugárzás lehetséges additív, szinergisztikus interakciói sem elhanyagolhatók. Kísérleti adatok utalnak arra is, hogy kémiai anyagok a bőrbe abszorbeálódva direkt DNS-károsodást indukálhatnak, gátolhatják a DNS-reparációt, replikációt vagy transzkripciót, fotokémiai reakciókat eredményezhetnek, szabad gyököket generálhatnak, vagy megzavarhatják a sejtciklus szabályozást. Mindez módosíthatja a napfény UV-sugárzásának tumort iniciáló hatását.

Kémiai anyag többféle úton kerülhet a bőrbe. Ez történhet terápiás célból, pl. a fotokemoterápia (PUVA=8-metoxi-pszoralen /8-MOP/+UVA) során. Ez a kezelési eljárás jelenleg nagyon elterjedt, mint számos bőrbetegség (psoriasis, vitiligo, atopiás dermatitis, parapsoriasis, mycosis fungoides) kiváló adjuváns terápiája. Hatásának mechanizmusa nem teljesen tisztázott. Ismert, hogy a 8-MOP az I. típusú fotokémiai reakcióban vesz részt, azaz az UV-fotont abszorbeáló molekula a DNS-szálak közé interkalálódva és UV-fotont elnyelve egy pirimidin bázissal 3,4- illetve 4',5'-monoadduktumot képez, majd egy újabb foton hatására DNS-DNS keresztkötést hoz létre. Az ilyen típusú DNS-károsodás reparációja nem tisztázott. *Escherichia coli*-ban, élesztő sejtekben, plazmid DNS-en végzett kísérletek alapján a NER és a rekombinációs reparáció komplex együttműködése valószínű. Humán limfoid

sejtekben különböző DNS-reparációs időket észleltek UVB- és PUVA-kezelést követően. A klinikai gyakorlatból ismert, hogy a fotokemoterápia hatékonysága sok esetben nagyobb, illetve más jellegű a fototerápiához (UVA önmagában vagy UVB) képest, ami a DNS-károsodás eltérő természetéből eredhet. Minthogy PUVA-kezelés alatt a bőrdaganatok rizikója emelkedik, abból a szempontból is fontos az okozott DNS-károsodás vizsgálata, hogy jobban megismerjük a PUVA-karcinogenezis hátterét is.

Kémiai anyag kerülhet a bőrünkbe a környezetünkben is. A formaldehid (FA) ismert a környezetszennyezés egyik fő eleme, amelynek bőrre kifejtett káros hatásai: az irritáció, a kontakt allergia és a fényérzékenység. A FA amellet bizonyítottan citotoxikus, mutagén és klasztogén. Nemrégiben pozitív korrelációt igazoltak munkahelyi FA-expozíció és a nazofaringeális elszarusodó laphámrák előfordulási aránya között. Bőrtumorok fokozott rizikójára vonatkozóan FA-expozíciót követően nincs ismert epidemiológiai bizonyíték. Feltehető, hogy a citotoxikus és genotoxikus hatásokért egyrészt a nukleáris DNS és hisztonfehérjék között képződött DPC perzisztálása a felelős. Másrészt, a FA-indukálta DPC gátolni tudják a DNS-polimerázt, sőt a teljes replikációs komplexet, illetve a DNS-struktúrát moduláló topoizomeráz II-t is. Ezek alapján várható, hogy a FA befolyásolja az UV-sugárzás utáni eseményeket is. Azonban bár vannak kísérleti eredmények, melyek szerint a FA gátolja a NER során a reparációs DNS-szintézist, megerősíteni ezt a későbbiekben nem sikerült.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

Kutatómunkámban a következő kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

- 1.1. Vizsgálható-e a PUVA által okozott DNS-károsodás és az azt követő reparáció comet-assay-vel?

1.2. Hogyan viszonyul a PUVA okozta DNS-károsodás és reparáció az UVB-, illetve az UVA-sugárzás ilyen irányú biológiai hatásához hiperproliferatív keratinocita (KC) modell HaCaT (immortalizált humán KC)-kultúrákban?

Második célkitűzésként tanulmányoztam:

2.1. Klinikailag relevánsan alacsony dózisu UVB- és UVA-sugárzás indukál-e kromoszómakárosodásra utaló mikronukleuszok (MN)-at humán fibroblasztok (FB)-ban és melanociták (MC)-ban?

2.2. Alkalmazható-e, illetve módosításokkal alkalmassá tehető-e egy korábban leírt multiparametrikus áramlási citometriás (FCM) módszer ezekben a sejt kultúrákban a MN-képződés mérésére? A módszer objektivitása, gyorsasága, jobb statisztikai kiértékelhetősége mellett ad-e a partikulumok DNS-tartalmának mérése új információt a sejtben bekövetkező változásokról?

A továbbiakban pedig a következőket vizsgáltam:

3.1. Okoz-e a FA comet-assay-vel kimutatható DNS-károsodást (DPC, egyszálú DNS-töréseket) humán, nem-transzformált, felnőtt bőrből származó KC-ban és FB-ban? Okoz-e szignifikáns DNS-károsodást ezekben a sejtekben hosszú időtartamú, de alacsony koncentrációjú FA-expozíció, mint amilyen például 8 órás FA-expozíciójú munkahelyen vagy smink használatakor könnyen elérhető?

3.2. Van-e különbség comet-assay-vel vizsgálva a FB-ban és a KC-ban végbemenő DNS-károsodás és reparáció tekintetében UVC-, UVA- és szoláris szimulált UV (UVB+UVA)-sugárzást követően?

3.3. Van-e a FA-nek hatása az UV-sugárzás által indukált DNS-károsodásra és reparációra? Ha igen, ez megmutatkozik-e később MN-képződésben mérhető kromoszómakárosodásban?

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### ***Sejtenyésztés***

Összehasonlító vizsgálatainkhoz MC-t és FB-t újszülött praeputium-bőrből nyertünk. MC számára a sejtenyésztő médium alapja Ham's F-10 volt, kiegészítve 12-O-tetra-dekanoil-forbol-13-acetáttal, kolera-toxinnal, izobutil-metil-xantinnal, 5 % újszülött borjú szérummal (Hyclone, Logan UT), penicillinnel és streptomycinnel. Az irhából nyert FB-at 10 % újszülött borjú szérummal, illetve penicillinnel és streptomycinnel kiegészített Ham's F-10-ben növesztettük.

HaCaT sejtenyészeteket felhasználó kísérleteinkhez az immortalizált KC sejt vonalat DMEM sejtenyésztő médiumban tartottuk fenn, mely 10 % újszülött borjú szérumot, illetve penicillint és streptomycint tartalmazott.

KC-t és FB-t emlőplasztikai műtétekből származó normál bőrből nyertünk. Az epidermális sejtek szuszpenzióját mitomycin-kezelt (23.9  $\mu$ M) humán FB-kultúrára szélesztettük FAD2 sejtenyésztő médiumban (DMEM és Ham's F-12 (3:1), melyet újszülött borjú szérummal, adeninnel, inzulinnal, trijód-tyroninnal, hydrocortisonnal, epidermális növekedési faktorról, kolera-toxinnal, penicillinnel és streptomycinnel egészítettünk ki), majd a KC-at szérummentes KC médiumban (KGM, Clonetics, US&Can) tenyésztettük tovább. A FB-at elsőként 10 % újszülött borjú szérummal, illetve penicillinnel és streptomycinnel kiegészített RPMI 1640 médiumban (Biochrom KG, Berlin, Németország) tenyésztettük, majd szérummentes FB sejtenyésztő médiumban (FGM, Promocell, Heidelberg, Németország) tartottuk fenn.

### ***UV-irradiáció***

UVB-irradiációhoz Philips TL-01 fluoreszcens csöveket (Philips Nederland BV, Eindhoven, Hollandia), illetve UVC blokkoló filterrel felszerelt ORIEL xenon arc szoláris szimulátort (Oriel Corporation, Stratford, CT, Model 81160) használtunk. UVA-irradiációra

Sellas Sunlight lámpát (típus 2001, Sellas, Gevelsberg, Németország), Waldmann PUVA 800 lámpát (H. Waldmann GmbH&Co., Németország), illetve CAMAG Deluxe lámpát (MuttENZ, Svájc) alkalmaztunk.

### ***Comet-assay***

A sejteket tripszinizálással eltávolítottuk a Petri-csésze aljáról, majd beágyasztuk alacsony olvadáspontú agaróz gélbe (0.5 %) egy normál olvadáspontú agarózzal bevont csiszolt tárgylemezen. A sejteket ilyen formában egy éjszakán át 4 °C-on lízisnek tettük ki (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 % N-lauroyl-szarkozinát, 1 % Triton, 2 % DMSO, pH 10). Ezután a lemezeket erősen alkalikus oldatban (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13.0) vagy neutrális assay esetén pH 8.0 (89 mM Tris, 89 mM bórsav, 2 mM EDTA) oldatban 25 percig hagytuk equilibrálódni, melyet elektroforézis követett (21 V (0.86 V/cm), 300 mA, 25 perc). Neutralizálás (0.4 M Tris, pH 7.5) után a sejtmagokat etídium-bromiddal (EB) festettük (20 µg/ml). Az üstökös hosszát, intenzitását fluoreszcens mikroszkóp (Leica, Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) alatt értékeltük ki, reprezentatív mintákat fotodokumentáltunk. A sejtmagokat 4 kategóriába soroltuk, lemezenként legalább 1x100 sejtmagot tanulmányoztunk.

### ***Mikronukleusz (MN)-assay***

Fluoreszcens mikroszkópos meghatározáshoz üveg tárgylemezeken, FCM mérésekhez Petri-csészékben exponenciálisan növekvő sejteket szélesztettünk. A MN-képződést a FB-ban 4, a MC-ban 8 nappal a besugárzást követően vizsgáltuk.

A tárgylemezeket PBS-ben mostuk, hypotoniás oldatban (0.1 M NaCl, 1.7 mM KCl) megmerítettük, majd a sejteket metanol:ecetsav:PBS 1:3:4 arányú keverékében fixáltuk. A DNS megfestésére propídium-jodidot használtunk (5 µg/ml) Vectashield-ben (Vector Laboratories, Inc., USA). A MN intakt interfázis sejtben, mint a sejtmagtól teljesen

elkülönülő, de ugyanazon fluoreszcencia intenzitást hordozó partikulák jelentek meg, átmérőjük 1/8-1/2-e a sejtagnak. Tárgylemezenként legalább 4x500 sejtet értékeltünk.

Az FCM méréshez a sejtek pelletjéhez 0.5 ml I. oldatot (10 mM NaCl, 3.4 mM Na-citrate, 10 mg/l szarvasmarha pancreas eredetű RNase A és 0.03 % (v/v) Nonidet P-40) adtunk, majd  $1.3 \times 10^{-5}$  M végkoncentrációig EB-ot (Sigma). Másfél óra szobahőmérsékleten és sötétben történt inkubálás után további 0.5 ml II. oldatot (71.4 mM citromsav, 0.25 M szukróz és 2 mM EDTA) adtunk a szuszpenzióhoz. A minta mérését a következő napon végeztük el, addig  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A sejtmembrán festésére 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién (DPH) (Sigma) fluoreszcens festéket alkalmaztunk, melyet a mérés előtt csak 3-4 órával adtunk a mintához  $1.1 \times 10^{-4}$  M végkoncentrációban.

Az FCM mérést egy Epics Elite (Coulter, Luton, UK) készülékkel végeztük, mely két Ar<sup>+</sup>-ion laserrel volt felszerelve, 480 nm és 351/363 nm laser emittálására az EB, illetve a DPH excitációs spektrumának megfelelően. A két festék excitációjához időkésltetést (~40 usec) vezettünk be a két laser-nyaláb közé. Ez a beérkező jelek közötti élesebb elkülöníthetőséget eredményezett. Az EB, illetve a DPH jelrögzés céljából alkalmazott optikai filterek egy 630 nm hullámhosszat átengedő filter, illetve egy 450 nm sávot átengedő filter voltak, ez utóbbi kombinációban egy 550 nm hullámhosszat átengedő dikroikus tükörrel. Adott EB- és DPH-fluoreszcencia intenzitással rendelkező partikulákat különgyűjtöttünk (sorting) tárgylemezen és fluoreszcens mikroszkóp alatt azonosítottuk, hogy mely régióba esnek a MN, a nukleuszok, illetve a sejtörmelék.

### ***Proliferációs assay***

A vizsgálat időpontjában a sejttenyésztő médiumot 10 % (v/v) alamarBlue<sup>TM</sup>-t (Biosource, Nivelles, Belgium) tartalmazó tápfolyadékra cseréltük le. A festék redukciót, mely a fluoreszcencia intenzitás növekedésében nyilvánult meg, spektrofluorimetriával (FL1000<sup>TM</sup>, Dynatech Laboratories, Sullyfield, Virginia, USA) mértük. Az alamarBlue<sup>TM</sup>

fluoreszcencia és a sejtszám összefüggését korrelációs analízis alapján határoztuk meg (Excel 97).

## **EREDMÉNYEK**

### ***1. Fotokemoterápia (PUVA) hatására bekövetkező DNS-károsodás és reparáció***

HaCaT sejteket vizsgálva alkalikus comet-assay-vel, üstökös-képződést (egyszálú DNS-törések, alkali labil helyek) közvetlenül az irradiációt követően csak UVA-besugárzás ( $5 \text{ J/cm}^2$ ) esetén láttunk. A DNS-migráció másfél órával később már csaknem teljesen eltűnt, jelezve az indukált DNS-károsodás gyors reparációját. UVB-irradiációt ( $60 \text{ mJ/cm}^2$ ) követően DNS-migrációt csak fél óra múlva kezdtünk észlelni. Ez arra utalt, hogy a comet-assay itt nem direkt DNS-károsodást mutat, hanem inkább az indukálódott NER következtében időlegesen megjelenő egyszálú DNS-töréseket. Ahogy a DNS-szálak újraszintetizálódtak és kapcsolódtak, az üstökös-képződés ismét eltűnt. Az alkalikus comet-assay önmagában nem bizonyult alkalmasnak a fotokemoterápia alatt bekövetkező DNS-törések követésére. Neutrális comet-assay-vel, amellyel kettősszálú DNS-töréseket tudunk kimutatni, úgy tűnt, hogy sem az UVA-, sem az UVB-irradiáció nem indukált ilyen típusú DNS-léziókat. Ezzel szemben 8-MOP-nel ( $300 \text{ ng/ml}$ ) előkezelve a sejteket, majd UVA-val ( $2 \text{ J/cm}^2$ ) besugarazva őket (PUVA) a neutrális assay eredményei szerint kettősszálú DNS-törések jöttek létre másfél órával a besugarazást követően, nem azonnal.

### ***2. Kromoszóma-károsodás összehasonlítása MC-ban és FB-ban $\gamma$ , UVB- és UVA-irradiációt követően***

A MN-képződés humán bőrsejt-kultúrákból történő FCM méréséhez az 1995-ben Wessels és Nüsse által leírt módszert némileg módosítottuk a magok, sejtmagok és a nem-specifikus sejttörmelék jobb elkülönítése céljából: a sejtlízis számára hosszabb időt adtunk a

magok és MN elkülönüléséhez, 1 mM EDTA mintához adásával védtük a MN-at a felszabaduló endonukleázoktól, illetve időkésleltetett kettős laser FCM-t alkalmaztunk.

Előkísérletek során meghatároztuk azt az irradiáció utáni optimális mérési időt, amikor a sejtek nagy részében a sejtosztódás már megtörtént, lehetővé téve a MN-képződés mérését, de a minta még nem hígult fel többszöri sejtosztódással. Mikroszkópos értékelést használva megállapítottuk, hogy FB számára 4 nap, MC számára 8 nap volt az optimális.

$\gamma$ -irradiációt követően MC-ban 9 Gy dóziséig, FB-ban 4 Gy dóziséig láttunk fokozatos emelkedést a MN-képződésben. UVB-irradiáció után MC-ban 2 J/cm<sup>2</sup>-ig, FB-ban 1,1 J/cm<sup>2</sup> dóziséig tapasztaltunk ugyancsak lineáris dózis-válasz összefüggést. MC-ban nagyobb UVB-dózisok voltak szükségesek ahhoz, hogy a FB-ban mért MN-frekvenciához hasonló mértékű MN-indukciót elérjünk. A maximum MN-indukció FB-ban 1.27±0.24 % volt, MC-ban 1.1±0.24 %. A G2/M-fázisú sejtmagok aránya szintén növekedett a dózissal. A növekedés ugyanazon ionizáló sugárzás- vagy UVB-dózist tekintve magasabb volt FB-ban, mint MC-ban.

Az FCM módszer beállítása és eredményeink alátámasztása érdekében fluoreszcens mikroszkóp alatt is ellenőriztük a MN-indukciót. FB-ban lineáris dózis-válasz összefüggést tapasztaltunk a MN-képződésben UVA-irradiációt követően is (0-30 J/cm<sup>2</sup>). A maximum MN-előfordulás a kontrollhoz viszonyítva körülbelül kétszeres volt (p<0.05). Mikroszkópos vizsgálattal identikus dózisok esetében számszerűen magasabbnak adódott a MN-frekvencia az FCM-val kapott eredményhez képest. A G2/M-fázisú sejtek aránya szintén dózis-dependens módon növekedett, körülbelül 20 %-ig, ahogyan azt az FCM mérések mutatták. MC-ban UVA-irradiáció után nem volt észlelhető sem MN-indukció, sem sejtciklus-késleltetés.

***3. FA által okozott DNS-károsodás, illetve FA hatása az UV-okozta DNS-károsodásra és reparációra normál humán KC-ban és FB-ban***

0-100  $\mu\text{M}$  FA nem indukált DNS-száltöréseket, alkali labil helyeket sem a KC-ban, sem a FB-ban. Ezzel szemben szignifikáns DPC-indukciót tapasztaltunk. Egy rövid MMS-expozíció (250  $\mu\text{M}$ , 30 perc) szignifikáns ( $p < 0.001$ ) DNS-károsodást, és ezzel comet-képződést hozott létre mindkét sejttypusban. A sejtek FA-del való előkezelése (0-100  $\mu\text{M}$ , 4 illetve 8 órás inkubáció) az MMS-okozta DNS-vándorlás mértékének egyenes arányos csökkenését idézte elő a DPC produkciója révén ( $R^2 > 0.95$ ), így a DPC-indukciót a csökkenés mértékével tudtuk jellemezni.

3  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UVC-besugárzás után közvetlenül comet-assay-vel detektálható DNS-károsodást (egyszálú DNS-törések, alkali labil helyek) nem láttunk sem KC-ban, sem FB-ban, hasonlóan HaCaT-sejteken UVB-vel végzett korábbi kísérleteinkhez. 30 perc elteltével DNS-migráció vált láthatóvá, legvalószínűbben a NER indukálódása révén. Ezután az assay-vel még 1-2 óráig volt látható üstökös-képződés, azonban az idő teltével egyre kisebb mértékben, majd 6 ó alatt a kontroll szintre csökkent. A két sejttypus között a DNS-reparációs kinetikában nem volt szignifikáns különbség. Ezzel ellentétben FA jelenléte KC-ban 0.5 órával a besugárzás után, FB-ban 4.5 órával a besugárzást követően szignifikáns változást, hosszabb üstökös-képződést eredményezett ahhoz a DNS-migrációhoz képest, amelyet az UVC önmagában okozott. 20 órával az irradiáció után a sejtek comet-képződése FA-expozíciótól függetlenül a kontrollal megegyező volt.

3  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA-besugárzást követően mindkét sejttypusban azonnal szignifikáns DNS-károsodás volt mérhető, csakúgy, mint korábban a HaCaT sejtekben. Ám ez a DNS-károsodás most is gyorsan, mindössze 1 óra alatt eltűnt a sejtekből. FA-expozíció nem befolyásolta sem a DNS-károsodás mértékét, sem a DNS-reparációt.

30  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UVB- és 0.24  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA-irradiáció együttese (szoláris szimulált UV) az UVC-besugárzás hatásához hasonló változásokat hozott létre. Az üstökös-képződés a besugárzás után 0.5-2 órával vált láthatóvá, ám ez esetben hamar, már 3 óra múlva le is

csökkent a kontroll szintjére. 10  $\mu\text{M}$  FA-expozíció a szoláris irradiációt megelőzően szignifikánsan ( $p < 0.05$ ) hosszabb üstökösöket eredményezett a csak besugarazott mintákhoz képest 0.5-3 órával az irradiációt követően mind FB-ban, mind KC-ban.

10  $\mu\text{M}$  FA-expozíció nem okozott szignifikáns változást a sejtek proliferációjában a kontrollhoz képest. UVC-irradiáció után a sejt kultúrákban a proliferáció csökkent, a FB-ban erőteljesebben, a KC-ban kisebb mértékben. Figyelembe véve a besugárzás után 4, illetve 24 órával mért proliferációs rátákat a FA-előkezelés a FB-ban tovább erősítette az UVC-irradiáció negatív hatását. Ezzel szemben KC-ban az irradiációt követő azonnali, illetve 1 óra múlva mért toxicitás erősödött fel, ha az AlamarBlue<sup>TM</sup> fluoreszcencia intenzitást vettük alapul. Az UVA-besugárzás nem befolyásolta szignifikánsan a sejtproliferációt. FA hatására is csak kissé csökkent a sejtek növekedése. A szoláris UV-irradiáció (UVB+UVA) sem változtatta meg számottevően a proliferációt a sejtekben. FA-előkezelés is csak kis mértékben csökkentette a sejt növekedést.

A MN-képződést UVC-irradiáció után FB-ban vizsgáltuk. A besugarazást ( $4 \text{ mJ/cm}^2$  UVC) követően 72 óra elmúltával a kontrollhoz képest szignifikánsan több MN volt megfigyelhető a sejt kultúrában. 12,5  $\mu\text{M}$  FA önmagában nem okozott fokozott MN-indukciót. Ezzel szemben 6 óra inkubáció ilyen FA-koncentráció mellett szignifikánsan ( $p < 0.05$ ) megnövelte az UVC-indukálta MN előfordulási gyakoriságát.

## **MEGBESZÉLÉS**

### ***1. Fotokemoterápia (PUVA) hatására bekövetkező DNS-károsodás és reparáció***

Vizsgálatainkban demonstrálni tudtuk, hogy az UVB, az UVA és a PUVA által okozott DNS-károsodás típusa, reparációja jelentősen különbözik egymástól. Az UVA-irradiáció hatására elsősorban egyszálú DNS-törések keletkeznek oxidatív útvonalakon. Ezek gyors újrapcsolódása eredményezi az üstökös-képződés comet-assay-ben észlelhető gyors

lecsengését. Az UVB-sugárzás a DNS-ben elnyelődve CPD-t és (6-4)-PD-t hoz létre, melyek reparációjához nukleotid excízióra van szükség. Az egyszálú DNS-törések megjelenése így tranziens, reparációs intermedier termékekből ered. Ezek az eredményeink összhangban vannak az irodalomban leírtakkal. A PUVA-okozta DNS-károsodás és reparáció kimutatására (monoadduktumok, DNS-DNS keresztkötések) az alkalikus comet-assay nem bizonyult eredményesnek. Valószínűnek látszik, hogy a pszoralen hozzáadása a sejtekhez az indukált DNS-DNS intra- és interstrand keresztkötések miatt gátolta az UVA-okozta DNS-vándorlás detektálását. Neutrális comet-assay-t alkalmazva azonban a PUVA-kezelés nyomán kettősszálú DNS-töréseket tudunk demonstrálni, amelyek időbeni megjelenésüket tekintve lehetnek DNS-reparációs intermedierek. A PUVA-okozta DNS-monoadduktumok és keresztkötések kijavítására az irodalomban a NER és a rekombinációs reparáció lehetősége egyaránt ismert, illetve a kettő együttműködése is lehetséges. Az általunk beállított assay mindent egybevetve alkalmasnak tűnik a foto(kemo)terápia klinikai hatásának követésére a betegágy mellett is.

## ***2. UV-irradiációt követő kromoszóma-károsodás (MN-indukció) összehasonlító vizsgálata normál humán MC-ban és FB-ban***

A MN-képződés a kromoszómakárosodás igen érzékeny paramétere. A MN-ok olyan genetikai anyagot reprezentálnak, amely a sejtosztódás során nem tudott beépülni a leány-magvakba. Korábbi vizsgálatok xeroderma pigmentosum-ban, illetve familiáris melanoma malignum-ban szenvedő betegekből származó FB kultúrákban a szoláris UV-sugárzás okozta MN-indukciót magasabbnak találták egészséges egyénekhez képest. Ez jól korrelál a betegek napfény-expozíció okozta emelkedett tumor rizikójával.

A módosított multiparametrikus FCM módszerrel alacsony dózisu UV és  $\gamma$ -irradiációt követően mind MC-ban, mind FB-ban dózis-válasz összefüggést találtunk MN-képződésre és a G2/M-fázisban megmutatkozó sejtciklus-késleltetésre.

Az UV-indukált MN-képződésről mostanáig kevés adat áll rendelkezésünkre. Az irodalmi adatokat tekintve, az endonukleáz-érzékeny helyek indukciójában az UVB és UVA hatékonyságának aránya humán FB-ban 125:1. Hasonlóan magas arányt észleltek hörcsögsejteken is. A FB-ban végzett kísérleteinkben a MN-indukcióban mi kisebb arányszámot találtunk (25:1). Hasonlóan kis arányszám olvasható az irodalomban a kettősszálú DNS-töréseket illetően. Erre az szolgálhat magyarázatként, hogy az UVA-indukálta MN elsősorban nem endonukleáz-szenzitív helyekből származnak, hanem más léziókból is (pl. direkt DNS-száltörések). Összességben azonban ezek az eredmények rámutatnak az UVA-sugárzás okozta kromoszómakárosodás rizikójára, mely nem hanyagolható el a fotokarcinogenezisben.

A MC-ban a FB-kal összehasonlítva jóval alacsonyabb volt a MN-indukció mértéke mind  $\gamma$ -, mind UVB-irradiáció után. Nem észleltünk szignifikáns MN-indukciót UVA-irradiációt követően sem. Ennek egyik lehetséges magyarázata a MC hosszabb sejtciklusa.

FCM-val az MN-indukció vizsgálatával egy időben a sejtciklus-késleltetésről, pontosabban a G2/M-fázis-késleltetésről is képet nyertünk az ugyanazon mintában jelenlévő sejtmagok jellemzése során. Az irradiáció okozta MN-indukció és a G2/M-fázisú sejtmagok aránya között talált pozitív korreláció mellett szól, hogy a MN-képződést és ezt a sejtciklus-késleltetést is kettősszálú DNS-törések indítják el.

Az equitoxikus dózisok (D50) a FB túlélésére vonatkozóan UVB esetén  $1 \text{ J/cm}^2$  (313 nm), UVA esetén  $15 \text{ J/cm}^2$ . Az ezen dózisoknak megfelelő MN-frekvenciák 3 % és 1 %. Megjegyzendő, hogy az  $1 \text{ J/cm}^2$  UVB és a  $15 \text{ J/cm}^2$  UVA körülbelül 1 és 0.2 minimális eritéma dózisnak felel meg. Ilyen UV-dózisoknak könnyen ki vagyunk téve a nyári napon, az UVA hasonlóan magas dózisainak pedig a szoláriumok mesterséges fényű lámpái alatt, illetve UVA1-terápia során. Az UVB és UVA bőrsejteken megmutatkozó szignifikáns klasztogén hatása, amelyet igazolni tudtunk, arra utal, hogy a humán bőr UVB és UVA besugárzása

hozzájárul genetikai instabilitás kialakulásához, pl. heterozigótaság veszteségekhez, mely DNS-léziók viszont a bőr karcinogenezisében ismert tényezők.

### ***3. FA által okozott, illetve FA által módosított, UV-irradiáció által indukált DNS-károsodás és reparáció összehasonlító vizsgálata normál humán KC-ban és FB-ban***

A FA elsősorban DPC-t indukál. 4 órás FA-expozíció után FB-ban 50  $\mu\text{M}$ , KC-ban 25  $\mu\text{M}$  FA-koncentrációnál láttunk szignifikáns ( $p < 0.05$ ) keresztkötés-képződést. Ennek elérésére 8 órás expozíció után 25  $\mu\text{M}$  FA volt elegendő mindkét sejttípusban. Az irodalomban korábban limfoblasztokban 50  $\mu\text{M}$  FA 2 órás inkubációjáról mutatták ki, hogy szignifikáns keresztkötés-képződést okoz. Ezzel szemben humán SV40-transzformált FB-ban és V79 sejtekben 100  $\mu\text{M}$ -nak találták a hatékony FA-koncentrációt (4 órás expozíció). E felett a koncentráció felett dóziszfüggő keresztkötés-indukciót láttak, mely a citotoxicitással is korrelált, és független volt a sejt típusától. 100  $\mu\text{M}$  FA 1 órás expozíciója bronchiális FB-ban és KC-ban már elegendő volt DPC létrehozásához, de ez a dózis már egyben erősen citotoxikus is volt. Úgy tűnik, hogy a normál humán bőr KC-nak és FB-nak primer kultúrái kissé érzékenyebbek FA-re, mint a bronchiális sejtek vagy V79 sejtek. FA-expozíciót követően nem tudtunk DNS-egyszálú töréseket kimutatni, nem változott továbbá szignifikánsan 10  $\mu\text{M}$  FA expozícióját követően sem a FB, sem a KC proliferációja. Ezért ez utóbbi koncentrációt választottuk, amikor a továbbiakban a FA esetleges hatását tanulmányoztuk az UV-okozta DNS-károsodásra. Comet-assay-vel végzett kísérleteinkben az UVA-, UVB- és UVC-irradiáció hullámhossz-specifikus és időfüggő változásokat indukált a DNS-elvándorlásban (üstökös-képződésben), korábbi, HaCaT-sejteken végzett vizsgálatainkkal egybehangzóan. Ha a sejteket szoláris szimulátor (UVB+UVA) alacsony dóziséval irradiáltuk és a DNS-migráció időkarakterisztikáját vizsgáltuk, azt az UVB által aktivált NER-ra találtuk jellemzőnek. Jelen vizsgálatainkban elsőként közlünk összehasonlító adatokat humán primer epidermális KC és FB UV-indukált reparációs kinetikájáról azonos

hullámhosszú UV-besugárzást és dózisokat alkalmazva. Eredményeink nem mutattak szignifikáns különbséget sem az alkalmazott UV-spektrumok, sem a két sejtfeleség között. Az irodalmat áttekintve, UVC-okozta DNS-károsodást követően alkalikus elúciós technikával hasonló reparációs kinetikát mutattak az ugyanazon a donorból származó bronchiális epitheliális sejtek és FB is.

Ha a sejt kultúrákat 10  $\mu\text{M}$  FA expozíciónak tettük ki irradiáció előtt, UVA-besugárzás után nem tapasztaltuk az egyszálú DNS-törések újrakapcsolásának gátlását. Ugyanakkor UVC vagy szoláris UV-irradiációt követően a FA módosította a DNS-reparáció idő-karakterisztikáját, lassította a comet-képződésnek a kontroll szintjére való visszacsökkenését. Magyarozatként felmerül, hogy a DNS-károsodás mértéke a mintákban különböző, a hosszabb üstökös a FA-expozíciókor a NER során zajló több incíziós eseményből adódik. Ez idáig nem ismert olyan fotokémiai reakció a FA és UV-irradiáció között, amely további DNS-károsodáshoz vezetne. Az egyszálú reparációs hézagokat betöltő DNS-reszintézis/ligáció aktivitásának károsodása a NER során szintén felelős lehet a hosszabb és lassabban csökkenő üstökösökért. A FA-nek a DNS-reparációs folyamatokat gátló hatását korábban már közölték, de oka csak részben ismert. Mi a kísérleteinkben a FA DPC-t indukáló hatását demonstráltuk, amely felelős lehet a reparáció gátlásáért és a sejtproliferáció csökkenéséért is. Bronchiális sejtekben a FA gátolja mind a timidin, mind az uridin inkorporációját a nukleinsavba. Valószínű, hogy a FA hatásának érvényesülésében fontosak lehetnek egyes mikrokörnyezeti tényezők, pl. a poliamin depléción, a nukleotid-felvétel és -szintézis gátlása, amelyek a reparációs DNS-szintézis késleltetését okozhatják.

A NER gátlása az egyszálú DNS-hézagok akkumulációjával endonukleázok számára nagyobb támadási felületet adhat. Ez DNS-kettősszálú törések nagyobb előfordulási gyakoriságához vezethet, és kromoszómakárosodást indukálhat. Eredményeink szerint a FA-expozíció besugárzás előtt olyan koncentrációban (12.5  $\mu\text{M}$ ), mely önmagában még nem

emeli meg a MN-képződés gyakoriságát, 4 mJ/cm<sup>2</sup> UVC után felerősíti a MN-indukciót. Minthogy a genetikai információ és a génexpresszió a kromoszóma-átrendeződés során megváltozhat, és a kromoszóma-rendellenességek nagy száma karakterisztikus a tumorsejtekre, úgy tűnik, a krónikus FA expozíció hozzájárulhat az UV-indította bőrtumorok kifejlődéséhez.

## **EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA**

Munkánkban a napfény ultraibolya spektrumának DNS-re kifejtett károsító hatását tanulmányoztuk, a besugárzást követően különböző biológiai végpontokban. Eredményeink amellet szólnak, hogy erre a célra a comet-assay és a MN-assay alkalmas vizsgálati módszerek.

- 1.1. Comet-assay-vel tenyésztett humán bőrsejtekben (HaCaT) különbséget tudunk tenni az UVA- és az UVB-sugárzás okozta DNS-károsodás és reparáció között. Eredményeink az irodalommal egybehangzóak. Megállapítottuk továbbá, hogy az alkalikus comet-assay önmagában nem alkalmas a PUVA (8-MOP+UVA-fény) DNS-re kifejtett hatásának leírására.
- 1.2. Elsőként mutattunk rá arra neutrális comet-assay segítségével, hogy a PUVA által kiváltott DNS-károsodást követő reparáció során kettősszálú DNS-törések keletkeznek.
- 2.1. Az általunk továbbfejlesztett FCM módszer lehetővé tette a MN-indukció mérését és ezzel egyidőben a G0/G1 és G2/M fázisú sejtek elkülönítését is tenyésztett normál humán FB-ban és MC-ban. A kromoszómakárosodás mértéke párhuzamot mutatott a G2/M-fázisban megrekedt sejtek arányával.
- 2.2. Elsőként írtuk le, hogy az UVA-irradiáció dózis-dependens módon kromoszómakárosodást indukál humán FB-ban.

- 2.3. Megállapítottuk, hogy az UVB-irradiáció is okoz dózis-dependens módon kromoszómakárosodást humán MC-ban és FB-ban is, de ugyanazon dózisokra a két sejttípusban különböző a károsodás mértéke.
- 3.1. Tenyésztett normál humán KC-ban és FB-ban comet-assay segítségével megállapítottuk, hogy 4 órás, illetve 8 órás nagyon alacsony koncentrációjú FA-expozíció szignifikáns és dózis-dependens DPC-képződést idéz elő.
- 3.2. Elsőként végeztünk comet-assay-vel összehasonlító vizsgálatot az UV-sugárzás okozta DNS-károsodás és reparációs kinetika tanulmányozására nézve tenyésztett normál humán KC-ban és FB-ban. A DNS-károsodás és reparáció a besugárzás hullámhosszától függött, és hasonló kinetikát mutatott FB-ban és KC-ban.
- 3.3. A FA hatásának további tanulmányozásakor azt találtuk, hogy a FA már alacsony dózisban gátolja az UVC- és az UVB-irradiációt követő NER-t a reparációs DNS-szintézis/ligáció lépésben. UVA-besugárzás után a FA nem befolyásolta a reparációt.
- 3.4 Megállapítottuk, hogy a reparáció késleltetése a kromoszómakárosodás megnövekedéséhez vezet. A FA olyan koncentrációban, mely nem indukált MN-t, szignifikáns emelkedést okoz az UVC-indukált kromoszómakárosodásban.

## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. **Emri G**, Remenyik E, Varga Cs, Hunyadi J, Horkay I: DNA-damage during photo(chemo)therapy studied by comet-assay. (1999) *Neoplasma* 46 (Suppl): 106-107. IF: 0.448
2. **Emri G**, Wenczl E, van Erp P, Jans J, Roza L, Horkay I, Schothorst AA: Low doses of UVB or UVA induce chromosomal aberrations in cultured human skin cells. (2000) *J Invest Dermatol* 115: 435-440. IF: 4.539
3. **Emri G**, Schaefer D, Held B, Herbst C, Zieger W, Horkay I, Bayerl C: Low concentrations of formaldehyde induce DNA-damage and delay DNA-repair after UV-irradiation in human skin cells. (2004) *Exp Dermatol* 13: 305-315. IF: 2.303

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁVAL KAPCSOLATOS POSZTEREK ÉS ELŐADÁSOK (IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK)

1. **Emri G**, Remenyik E, Varga C, Hunyadi J, Horkay I: Induction of DNA strand breaks by 8-methoxy-psoralen and UVA (PUVA) in cultured cells detected by means of comet-assay. (1999) *J Invest Dermatol* 113: 246. IF: 4.903
2. **Emri G**, van Erp P, Jans J, Rebel H, Vink AA, Roza L, Schothorst AA: Induction of micronuclei by  $\gamma$ -rays and UV irradiation in cultured cells; detection by means of flow cytometry and fluorescence microscopy. (1998) *Cytometry* 9 (Suppl): 87.
3. **Emri G**, Wenczl E, van Erp P, Jans J, Roza L, Schothorst AA, Horkay I: UV-irradiation results in delay of cell cycle progression and formation of micronuclei with different effectiveness in cultured human fibroblasts and melanocytes as determined by flow cytometry. (2000) *Cytometry* 42: 146-147. IF: 2.557
4. Held B, Schaefer D, **Emri G**, Schremmel K, Herbst C, Goerdt S, Bayerl C: Effects of subtoxic doses of aldehydes and/or UV-irradiation on primary human dermal fibroblasts in vitro depend on culture conditions. (2001) *J Invest Dermatol* 117: 110. IF: 4.645
5. Remenyik É, Varga Cs, **Emri G**, Hunyadi J, Horkay I: Comet-assay to study UV-induced DNA-damage. (1998) *Photoderm Photoimmun Photomed* 14: 204. IF: 0.902

## EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Zahuczky G, Boross P, Bagossi P, **Emri G**, Copeland TD, Oroszlan S, Louis JM, Tózsér J: Cloning of the bovine leukemia virus proteinase in *Escherichia coli* and comparison of its specificity to that of human T-cell leukemia virus proteinase. (2000) *Biochim Biophys Acta* 1478: 1-8. IF: 1.399
2. **Emri G**, Tornai I, Pósnán E, Seszták T, Varga V, Horkay I: Porphyria cutanea tarda és hepatitis C vírus. (2001) *Orv Hetil* 142: 2635-2639.
3. Irinyi B, Szegedi A, **Emri G**, Bégány Á, Hunyadi J: Dermatitis herpetiformis Duhring Sumetrolim kezelése. (2001) *Bőrgyógy Ven Szle* 77: 23-26.
4. Varga V, Remenyik É, **Emri G**, Dankó K, Nagy A, Hunyadi J, Horkay I: Porphyria cutanea tarda, hepatitis C vírus infekció és polymyositis együttes előfordulása. (2001) *Bőrgyógy Ven Szle* 77: 119-121.
5. Nagy Z, Koszo F, Par A, **Emri G**, Horkay I, Horanyi M, Karadi O, Sarlos P, Morvay M, Varga V, Dobozy A, Mozsik G: Haemochromatosis (HFE) gene mutations and hepatitis C virus (HCV) infection as risk factors for porphyria cutanea tarda. (2002) *Gastroenterology* 122 (Suppl): M1477. (abstract) IF: 13.44

6. Nagy Z, Koszo F, Par A, **Emri G**, Horkay I, Horanyi M, Karadi O, Jr Rumi G, Morvay M, Varga V, Dobozy A, Mozsik G: Hemochromatosis (HFE) gene mutations and hepatitis C virus infection as risk factors for porphyria cutanea tarda in Hungarian patients. (2004) *Liver Int* 24: 16-20. IF:2.403
7. Harangi M, Seres I, Varga Zs, **Emri G**, Szilvássy Z, Paragh Gy, Remenyik É: Atorvastatin effect on HDL-associated paraoxonase activity and oxidative DNA damage. *J Eur Clin Pharmacology* (közlésre benyújtva)