

DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ORVOSI VEGYTANI INTÉZET
PÁLYAMUNKA

**A PARP inhibitorok hatásainak vizsgálata az atópiás dermatitisz egy
egérmodelljében**

KOVÁCS VIRÁG ZSÓFIA

DE ÁOK Orvosi diagnosztikai laboratóriumi analitika specializáció

IV. évfolyam



Dr. Szántó Magdolna

adjunktus

Témavezető

A pályamunka bírálatra való beküldéséhez hozzájárulok.

Prof. Dr. Virág László

Intézetvezető

Prof. Dr. Bay Péter

Intézeti TDK felelős

DEBRECEN

2025

Tartalomjegyzék

Absztrakt	4
Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	7
1.1. A humán bőr felépítése	7
1.1.1. Epidermisz.....	7
1.1.2. Dermisz	8
1.1.3. Hipodermisz	9
1.2. Atópiás dermatitisz.....	9
1.2.1. Az AD szövettani jellemzői	9
1.2.2. Az AD epidemiológiája és életminőségre gyakorolt hatásai.....	10
1.2.3. Kórélettan	11
1.2.4. Genetikai tényezők az AD kialakulásában.....	12
1.2.5. Klinikai megjelenés és kezelés.....	13
1.3. ADP-riboziláció és a PARP enzimesalád.....	14
1.4. PARP inhibitorok	16
1.4.1. A PARP inhibitorok hatásmechanizmusa daganatokban	16
1.4.2. A PARP inhibitorok hatásai nem-onkológiai kórképekben	17
2. Célkitűzés	18
3. Anyagok és módszerek.....	19
3.1. Kísérleti egerek	19
3.2. Kalcipotriol által indukált AD modell.....	19
3.3. Egérbőr minták szövettani vizsgálata.....	20
3.4. Citokinek és kemokinek expressziós mintázatának vizsgálata egérbőrben	21
3.5. Citokin expresszió mérése az egerek bőrmintáiban ELISA módszerrel	22
3.6. RNS-izolálás és RT-qPCR	22

3.7. Statisztikai analízis	23
4. Eredmények.....	25
4.1. A PARP inhibitorok hatására mérséklődtek a kalcipotriol által indukált AD bőrtünetei.....	25
4.2. A talazoparib csökkentette a kalcipotriol hatására megemelkedett gyulladásos mediátorok szintjét a bőrben	27
4.3. Mindkét PARP inhibitor csökkentette a Th2 típusú citokinek gén- és fehérjeexpresszióját az AD modellben.....	29
5. Megbeszélés	31
6. Köszönetnyilvánítás	33
7. Irodalomjegyzék.....	34
Függelék.....	38

Absztrakt

Az ADP-riboziláció egy poszttranszlációs fehérje módosítás, amely számos biológiai folyamat szabályozásában vesz részt, többek között a DNS hibajavítás, transzkripció és transzláció, sejtmétabolizmus és energiaháztartás, lipid szintézis, sejt differenciáció, valamint immunválasz és gyulladás bizonyos útvonalaiban.

Az ADP-ribozilációt végző enzimek (más néven PARP-ok) farmakológiai és daganatterápiás szempontból különös jelentőséggel bírnak, ugyanis az utóbbi években több PARP inhibitor kapta meg a Food and Drug Administration (FDA) engedélyét klinikai alkalmazásra. Elsődleges indikációjuk az ovárium és emlő karcinómák terápiája. Azonban, mivel számtalan in vivo és in vitro tanulmány bizonyítja, hogy a PARP inhibitorok különböző gyulladásos útvonalakat is képesek gátolni, felmerült a PARP inhibitorok gyulladásgátló indikációban való alkalmazhatóságának lehetősége.

Az atópiás dermatitisz, vagy más néven ekcéma, az egyik leggyakoribb gyulladásos bőrbetegség. Az ekcéma egy 2-es típusú gyulladás, melyre jellemző az interleukin (IL)4, IL13, illetve az ún. thymic stromal lymphopoietin (TSLP) emelkedett szintje a léziós bőrben. Transzkriptomikai analízisek a PARP enzimek expressziójának növekedését mutatták ki ekcémás betegek léziós bőrében, így feltételezzük, hogy a PARP aktiváció szerepet játszhat az ekcémára jellemző gyulladás kialakulásában.

Munkánk során azt a célt tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, hogyan befolyásolják klinikailag alkalmazott PARP inhibitorok, a rucaparib és a talazoparib, a bőrben kialakuló gyulladást az ekcéma egy széles körben alkalmazott modelljében, a kalcipotriol által indukált gyulladásban BALB/c egerekben. Az inhibitorok hatásait az érintett bőrminták szövettani, gén- és fehérje-expressziós vizsgálataiban értékeltük.

Rövidítések jegyzéke

AD	Atópiás dermatitisz
ADP	Adenozin-difoszfát
ANOVA	Varianciaanalízis
ATP	Adenozin-trifoszfát
BALB/c	Egy gyakran használt laboratóriumi egértörzs
BCA	Bicinkoninsav
BRCA1	Mellrák gén 1 (Breast Cancer Gene 1)
BRCA2	Mellrák gén 2 (Breast Cancer Gene 2)
CALCI	Kalcipotriol
CD4 ⁺	Differenciálódási klaszter 4 pozitív sejtek
cDNS	Komplementer dezoxiribonukleinsav
CTL	Kontroll csoport
DNase	Dezoxiribonukleáz
DNS	Dezoxiribonukleinsav
ELISA	enzimhez kötött immunoszorbens próba
FDA	Amerikai Élelmezés és Gyógyszeripari Ügynökség (Food and Drug Administration)
FLG	Filaggrin
GAPDH	Gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
H ₂ O ₂	Hidrogén-peroxid
H&E	Hematoxin-Eozin festés
i.p.	Intraperitoneális injekció
IgE	Immunglobulin E
IL-*	Interleukin
mRNS	Messenger Ribonukleinsav (hírvivő RNS)
NAD ⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NAM	Nikotinamid
PARP	Poli(ADP-ribóz) polimeráz

PARP1	Poli(ADP-ribóz) polimeráz 1
PARP2	Poli(ADP-ribóz) polimeráz 2
PARP5a	Poli(ADP-ribóz) polimeráz 5a (Tankiráz 1)
PARP5b	Poli(ADP-ribóz) polimeráz 5a (Tankiráz 2)
PBS	Foszfátbufferolt sóoldat
pH	Hidrogénion-koncentrációt jelző érték (potential of Hydrogen)
PCR	Polimeráz láncreakció
qPCR	Kvantitatív polimeráz láncreakció
RT	Reverz transzkripció
RT-qPCR	Reverz transzkripciót követő kvantitatív polimeráz láncreakció
RNS	Ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigéngyökök (Reactive Oxygen Species)
RUCA	Rucaparib
TAL	Talazoparib
Taq	Thermus aquaticus
Th	T-helper sejtek
Th2	2-es típusú T-helper sejtek
Th22	22-es típusú T-helper sejtek
TMB	3,3',5,5'-tetrametil-benzidin
TNF- α	Tumor nekrozis faktor alfa
TSLP	Thymic Stromal Lymphopietin
UV	Ultraibolya sugárzás
VEH	Vivőanyag
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

1. Bevezetés

1.1. A humán bőr felépítése

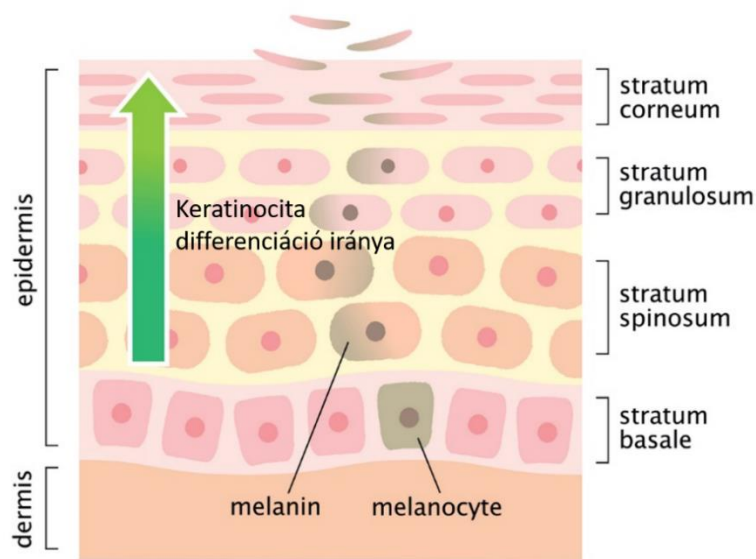
A bőr az emberi test legnagyobb szerve, mely a test teljes felszínét beborító szövetréteggként szolgál. Számos funkcióval rendelkezik, beleértve a mechanikus, fizikai, kémiai védelmet, a test élettani szabályozását és az érzékelést is. Biztosítja a hő- és vízháztartás egyensúlyát a verejtéktermelés és az erek tágasságának szabályozása révén. Részt vesz az immunvédekezésben, továbbá érzékszervi funkciókat is ellát, mivel speciális idegvégződésesei érzékelik a hőmérsékletet, a nyomást és a fájdalmat.¹

A bőr szerkezetileg három rétegből épül fel, melyek a következők: epidermisz (hám), a dermisz (irha) és a zsírszövetben gazdag hipodermisz (bőralja). Ezen rétegek felépítés és funkció szempontjából is eltérőek. A dermisz és epidermisz a cutis-t, míg a hipodermisz a subcutis-t alkotja. A bőr vastagságát az anatómiai régió befolyásolja.¹ (1.ábra)

1.1.1. Epidermisz

Az epidermisz a bőr legkülső rétege egy többrétegű, elszarusodó laphám, mely leginkább keratinocita sejtekből áll, melyek folyamatos proliferációs és differenciációs cikluson mennek keresztül. Az epidermisz öt különböző réteggént különíthető el. A dermisz felőli első réteg a legmélyebb réteg, a bazális (stratum basale), más néven germinatív réteg. Itt találhatóak a folyamatosan osztódó keratinociták és a melanociták, amelyek által termelt pigmentek védelmet nyújtanak az ultraibolya (UV) sugárzással szemben.¹ A bazális réteget követi a „tüskés réteg” (stratum spinosum), ahol a dendritikus sejtek és Langerhans sejtek találhatóak, melyek az immunválasz kialakításában vesznek részt. Majd ezt követi a „szemcsés réteg” (stratum granulosum), a „világos réteg” (stratum lucidum), valamint a szaruréteg (stratum corneum).² A szaruréteg ún. korneocitákból áll. A korneociták sejtmag nélküli, terminálisan differenciálódott keratinociták, melyek hámlás során folyamatosan leválnak a bőr felszínéről, miközben az alsóbb rétegek felől pótlódnak. A korneociták kis molekulákat, úgynevezett természetes hidratáló faktorokat tartalmaznak, amelyek kis mennyiségű vizet szívnak fel a korneocitákba, ezáltal hidratálják a bőrt. A természetes hidratáló faktorok a hisztidinben gazdag fehérje, az ún. filaggrin lebomlásából származó vízdékony vegyületek, amelyek felelősek a

keratin filamentumok aggregációjáért és ezáltal fenntartják a stratum corneum sejtjeinek merev szerkezetét. Az epidermisz épsége elengedhetetlen ahhoz, hogy a bőr fizikai és kémiai gátként (barrierként) hatékonyan tudjon működni. A lapos szarusejtek téglafalszerűen rendeződnek a lipidben gazdag extracelluláris mátrixban, ezáltal létrehozva a bőr vízálló gátját. A stratum corneum abnormalis parakeratózisa során a keratinociták érési folyamata az epidermisz ezen rétegében hiányos. Ez a kóros állapot megjelenhet pikkelysömörben (psoriasis) vagy laphámsejtes karcinómában. A barrier réteg diszfunkciója, melynek következményeként fokozódik a transepidermális vízvesztés, az atópiás dermatitisz egyik fontos jellemzője.³



1.ábra. A humán bőr felépítése

Forrás: istockphoto.com

1.1.2. Dermisz

Az epidermisz alatt helyezkedik el a dermisz, amely kötőszövetben gazdag és biztosítja a bőr szerkezeti integritását és rugalmasságát. Két rétegre osztható: papilláris és retikuláris dermiszre. A papilláris dermisz laza kötőszövetet, kapillárisokat és érzőidegeket tartalmaz, elősegítve a tápanyagcserét és az érzékelést. A mélyebb retikuláris dermisz sűrű, szabálytalan kötőszövetből épül fel, amelyben verejtékmirigyek, faggyúmirigyek, szőrtüszők, vér- és nyirokerek találhatóak. Ez a réteg fibroblasztokat is tartalmaz, amelyek kollagént és elasztint termelnek. A dermisz legfontosabb alkotóeleme a kollagén, kulcsszerepet játszik a bőr struktúrájának és szilárdságának fenntartásában.⁴

1.1.3. Hipodermisz

A hipodermisz főként zsírszövetből és kötőszövetből áll és hőszigetelést, energiaraktározást, valamint párnázást biztosít az izmok és csontok számára. Ezen kívül összekapcsolja és rögzíti a dermiszt a mélyebb szövetekkel és nagyobb ereket és nyirokereket tartalmaz.⁵

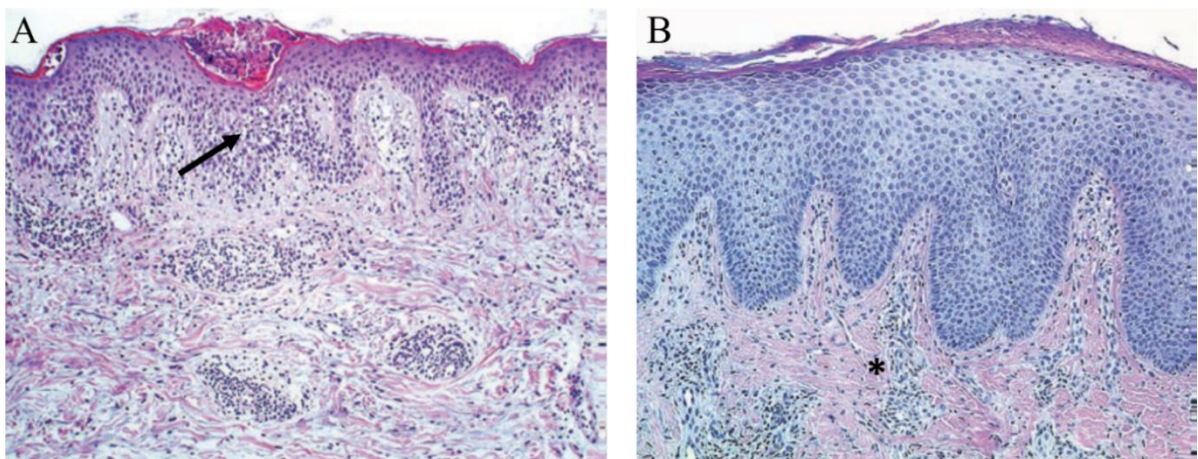
1.2. Atópiás dermatitisz

Az atópiás dermatitisz (AD) az egyik leggyakoribb, krónikusan fennálló gyulladós bőrbetegség, amely különböző környezeti ingerek hatására a bőr hiperreaktivitásával jár. Ez egy időszakos, nem fertőző, viszketéssel járó bőrgyulladás, melyet más néven endogén ekcémának is neveznek. Az ún. 2-es típusú citokinek, mint az interleukin(IL)-4 és IL-13, valamint az IL-17 és az IL-22 a legfontosabb immunológiai faktorok az AD-re jellemző gyulladás kialakításában és fenntartásában. Ezt állatkísérletek és az érintett betegekben történt vizsgálatok is alátámasztják. A betegség etiológiája nem teljesen tisztázott, számos környezeti és genetikai tényező játszik szerepet a kialakulásában.⁶⁻⁷

A „kívülről befelé” modell szerint a bőr barrier funkciójának és a keratinociták differenciálódásának veleszületett defektusai lehetővé teszik antigének behatolását, ami az immunválaszt elindítja (gyulladás, allergiás reakciók). Ezzel szemben az epidermális, „belülről kifelé” elmélet szerint a 2-es típusú segítő T (Th2) sejtek aktiválódása és az azt követő immunológiai láncreakció eredményezi az AD fenotípus kialakulását.⁸

1.2.1. Az AD szövettani jellemzői

Az AD jellemzői az epidermális barrier nem megfelelő működése és száraz bőr kialakulása, melyek következtében a bőrön időről időre gyulladós, viszkető léziók jelennek meg, valamint jellemző az immunglobulin (Ig)E-mediált érzékenység is bizonyos ételekkel és környezeti allergénekkal szemben. Az akut ekcémás léziók szövettani jellemzői közé tartozik az epidermisz sejtjei között megjelenő ödéma (spongiózis), valamint a dermiszben az erek körül kialakuló immunsejtes infiltráció, amely limfocitákból, makrofágokból, dendritikus sejtekből és eozinofil granulocitákból áll. A szubakut és krónikus, a fokozott viszketés következtében kivakart plakkok esetén az epidermisz megvastagszik és annak felső rétege hipertrófiássá válik.⁹ (2.ábra)



2.ábra. Az AD szövettani jellemzői. Az A panelen az akut ekcémás lézióból származó szövettani mintán végzett Hematoxilin és Eozin (H&E) festés alapján jól látható az epidermiszben kialakuló spongiózis (nyíl). A B panel krónikus lézióból származó mintán végzett H&E festés eredményét mutatja, melyen látható az epidermisz jelentős megvastagodása, a csillag pedig a dermiszben a jelentős immunsejtes infiltrációt mutatja.⁹

1.2.2. Az AD epidemiológiája és életminőségre gyakorolt hatásai

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) szerint legalább 230 millió ember szenved AD-ban a világon. Az AD legnagyobb arányban a csecsemőket és gyerekeket érinti, de egyre gyakoribb a felnőttek körében is. Előfordulása hasonló az Egyesült Államokban, Európában és Japánban is és egyre növekvő tendenciát mutat, ahogyan más atópiás betegségek is, mint például az asztma.¹⁰ Előfordulási gyakorisága jelenleg a gyermekek körében 11,3-12,7%, míg a felnőttek esetében 6,9-7,6% közötti értékeket mutat.¹¹

Az AD legnagyobb ismert kockázati tényezője az öröklődő genetikai hajlam. Amennyiben az egyik szülőnél bármilyen atópiás betegség jelen van, a gyermekeknél az AD kialakulásának kockázata 1,5-szeresére nő, ha az egyik vagy mindkét szülő AD-ban szenved, a kockázat akár három-ötszörösére is nőhet. A környezeti kockázati tényezők közül a legfontosabb az alacsony UV-fény expozíció vagy a száraz éghajlati viszonyok, a cukorban és többszörösen telítetlen zsírsavakban gazdag étrend és az 5 éves kor előtti ismételt antibiotikum használat is.¹⁰

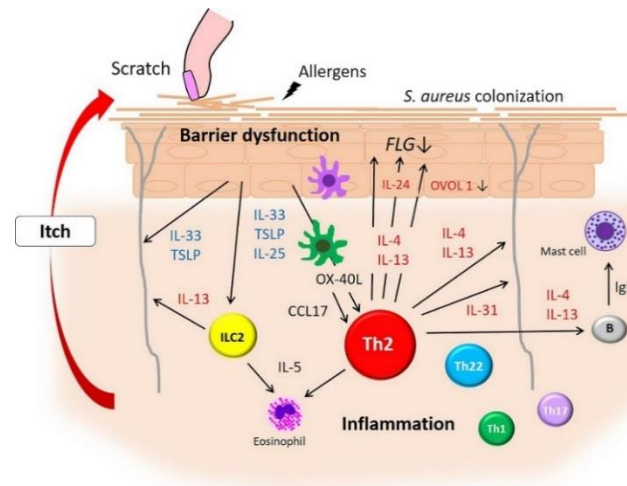
A bőrbetegségekkel küzdő betegek sokféle tünetet tapasztalhatnak, melyek sok esetben kifejezetten hátrányosan érintik mindennapjaikat, jelentősen rontva ezen betegek életminőségét. A bőrszárazság, viszketés és egyéb fizikai tünetei mellett az életminőség romlásában a betegséggel járó esztétikai problémák is szerepet játszanak, hiszen beilleszkedési

zavarokhoz vezethetnek, amely komoly pszichés terhet is jelenthet a betegeknek. Mindemellett a betegség jelentős anyagi terhet is jelent az érintett családok és a társadalom számára is, ugyanis, az egészségügyi ellátás költségei számottevő gazdasági terhelést okoznak.¹²

1.2.3. Kórélettan

Az AD-ben a bőr védőrétege több mechanizmus révén is károsodhat, mint például genetikai tényezők (pl. filaggrin mutáció) és gyulladásos folyamatok. A barrier funkciózavara elősegíti a gyulladás fokozódását, az allergének bejutását, továbbá növeli a fertőzésekre való hajlamot. Továbbá, az epidermális barrier diszfunkciója során megemelkedhet a bőr pH értéke, csökkenhet a vízmegtartó képesség és növekedhet az átteresztőképesség a kis molekulatömegű vegyületek számára. Molekuláris szinten jellemző az epidermális keratinociták csökkent mértékű terminális differenciációja, illetve a bőr megváltozott lipidösszetétele. Az AD-s bőr felszínén a *Staphylococcus aureus* túlsúlya jellemző. Az AD esetén a bőr gyulladása főként a CD4⁺ Th sejtek és dendritikus sejtek aktiválásával jár. Az AD-s léziókban számos gén kifejeződése megváltozik, különösen azok, amelyek a keratinociták és T-sejtek működéséhez kapcsolódnak. A Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) és Th22-sejtek (IL-22) jellemző gyulladásos citokinek szekréciója fokozódik, illetve megnő az ún. „thymic stromal lymphopoetin” (TSLP) expressziója is az AD-s bőrben, ami azon kívül, hogy képes fokozni a Th2 típusú citokinek expresszióját, az AD-re jellemző viszketés kialakításában is fontos faktor. Az IL-4 és IL-13 túlzott termelődése csökkenti az FLG expresszióját, ami a bőr védekező funkciójának károsodásához vezethet.¹³ **(3. ábra).**

A barriert érintő károsodás során ún. alarminok is felszabadulnak, amelyek aktiválják a gyulladásos dendritikus sejteket és elindítják a Th2-sejtek által közvetített gyulladást.¹⁰



3. ábra. Barrier diszfunkció. A keratinociták számos immun-moduláns citokint, például thymic stromal lymphopietint (TSLP), IL-25-öt és IL-33-at állítanak elő. Ezek a citokinek 2-es típusú immunválaszt indukálnak. A 2-es típusú citokinek (IL-4, IL-13) pedig a filaggrin (FLG) expressziójának csökkentésével tovább rontják a barrier funkciót. Ezen felül, ezek a citokinek közvetlenül az idegvégződésekre is hatnak és ezáltal viszketést indukálnak.¹³

IgE, immunglobulin E; Th: segítő T-sejt.

1.2.4. Genetikai tényezők az AD kialakulásában

A filaggrin (FLG) fehérjét kódoló gén az 1q2 kromoszómán. A pro-FLG polimerek proteolitikus hasítás és defoszforiláció következtében FLG monomerekké alakulnak, melyeknek a keratin filamentumok aggregációjában és a stratum corneum kialakulásában van szerepe. A filaggrin bomlása során keletkezett urokánsav és a pirrolidin-karbonsav hozzájárulnak a bőr savas pH-jának fenntartásához és a stratum corneum hidratáltságához.⁷⁻⁸

Az FLG gén null mutációja során a bőr stratum corneum rétege károsodott, jelentősen növelve ezzel az AD kialakulásának kockázatát. A homozigóta FLG mutációk súlyosabb, korábban jelentkező és hosszabb ideig fennálló AD-hez vezethetnek. Az európai népesség körülbelül 10%-a hordozza a heterozigóta mutációt, ami a FLG fehérje mennyiségében 50%-os csökkenést okoz. Fontos megjegyezni, hogy az AD nem csak az FLG mutációkra vezethető vissza. Japán és koreai betegek körében az FLG mutációk előfordulása alacsonyabb, mint a nyugati populációknál. Emellett az FLG-null allélt hordozók körülbelül 40%-ánál nem alakulnak ki az AD tipikus tünetei, továbbá vannak egyének, akik rendelkeznek FLG mutációval és AD-ben szenvednek, viszont idővel kinövik a betegséget.⁷⁻⁸

Az AD megnövekedett kockázata összefüggésbe hozható azon gének polimorfizmusával, melyek a Th2 sejtek jelátviteli mechanizmusának módosulását eredményezik. A 2-es típusú citokin receptorok funkciónyerő polimorfizmusa szintén szerepet játszik az AD folyamatában. A legújabb tanulmányok azt is kimutatták, hogy a D vitamin receptor polimorfizmusai és a citokróm P450 enzimes család (CYP) egyes tagjainak változatai is kapcsolatban állnak az AD-vel.⁷⁻⁸

1.2.5. Klinikai megjelenés és kezelés

Az AD három klinikai szakaszra osztható: csecsemőkori (0-2 éves kor), gyermekkori (3-10 éves kor) és felnőttkori (11 éves kortól 23 éves korig, illetve ennél később megjelenő) fázisokra. Mindegyik stádiumot jellegzetes morfológiai tünetek és testtáji lokalizáció jellemzi, bár az egyes szakaszok között előfordulhatnak átfedések.¹⁴

Az AD-re jellemző tipikus bőrelváltozások, különböző morfológiájú, erythemás, pikkelyes és rendszerint viszkető léziók képében jelennek meg. A betegség általában az első életévben kezdődik, vöröses papulák, foltok vagy plakkok formájában jelentkeznek az arcon, fejbőrön, a törzsön és a végtagokon. Idősebb gyermekeknél elsősorban a hajlatokban jelennek meg a bőrelváltozások, míg felnőtteknél a végtagokon száraz és hámló foltok figyelhetők meg. (4.ábra) A tünetek általában 1-2 hétig tartanak, de az állapot gyakorisága változó lehet. Az időjárási körülmények, allergének és a stressz mind hozzájárulnak a tünetek súlyosbodásához.¹⁵



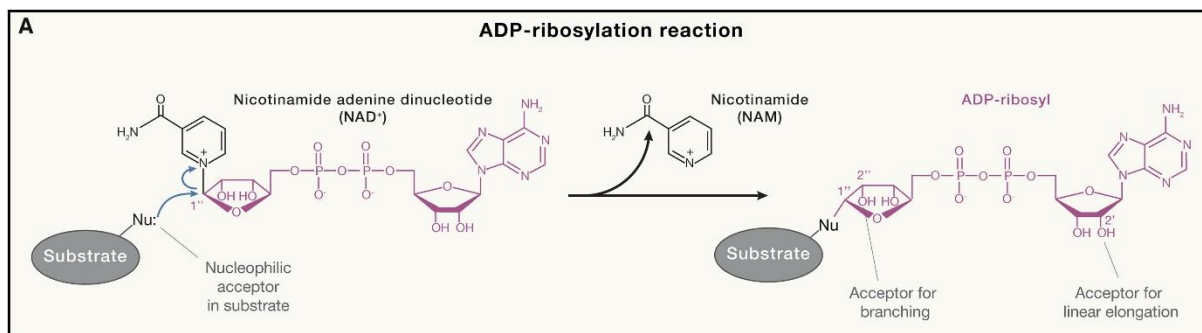
4. ábra. Az AD megjelenése. Az első életévben kialakuló AD-re jellemzőek az erythemás papulák, foltok és plakkok, melyek főként az arcon (A), valamint a törzsön és végtagokon jelentkeznek (B). A C panel az AD-ben szenvedő idősebb gyermekek hajlító felületein megjelenő bőrelváltozásait mutatja,

míg a D panel az AD-ben szenvedő felnőttek végtagjain előforduló száraz, pikkelyes foltokat ábrázolja.¹⁵

Az AD kezelése komplex folyamat. Az AD terápiájában az egyes betegek számára személyre szabott kezelést kell alkalmazni, figyelembe véve a léziók eloszlását és súlyosságát, illetve a beteg életkorát is. A betegség kontrollálásához a fő farmakológiai kezelések mellett fontos a megfelelő bőrápolás, a kiváltó tényezők felismerése és megszüntetése, továbbá a beteg oktatása. A bőrápolás és krémek használata segíthet megőrizni a bőr víztartalmát, ezáltal javíthatja a barrier funkcióját és enyhítheti a viszketést. Egyes esetekben, fényterápia, valamint fiziológiás lipideket, elsősorban különféle ceramidok keverékeit tartalmazó kenőcsök is alkalmazhatóak a megjelenés helyén, melyek a bőr hidratáltságának fokozása révén csökkenthetik az AD tüneteit, elsősorban a viszketést. Amennyiben ezek nem bizonyulnak hatékonyak, gyógyszeres, elsősorban glükokortikoid típusú szteroidokat tartalmazó krémek használatára van szükség. Súlyosabb esetekben szisztémás megközelítést alkalmaznak, melyek gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív hatással bírnak. Ezek közül a takrolimus, a ciklosporin A, szisztémás glükokortikoidok a leggyakoribbak.¹⁶ Ezen szerek azonban nem specifikusan célozzák az AD-ben fennálló immun diszregulációs folyamatokat és komoly mellékhatásaik lehetnek, például máj- és veseelégtelenség. Ennél specifikusabb terápiás megoldásokat kínálnak a biológiai terápiás, például a monoklonális IL-4, -13, -22, -31 receptor elleni antitestek, melyek sok esetben igen hatékonyan tudnak működni, azonban az erős immunszuppresszív hatásuk miatt ezen terápiáknak súlyos mellékhatásaik lehetnek, főként különféle bakteriális, vírusos és gombás fertőzések, illetve a már meglévő tünetek további romlása.¹⁷ Az AD patogenezisének mélyebb megismerése hatékonyabb terápiás megoldásokhoz vezethetne a betegek számára.

1.3. ADP-riboziláció és a PARP enzimesalád

A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimesalád tagjai katalizálják az ADP-ribozilációs poszttranszlációs módosításokat a sejtekben. Ennek során a PARP enzimek nikotinamid-adenin-dinukleotidot (NAD⁺) molekulát hasítanak ADP-ribózra és nikotinamidra, majd az így felszabadult ADP-ribóz egységeket kapcsolják a célfehérjék aminosav (szerin, glutamát, aszparát, arginin, lizin vagy cisztein) oldalláncaihoz. **(5.ábra)** Az ADP-riboziláció folyamata kulcsszerepet tölt be különböző biológiai funkciók szabályozásában, ezek közé tartozik a DNS-hibajavítás, a transzkripció, a sejtmetabolizmus, a mitokondriális funkciók, gyulladáscsökkentő folyamatok, oxidatív stressz és egyes immunsejtek érési folyamatának szabályozása.¹⁸



5. ábra. Az ADP-ribóziláció szabályozásában részt vevő enzimatis aktivitások sematikus ábrázolása. Az ADP-ribóziláció folyamata során a PARP enzimek NAD^+ molekulákat hasítanak, miközben nikotinamid (NAM), ADP-ribóz egységek keletkeznek, amelyeket a PARP-ok a célfehérjék oldalláncjaihoz kapcsolódnak.¹⁹

Az emberi szervezetben már 17, szerkezetileg és funkcionálisan is eltérő PARP enzimet azonosítottak. A PARP-ok két fő kategóriába sorolhatóak az általuk katalizált ADP-ribózilációs folyamattól függően: mono- vagy oligo-ADP-ribózilázok és a poli-ADP-ribózilázok. A PARP1, PARP2 és PARP5a/PARP5b (más néven tankirázok 1 és 2) azok, amelyek ADP-ribóz polimereket szintetizálnak, az enzimsalád többi tagja mindössze egy (mono), vagy max. 8-10 (oligo) ADP-ribóz egységből álló láncot kapcsol a fehérjék megfelelő oldalláncjaihoz. Az ADP-ribóziláció, hasonlóan más poszttranszlációs módosításokhoz, képes befolyásolni a módosított fehérjék biokémiai jellemzőit és funkcióját.^{18, 20}

A PARP család elsőként azonosított tagja a PARP1²¹, mely a sejtekben mérhető poli(ADP-ribóziláció) mintegy 85-95%-áért felelős és aktivitását a DNS törések hibajavítása során mutatták ki először. A PARP2-t mintegy 30 évvel a PARP1 után fedezték fel²² és ez adott lendületet később az enzimsalád többi tagjának azonosításához. A PARP2-nek tulajdonítják a sejtek teljes poli(ADP-ribóz)iláz aktivitásának 5-15%-át. A PARP1-hez hasonlóan a PARP2 elsődleges aktivátora is a DNS molekula károsodása.²³

1.4. PARP inhibitorok

1.4.1. A PARP inhibitorok hatásmechanizmusa daganatokban

A PARP1 és PARP2 tehát kulcsfontosságú szerepet játszik elsősorban az egyszálú DNS-törések hibajavítási folyamatában. Képesek felismerni a DNS-törések helyét és a DNS molekulához kötődve ADP-ribóz polimereket szintetizálnak, saját magukon vagy hiszton fehérjéken és ezáltal odavonzzák a DNS hibajavításban résztvevő enzimeket, faktorokat, végső soron beindítva a hibajavítási útvonalat. A 2000-es évek elején jöttek rá a kutatók arra, hogy amennyiben a sejtekben az egyszálú DNS-törések javítási mechanizmusa nem megfelelően működik (pl. a PARP aktivitás elégtelensége miatt), akkor a sejtek egy másik hibajavítási folyamatot, az ún. homológ rekombinációs javítási útvonalat indítják be, ezáltal biztosítva a sejtek túlélését.²⁴

A homológ rekombinációs hibajavítási folyamatban kiemelkedő szerepe van a BRCA1 és BRCA2, az ún. „emlődaganat hajlammal összefüggő” gének által kódolt fehérjéknek.²⁵ A 2010-es években derült ki, hogy az emlő- és petefészek-daganatoknak kb. 30-50%-ában a BRCA1/2 gének mutációja és ezzel együtt a homológ rekombinációs folyamatok diszfunkciója fordul elő.²⁶ Így ezekben a BRCA1/2 mutáns daganatsejtekben a PARP inhibitorok alkalmazása a sejtekben instabilitást, a sejtciklus megállását és végül sejthalált okoz. Ezt a jelenséget szintetikus letalításnak nevezik, melynek felismerése vezetett oda, hogy az amerikai Élelmezés és Gyógyszeripari Ügynökség (Food and Drug Administration - FDA) a közelmúltban már négy PARP inhibitor, az olaparib (Lynparza; AstraZeneca), niraparib (Zejula; Tesaro), rucaparib (Rubraca; Clovis Oncology) és talazoparib (Talzenna; Pfizer), alkalmazását hagyta jóvá BRCA1/2 mutációval rendelkező emlő- és petefészekrák klinikai terápiájában.²⁷⁻²⁸ Ezekről a PARP inhibitorokról lényeges kiemelni, hogy a PARP1-et és PARP2-t egyformán gátolják, ami nem meglepő, hiszen a két enzim katalitikus doménje mintegy 60%-os szekvencia homológiát mutat.²⁹ A daganatterápiában ez az együttes gátlás nem előnytelen, figyelembe véve, hogy a PARP1 és PARP2 szerepe a DNS hibajavításban nagymértékben hasonló.

1.4.2. A PARP inhibitorok hatásai nem-onkológiai kórképekben

A PARP inhibitorok klinikai elérhetősége megnyitotta a kapukat az olyan törekvések előtt, amelyek ezeket a szereket nem-onkológiai betegségek kezelésében is szeretnék kipróbálni. Különösen olyan esetekben, ahol a DNS károsodás és a gyulladásos folyamatok jelentős szerepet játszanak a kórkép kialakulásában és lefolyásában.³⁰

Azt már a 90-es évek végén a PARP inhibitorok első generációs tagjainál is felismerték, hogy a PARP aktivitás gátlása gyulladáscsökkentő hatással bír³¹, ez még jóval azelőtt történt, hogy a PARP-ok daganatterápiái jelentőségét felfedezték volna.

Ugyanis a PARP-ok túlzott aktivációja fokozhatja a gyulladásos mediátorok (pl. TNF- α , IL-1 β és IL-6) termelődését.¹⁸ Ez történhet pl. nagymértékű oxidatív stressz során, amikor reaktív oxigén- és nitrogéntartalmú gyökök (ROS, RNS) halmozódnak fel és kiterjedt DNS károsodást okoznak.³² A PARP-ok hiperaktivációja emellett elfogyaszthatja a sejtek NAD⁺ készleteit, ami az ATP-szint kimerüléséhez és ebből adódóan energiadeficithez vezethet a sejtekben, ami akár nekrozist, a gyulladásos sejthalált idézheti elő. Ilyenkor a sejtekben felhalmozott károsító anyagok a környező szövetekbe jutnak, ahol további károsodást és gyulladásos reakciót váltanak ki.³³

Számos gyulladásos folyamatban kimutatták PARP aktivációt és az ADP-riboziláció jelenlétét. Ennek megfelelően, sorra nőtt azoknak a tanulmányoknak a száma, amelyek kísérletes állatmodellekben a PARP inhibitorok gyulladáscsökkentő hatását mutatták meg. Ezek közé tartoznak a teljesség igénye nélkül neurológiai betegségek (sztrók, neurotrauma, neurodegeneráció), szeptikus sokk, akut máj elégtelenség, miokardiális infarktus, artritisz, kólitisz, asztma, valamint érrendszeri problémák, pl. cukorbetegség szövődményeként, és atheroszklerózis esetén.³⁰ Ezekon kívül, munkacsoportunk nemrégiben a PARP inhibitorok, elsősorban a talazoparib és rucaparib, jótékony hatását mutatta ki egy gyakori gyulladásos bőrbetegség, a pikkelysömör egy egérmodelljében.³⁴ Szintén egy újabb tanulmány az ADP-riboziláció növekedésének mértékét mutatta meg AD-s betegek léziós bőrén.³⁵

2. Célkitűzés

Az AD egy krónikus, gyulladásoos bőrbetegség, amely számos genetikai, környezeti és immunológiai tényező hatására alakul ki és jelentős negatív hatással van az érintett betegek életminőségére.

Az AD patomechanizmusa pontosan még nem tisztázott, a PARP enzimek, főképp a PARP1 és PARP2, kiemelkedő szerepet töltenek be DNS károsodások hibajavítási folyamataiban, továbbá ezek aktivitásának gátlása daganatos kezelésekben már jól ismert citotoxikus hatást fejt ki. Így ma már négy PARP inhibitor kapta meg az FDA engedélyét daganatterápiás indikációban.

Ezen felül, megnövekedett PARP aktivitást számos gyulladásoos folyamatban is leírtak, mind állatmodellekben, mind humán betegekben. Ezzel összhangban, az elmúlt 25 évben a PARP inhibitorok gyulladásooscsökkentő hatását számtalan tanulmány mutatta meg.

Munkacsoportunk adatai és más irodalmi adatok arra utalnak, hogy a PARP aktivitás fokozódása hozzájárulhat a bőrben kialakuló krónikus, gyulladásoos állapotokhoz, mint például a pikkelysömör vagy az AD.

Ezek alapján munkánk során arra kérdésre kerestük a választ, hogy

- 1. Hogyan befolyásolják a PARP inhibitorok az AD-re jellemző gyulladást egerekben?**
- 2. Milyen hatást gyakorol a talazoparib a kalcipotriol hatására megemelkedett gyulladásoos mediátorok szintjére a bőrben?**
- 3. Hogyan befolyásolják a PARP inhibitorok a Th2 típusú citokinek gén- és fehérjeexpresszióját az AD modellben?**

A PARP inhibitorok klinikai elérhetősége lehetővé teszi, hogy a daganatterápián felül új, nem-onkológiai betegségekben is kipróbálásnak vegyék alá őket. Eredményeinkkel így nemcsak a PARP inhibitorok egy lehetséges új indikációját mutathatjuk meg, hanem az AD terápiájában is új célpontok azonosításához járulhatunk hozzá.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti egerek

Kutatásaink során BALB/c egértörzset használtunk, amelyeket a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Élettudományi Épületének Kísérleti Állatházában (nyilvántartási szám: III/4-KÁT/2015) voltak tenyésztve és fenntartva. Az állatok standard méretű ketrecekben kerültek elhelyezésre ($365 \times 207 \times 140$ mm, 530 cm^2 felület; 1284 L Eurostandard II. típus, Techniplast gyártmány), amelyeket Lignocel Select Fine (J. Rettenmaier und Söhne) alommal béleltünk ki. A környezeti gazdagítás érdekében az állatok számára papírhengereket biztosítottunk.

Az állatházban a világítási ciklusok szigorúan ellenőrzöttek voltak, az állatok 12-12 órás sötét-világos periódusokban váltakozva voltak tartva. A hőmérséklet $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ -on volt stabilizálva. Az egerek számára szabad hozzáférést biztosítottunk mind a táplálékhoz, mind a sterilizált csapvízhez. A ketrecek tisztítása és az alom cseréje hetente, azonos időpontban történt. Az állatház folyamatos állatorvosi felügyelet mellett működik és SPF (specifikus kórokozómentes) minőségű részleggel is rendelkezik.

3.2. Kalcipotriol által indukált AD modell

Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) által jóváhagyott engedély alapján végeztük (nyilvántartási szám: 5/2023/DEMÁB), a hatályos jogszabályok, kormányrendeletek és az Európai Unió állatjóléti irányelveinek megfelelően.

A kísérletekhez 8-16 hetes hím egereket használtunk. A vizsgálatok során az állatokat elkülönítve helyeztük el, biztosítva ezzel a megfigyelések pontos végrehajtását és a kísérleti eredmények megbízhatóságát. Két nappal a kísérlet megkezdése előtt az állatok hátán egy kb. 2 cm^2 -es területről a szőrt borotva, majd azt követően kereskedelmi forgalomban kapható Veet szőrtelenítő krémmel távolítottuk el, a gyártói utasításokat követve. Az egerek minden nap $200 \mu\text{l}$ intraperitoneális (i.p.) injekciót kaptak vagy vivőanyagból (VEH) (4% dimetil-szulfoxid, 5% polietilén-glikol 300 foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) oldva) vagy a következő PARP-inhibitorok valamelyikéből: talazoparib (S7048) oldat ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{nap}^{-1}$)³⁶, az irodalomban korábban alkalmazott hasonló dózistartomány alapján; rucaparib (S4948) ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{nap}^{-1}$)³⁷

oldat (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA). Az injekció beadása után 1 órával az egerek szörtelenített bőrére 40 µl MC903 oldatot (kalcipotriol; 2700, Tocris Bioscience/Bio-Techne/R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; 4 nmol kalcipotriol 96%-os etanolban oldva) vagy 40 µl tiszta 96%-os etanolt vittünk fel hét egymást követő napon. Ilyen módon összesen négy kezelési csoportot alakítottunk ki az állatokból: 1. VEH i.p. injekció + CTL etanollal kezelt; 2. VEH i.p. injekció + kalcipotriollal (CALCI) kezelt; 3. rucaparib (RUCA) i.p. injekció + CALCI-val kezelt; 4. talazoparib (TAL) i.p. injekció + CALCI-val kezelt. A kísérlet nyolcadik napján az egereket túllátásos módon termináltuk és a kezelt bőrfelületekből mintákat vettünk további vizsgálatok céljára.

3.3. Egérbőr minták szövettani vizsgálata

A vizsgálat során a BALB/c egerekből kimetszett és paraffinba ágyazott szövetminták elemzéséhez hematoxilin-eozin (H&E) festési eljárást alkalmaztunk. Ez a módszer az egyik legelterjedtebb és legszélesebb körben használt festési technika a szövettani gyakorlatban, amely lehetővé teszi a szövetrészek sejtjeinek és struktúráinak mikroszkópos vizsgálatát.

A magfestési eljárások alapja, hogy a bázikus festékek ionos kölcsönhatás révén kötődnek a DNS-hez. Az oxidált hematoxilin alumíniumsókkal alkotott komplexe kék színű, bázikus jellegű pácfestéket hoz létre, amely a sejtmagokat festi meg. Az eozin az extracelluláris mátrixot és a citoplazma savanyú komponenseit rózsaszínre festi, így kontrasztos képet biztosít a szöveti mintázatok megkülönböztetéséhez.

A H&E festési eljárás során először a metszeteket deparaffinoztuk, majd rehidráltuk sorozatos apoláros, majd poláros oldószerekkel történő öblítéssel (xilol, 96%-os etanol, 70%-os etanol, acetone, majd desztillált víz). Ezután következett a magfestés 10 percig hematoxilinnel, majd öblítés után 0.1% eozin-oldattal 1 percig festettük a metszeteket. Ezt követően a metszeteket víztelenítettük etanol hígítási sorozattal, majd acetonos és xilolos áztatással. A víztelenített metszeteket lefedtük és hagytuk megszáradni.

További vizsgálatokhoz a festett metszeteket a PANNORAMIC konfokális szkennelővel (3DHISTECH Ltd, Budapest, Magyarország) digitalizáltuk. A szkennelést követően a metszetek elemzése a Windows 11 operációs rendszeréhez készült SlideViewer 2.8 szoftverrel (3DHISTECH Ltd.) történt, amelyet az egérbőr epidermisz vastagságának mérésekor is alkalmaztunk.

3.4. Citokinek és kemokinek expressziós mintázatának vizsgálata egérbőrben

Az egérbőr mintákat közvetlenül a kimetszés után folyékony nitrogénbe helyeztük, majd -80 °C-on tároltuk a további vizsgálatokig. Az extrakciót megelőzően a szöveteket PBS-sel lemostuk és az egyes minták tömegét megmértük. A homogenizációhoz minden mintát tízszeres mennyiségű proteázgátló koktélt (S8830, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) tartalmazó PBS-oldatba helyeztünk. A szövetek roncsolását és a fehérjék kinyerését TissueLyser II készülékkel (Qiagen, Hilden, Németország) végeztük 5 mm átmérőjű rozsdamentes acélgyöngyök használatával. A mintákat 30 hertz frekvencián, 8 percen át homogenizáltuk a készülékben. Ezt követően a homogenizátumokhoz 1 % Triton X-100 oldatot adtunk, majd 5 percen keresztül, 10000 x g-n, 4 °C-on centrifugáltuk, hogy eltávolítsuk a sejttörmelékét és a megmaradt szövetdarabokat. Az így kapott felülúszót használtuk további elemzésekre. A fehérjekoncentrációt a mintákban Pierce BCA protein assay kit (23225, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg.

A minták citokin és kemokin profiljának meghatározásához Proteome Profiler Array (No. ARY006, R&D Systems/Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) kitet használtunk. Ehhez a különböző kezelési csoportok mintáiból azonos mennyiséget véve a csoportok mintáit egyesítettük és az ilyen módon kapott mintákat alkalmaztuk az array membránokon. Az elemzést a gyártó által biztosított protokollnak megfelelően végeztük el. A kit nitrocellulóz membránjai specifikus antitestekkel impregnált pontokat tartalmaztak, amelyek lehetővé tették több különböző citokin és kemokin egyidejű kimutatását az egyes mintákban.

Az immunblot reakciókat a membránon ChemiDoc Touch Imaging System készülékkel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) detektáltuk. A képanalízist a CellProfiler 3.1.5 szoftverrel végeztük.³⁸

Az előhívott membránok képein a különböző citokineknek megfelelő pontokat a kithoz mellékelt referencia sablon segítségével azonosítottuk. A foltok elrendezését manuálisan korrigáltuk a pontos illeszkedés érdekében. A szabad területeket szegmentáltuk és a foltok méretét 3 pixellel növeltük, hogy a szélek egyenetlenségeit kijavítsuk. A mért citokin jelek intenzitását a finomított foltok körüli területeken mértük.

3.5. Citokin expresszió mérése az egerek bőrmintáiban ELISA módszerrel

Az egerek bőrszöveti homogenizátumaiból származó fehérjemintákban IL-4 szintjét kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit alkalmazásával mértük meg: Mouse IL-4 ELISA Kit – Quantikine (M4000B; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A mikrotiterlemezek előre be voltak vonva egér IL-4 specifikus antitestekkel. A standard görbéhez és a minták előkészítéséhez a kitben biztosított hígító puffert használtunk. A mérést a kit technikai útmutatója szerint végeztük el.

A mintákat kétszeresére hígítottuk, hogy minimalizáljuk a mátrix hatásokat. A hígított mintákat és standardokat az ELISA lemez megfelelő vályúiba adagoltuk, majd 90 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Az inkubációt követően a lemezeket kétszer mostuk mosópufferrel.

A mosási lépések után minden vályúba biotinnal jelzett másodlagos antitest oldatot pipettáztunk, majd ezt további 60 perces inkubáció követte (37°C-on). Ezt követően a nem kötődött komponenseket mosással (3x) eltávolítottuk. Majd peroxidáz-enzimmel konjugált streptavidint adagoltunk a vályúkba és 37 °C-on 30 percig inkubáltuk.

Az enzimreakciót H₂O₂ és tetrametilbenzidin (TMB) oldat egyenlő arányú keverékével indítottuk el, amely színreakciót eredményezett. A reakciót kénsav hozzáadásával állítottuk le, majd az abszorbanciát azonnal megmértük 450 nm hullámhosszon spektrofotométerrel. A citokin koncentrációkat a standard görbék alapján számítottuk ki és az eredményeket pikogramm per milliliter (pg/ml) egységben adtuk meg.

3.6. RNS-izolálás és RT-qPCR

Az egerbőrből származó szövetmintákból TRIzol reagens (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) használatával izoláltunk RNS-t. Minden mintához 1 ml TRIzol reagenst adtunk. A szövetminták homogenizálását TissueLyser II készülékkel (Qiagen, Hilden, Németország), 5 mm-es acélgyöngyöket használva, 30 Hz frekvencián, 8 percen át végeztük. Ezt követően a mintákat 15.000 rpm-en, 4 °C-on, 15 percig centrifugáltuk a törmelék eltávolítása érdekében. A felülúszót tiszta csövekbe pipettáztuk, majd mintánként 200 µl kloroform hozzáadásával végeztük el az RNS extrakcióját, 15.000 rpm-en, 4 °C-on, 10 perces centrifugálással segítve a fázisok elkülönülését. A felső vizes fázisokat ismét tiszta csövekbe pipettáztuk, majd 500 µl izopropanolt adtunk a mintákhoz, amellyel az RNS-t kicsaptuk az oldatokból. Az RNS-t centrifugálással pelletáltuk a mintákban (15.000 rpm, 4 °C-on, 30 perc),

majd a pelletet háromszor mostuk 96%-os etanollal, végül levegőn megszáritottuk és nukleáz-mentes vízben feloldottuk.

Az RNS minták koncentrációját és tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg. Az izolált RNS-t Ambion DNase I (Thermo Fisher Scientific, AM2222) enzimmel kezeltük, hogy az esetleges genomikus DNS-szennyeződésekeltávolítsuk. Az RNS minták reverz transzkripciójához 1 µg RNS-t High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével írtuk át cDNA-sé.

Az RT-qPCR-t TaqMan próbákkal és TaqMan Gene Expression Master Mix protokollal (4369016, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) végeztük LightCycler 480 Real-Time PCR készülékben (Roche Applied Science, Basel, Svájc). A génexpressziós értékek megállapításához a gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) expresszióját alkalmaztuk normalizálási kontrollként. A mérések során alkalmazott próbákat az **1. táblázat** tartalmazza.

Gén neve	Assay próba
IL-4	Mm00445259_m1
IL-13	Mm00434204_m1
GAPDH	Mm99999915_g1

1.táblázat. *A kutatás során alkalmazott TaqMan próbák és vizsgált gének*

3.7. Statisztikai analízis

Az adatok kiértékeléséhez a GraphPad Prism 9.1.2. szoftvert (GraphPad Software, San Diego, USA) használtuk. Az elemzési folyamat első lépésében az adatok normál vagy lognormál eloszlását Shapiro–Wilk-teszttel vizsgáltuk. Amennyiben két csoport adatait kellett összehasonlítani, normál eloszlás esetén független, kétmintás t-próbát végeztünk. Abban az esetben, ha az adatok nem normál eloszlásúak voltak, a Mann–Whitney-féle U-tesztet használtuk statisztikai vizsgálatra.

Több csoport összehasonlításánál a statisztikai módszer kiválasztását szintén az adatok eloszlása határozta meg. Normál eloszlás esetén egyutas variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk, majd a csoportok közötti különbségek pontosabb értékelése érdekében Tukey-féle post-hoc tesztet hajtottunk végre. Ha az adatok eloszlása nem normál volt, Kruskal–Wallis-

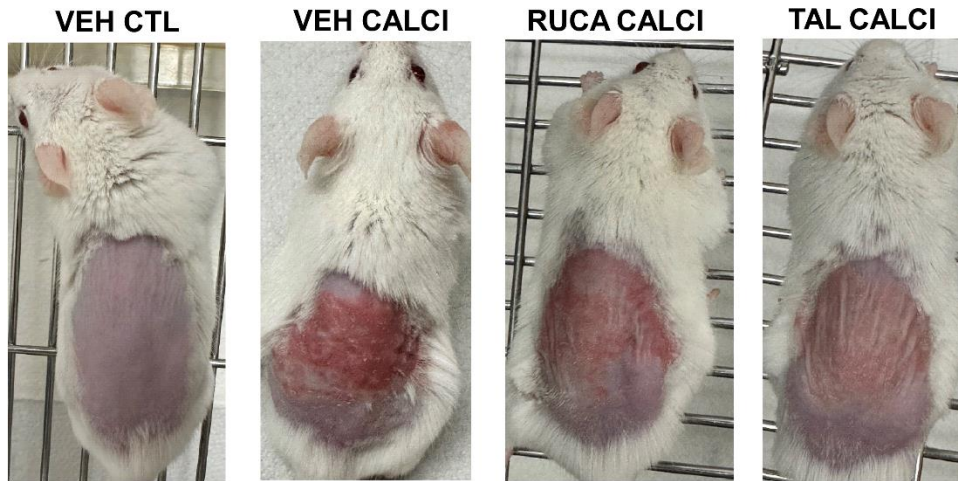
próbát alkalmaztunk, amelyet Dunn- vagy Dunnett-teszt egészített ki az egyes csoportok közötti eltérések megállapítására. Az egyes csoportok összehasonlításában a statisztikai különbséget $p < 0,05$ értéknél határoztuk meg.

4. Eredmények

Kutatásunk során a klinikailag is alkalmazott PARP-inhibitorok (rucaparib és talazoparib) hatásait vizsgáltuk az AD kalcipotriol által indukált egérmodelljében. Kísérleteinkben szövettani vizsgálatokat végeztünk, illetve az AD gyulladásos folyamataiban kiemelkedő jelentőségű citokinek expresszióját vizsgáltuk, mind gén, mind fehérjék szintjén.

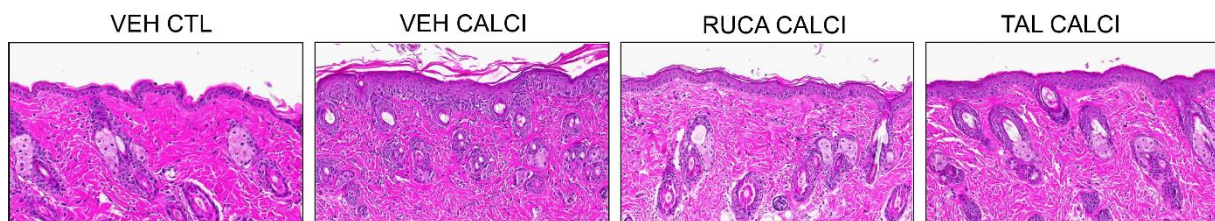
4.1. A PARP inhibitorok hatására mérséklődtek a kalcipotriol által indukált AD bőrtünetei

Két, klinikai gyakorlatban használt PARP inhibitor, a rucaparib és a talazoparib hatását a kalcipotriol által indukált AD modellre BALB/c egerekben vizsgáltuk. A kezeléseket 7 napon keresztül, naponta egyszer végeztük el, melynek során az egereket először intraperitoneálisan beinjekcióztuk vagy rucaparib- (RUCA), vagy talazoparib-tartalmú (TAL), vagy hatóanyag nélküli oldószerrel (VEH). Körülbelül egy óra elteltével pedig az egerek szőrtelenített hátbőrét vagy 96%-os etanollal (CTL), vagy 96%-os etanolban oldott kalcipotriollal kezeltük. A kalcipotriol a kezelés nyolcadik napján a VEH CALCI csoporton illusztrálva jól látható gyulladásos tüneteket okozott a VEH CTL csoporthoz viszonyítva. Nevezetesen, a kezelt bőrfelület megvastagodása, keményedése, szárazsága, illetve a jelentős mértékű erythema, vagyis vörösség, melyek a humán AD tüneteire emlékeztetnek (**6. ábra**). Az ábrán az is látható, hogy azokban az egerekben, amelyek i.p. injekcióban rucaparibot vagy talazoparibot kaptak a kalcipotriolos kezelés mellett (RUCA CALCI, illetve TAL CALCI), jóval kisebb mértékben figyelhetők meg az előbb sorolt tünetek.



6. ábra. PARP inhibitorok alkalmazása mellett a kalcipotriol enyhébb tüneteket váltott ki az egerek bőrén. Az AD-re jellemző bőrtüneteket BALB/c egerekben naponta egyszer 4 nmol kalcipotriollal történő kezeléssel indukáltuk hét napon keresztül. A tiszta 96%-os etanolos (CTL) vagy kalcipotriolos helyi kezelés (CALCI) mellett az egerek naponta i.p. injekcióban vagy hatóanyag nélküli oldószert (VEH), vagy rucaparibot (RUCA) ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{nap}^{-1}$), vagy talazoparibot (TAL) ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{nap}^{-1}$) kaptak ($n=2-7$). A felvételek kísérlet nyolcadik napján készültek.

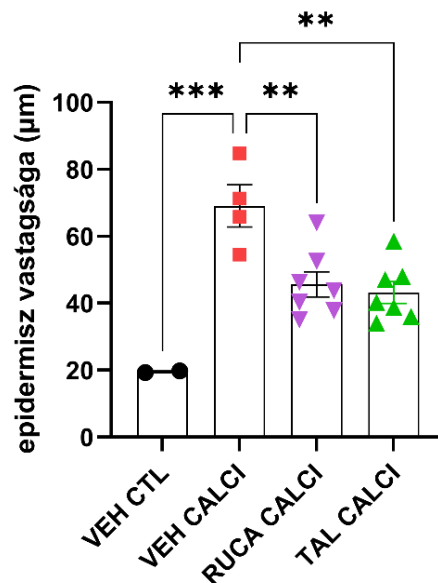
A vizuálisan megfigyelhető tüneteket a kezelt bőrminták szövettani vizsgálatával is megerősítettük. A paraffinba ágyazott minták metszetein hematoxinil és eozin (H&E) festési eljárást alkalmazva jól látható a VEH CALCI csoportban az epidermisz jelentős megvastagodása, a bazális réteg keratinocitáinak megnövekedett mértékű proliferációja, illetve a dermiszben értágulatok és nagyszámú immunsejtek beszűrődése figyelhető meg (**7.ábra**). Ezzel szemben, ahogy az makroszkópiusan is látszott, a RUCA CALCI és TAL CALCI csoportban az epidermisz vastagodása jóval kisebb mértékű, illetve kisebb számban láthatóak beszűrődött immunsejtek a dermiszben (**7. ábra**).



7. ábra. Az ábrán a kísérletben használt egerek kezelt bőrfelületéről származó metszetek H&E festése látható egy-egy reprezentatív felvételen, 20x-os nagyításban rögzítve.

Az egerek bőrében az epidermisz megvastagodását kvantitatív módon is kifejeztük, az egyes egerek metszeteinek H&E felvételein az epidermisz hosszanti irányú mérésével. Ahogy az a **8. ábrán** látható, a kalcipotriol mintegy háromszoros növekedést indukált az epidermisz

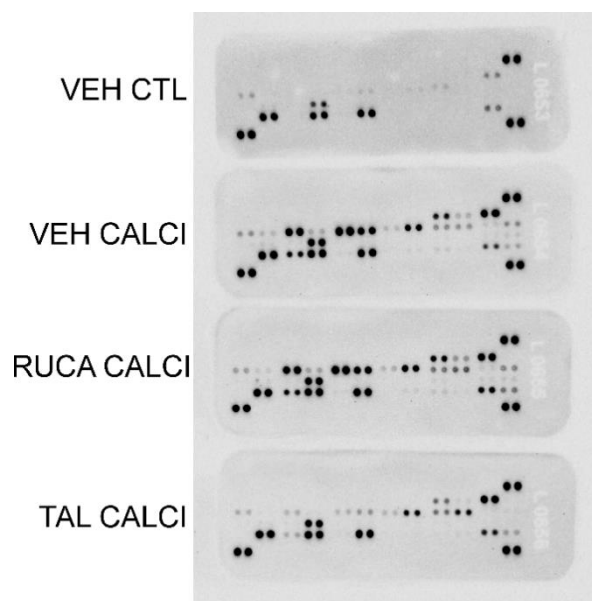
vastagságában a normál kontroll egerekhez (VEH CTL) képest, míg a rucaparibbal vagy talazoparibbal kezelt egerek esetében ez a növekedés kb. kétszeres volt.



8. ábra. A PARP inhibitorok csökkentették a kalcipotriol hatására bekövetkező epidermális megvastagodás mértékét. Az egyes kísérleti csoportokba tartozó valamennyi egér bőrében megmértük az epidermisz vastagságát és az átlagértékeket \pm SEM ábrázoltuk. A statisztikai különbségeket az egyes csoportok között egyutas ANOVA-t Tukey-féle post hoc teszttel kiegészítve határoztuk meg és a szignifikancia értékeket a következő p értékeknél állapítottuk meg: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

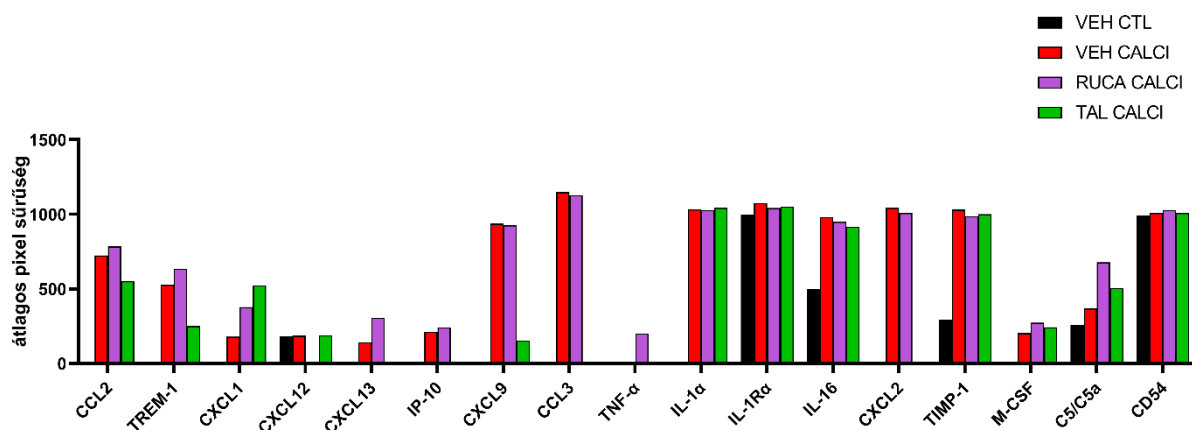
4.2. A talazoparib csökkentette a kalcipotriol hatására megemelkedett gyulladási mediátorok szintjét a bőrben

Először szeretnénk volna egy átfogó képet kapni arról, hogy a kalcipotriol hatására milyen gyulladási citokineknek és kemokineknek változik az expressziója az egerek bőrében és hogy ezt a PARP inhibitorok hogyan befolyásolják. Ehhez minden egér kezelt bőrmintájából fehérjét izoláltunk és az egyes kísérleti csoportokba tartozó egerek fehérjemintáiból azonos mennyiségeket kivéve ún. poolozott, kevert mintákat hoztunk létre, majd egy kereskedelmi forgalomban kapható citokin array kit membránjaira vittünk fel a gyártó utasításainak megfelelően (9. ábra).



9. ábra. A kísérleti egerek bőréből fehérijét izoláltunk, majd az egy csoportba tartozó egerek mintáit összekevertük, majd felvittük a citokin array membránjaira az ábrán látható módon. Az egyes duplikált pontok egy-egy citokin vagy kemokin expresszióját reprezentálják.

Látható, hogy a kalcipotriol számos gyulladási mediátor expresszióját megnövelte a kontroll egerekhez (VEH CTL) képest, míg érdekes módon, főképp a talazoparibbal kezelt egerek esetén látszik csökkenés az egyes mediátorok szintjében. A membránon kifejlődött pontok átmérője, illetve intenzitása arányos az adott mediátor expressziójával a mintákban, ilyen módon kvantifikálható és az egyes csoportok összehasonlíthatóak (**10. ábra**).

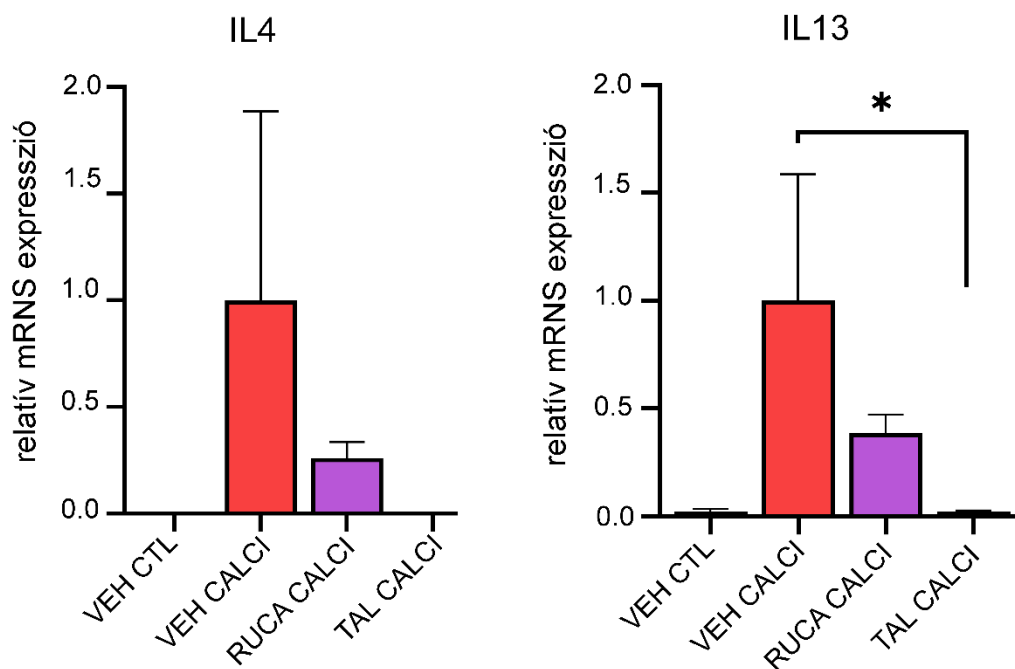


10. ábra. A citokin array membránokon a foltok intenzitását CellProfiler program segítségével határoztuk meg. A citokineket az array kit sablonjának segítségével azonosítottuk.

Ez alapján elmondható, hogy a két PARP inhibitor közül főképp a talazoparib kezelés hatására számos, a kalcipotriol hatására megnövekedett citokinnek és kemokinnek az expressziója csökkent az egerek bőrében.

4.3. Mindkét PARP inhibitor csökkentette a Th2 típusú citokinek gén- és fehérjeexpresszióját az AD modellben

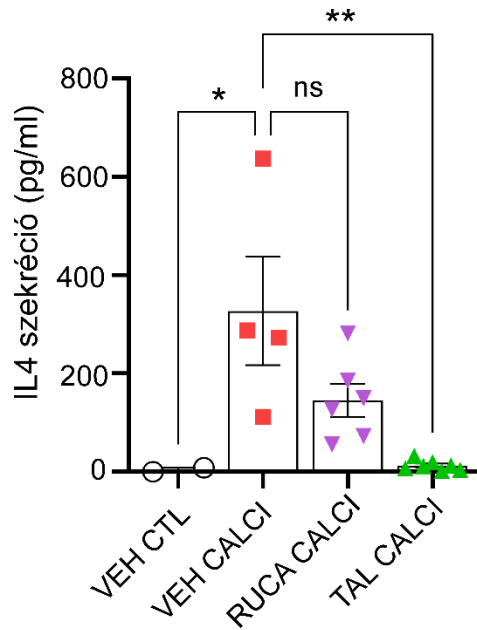
Mivel az AD-re jellemző gyulladás kialakulásában és fenntartásában legfontosabb szerepe az ún. Th2 típusú citokineknek, az IL4-nek és IL-13-nak van, így megvizsgáltuk az egerek bőrében specifikusan ezeknek a citokineknek az expresszióját gén- és fehérjeszinten is.



11. ábra. A PARP inhibitorok csökkentették a Th2 típusú citokinek génexpresszióját a kalcipotriol által indukált AD modellben. A génexpressziós értékek az egyes csoportokba tartozó egerekre kapott normalizált génexpressziók átlaga \pm SEM formában a VEH CALCI csoporthoz viszonyítva vannak kifejezve és ábrázolva. Normalizálási kontrollként az egyes minták GAPDH expresszióját használtuk. A statisztikai különbség megállapítására az egyes csoportok között együttes ANOVA-t használtunk Dunnett-féle post hoc teszttel kiegészítve. A * szignifikancia szint $p < 0,05$ szinten lett meghatározva.

Ebben az esetben viszont megállapítható, hogy mind a rucaparib, mind a talazoparib csökkentette az IL-4 és IL-13 génexpresszióját (11. ábra), illetve az IL-4 fehérje szintjét (12.

ábra) is a bőrben a calcipotriol kezelés mellett csak vehiculum injekciót kapott egerekhez képest.



12. ábra. A PARP inhibitorok csökkentették az IL-4 szintjét az egerek bőrében a calcipotriol által indukált AD modellben. Az IL-4 koncentrációt az egyes egerek bőrből izolált fehérjemintákban ELISA segítségével mértük meg és a koncentrációk átlaga \pm SEM formában fejeztük ki. A statisztikai különbség megállapítására az egyes csoportok között egyutas ANOVA-t használtunk Dunnett-féle post hoc teszttel kiegészítve. A szignifikancia szintek * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ értékeken lettek meghatározva.

Összefoglalva, eredményeink arra utalnak, hogy a PARP inhibitorok képesek csökkenteni az AD kialakulásáért felelős Th2 típusú immunválaszt, ugyanakkor még további vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy lehetséges-e PARP inhibitorokat az AD terápiájában is használni.

5. Megbeszélés

Az AD egy krónikus gyulladásos bőrbetegség, amely különösen gyermekkorban gyakori, azonban felnőtteknél is egyre elterjedtebb és amelyet jelenleg még nem lehet meggyógyítani, csak tünetileg kezelni főleg nem-specifikus gyulladáscsökkentő terápiákkal.³⁹ A betegség patogenezisében kulcsszerepet játszik az epidermális barrier diszfunkciója és a Th2 immunválasz szabályozási zavara, amelyet további genetikai és környezeti tényezők is bonyolíthatnak.³⁹ Mivel a kórkép összetett, multifaktoriális és patomechanizmusa még nem teljesen feltárt, további kutatások szükségesek az új, célzott terápiák kifejlesztése érdekében.

Jelenleg négy PARP inhibitorot használnak a klinikai gyakorlatban daganatterápiás indikációban, ezek az olaparib, rucaparib, niraparib és a talazoparib. Emellett már évtizedek óta ismeretes a PARP inhibitorok gyulladáscsökkentő hatása is, amelyet már számos kórképben leírtak, elsősorban állatmodellek alkalmazásával. Munkacsoportunk nemrégiben írta le az inhibitorok közül a talazoparib jótékony hatását egy másik típusú gyulladásos bőrbetegség, a pikkelysömör egyik legszélesebb körben használt állatmodelljében, az imiquimod által kiváltott dermatitiszben egerekben³⁴, ami azt mutatja, hogy a PARP inhibitorok képesek a bőr gyulladásos folyamataiba beavatkozni *in vivo*. Egy másik tanulmány AD-s betegek léziós bőrén a normál bőrhöz képest nagyobb mennyiségben detektált ADP-ribóz polimereket, ami a PARP aktivitás növekedésére utal AD-ben.³⁵ Ezek alapján kutatásunkban azzal a feltevéssel éltünk, hogy a PARP inhibitorokkal befolyásolhatóak lehetnek az AD-re gyulladásos folyamatok. Az AD egyik ismert modelljét, a kalcipotriol által indukált bőrgyulladást alkalmaztuk BALB/c egerekben és a PARP inhibitorok közül a rucaparibot és talazoparibot választottuk a kísérletekhez, mivel korábban a pikkelysömör modellben is ezeket az inhibitorok találtuk a leghatékonyabbnak. Azt találtuk, hogy mindkét inhibitor hatására az egerek bőrén a kalcipotriol hatására kifejlődött vöröses, megvastagodott, száraz bőrléziók a PARP inhibitorok alkalmazása mellett jóval enyhébb formában alakultak ki. Ezt megerősítette a léziók szövettani képén is az epidermisz láthatóan kisebb mértékű megvastagodása, illetve a dermális immunsejtes infiltráció is kevésbé volt megfigyelhető. Elsősorban a talazoparibbal kezelt egerek bőrén a pro-inflammatorikus citokinek és kemokinek alacsonyabb szintjét detektáltuk egy átfogó citokin array alkalmazásával. Az, hogy a talazoparib esetén nagyobb mértékű hatást tapasztaltunk összhangban van azzal a jól dokumentált ténnyel, hogy a PARP inhibitorok közül a talazoparib a leghatékonyabb.⁴⁰ Viszont mindkét inhibitor szignifikánsan csökkentette az AD-

re jellemző Th2 típusú citokinek, az IL-4 és IL-13 mRNS expresszióját, illetve az IL-4 fehérje szintjét is a kalcipotriollal kezelt bőrben.

Ismert, hogy az AD gyakran társul más atópiás társbetegségekkel, különösen ételallergiával és súlyosabb esetekben asztmával⁴¹, ami tovább bonyolítja a betegség kezelését. Eredményeinket különösen fontos kontextusba helyezi, hogy számos tanulmány kimutatta, hogy a PARP enzimek szerepet játszanak az asztma és az allergiás nátha gyulladásoz folyamatainak szabályozásában és előrehaladásában.⁴² Ennek megfelelően a PARP inhibitorok alkalmazása az asztma állatmodelljeiben terápiás hatásokat mutatott, mivel specifikusan befolyásolta egyes immunsejtek toborzását és modulálta az asztmához kapcsolódó citokinek termelését.⁴² Ezért a PARP aktivitás gátlása különösen releváns lehet AD esetében, mivel a PARP inhibitorok előnyei kiemelten fontosak lehetnek az olyan AD-s betegek számára, akiknél más atópiás társbetegségek is jelen vannak.

A PARP inhibitorok nem-onkológiai betegségekben való átpozicionálásának lehetősége intenzív kutatás tárgyát képezi.³⁰ Tanulmányunkban rávilágítunk ezeknek a gyógyszereknek az AD-ban való potenciális alkalmazására, szem előtt tartva, hogy még számos megválaszolatlan kérdés van a PARP-ok pontos szerepéről AD-ben, különösen az immunmoduláns hatásaik tekintetében. Így ezeket a folyamatokat jövőbeli vizsgálatainkban fogjuk mélyebben tanulmányozni.

6. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Szántó Magdolnának**, aki lehetőséget biztosított számomra pályamunkám elkészítéséhez. Köszönöm a kutatás során nyújtott szakmai útmutatását, értékes tanácsait, odaadó és segítőkész munkáját, amelyek jelentős mértékben hozzájárultak a munkámhoz.

Köszönetet szeretnék mondani **Prof. Dr. Virág Lászlónak**, az Orvosi Vegytani Intézet igazgatójának, hogy lehetőséget biztosított tudományos munkám elvégzésére az intézetben.

Köszönettel tartozom a **kutatócsoport Tagjainak** is, akik a laboratóriumi munkák során segítettek a mérések kivitelezésében, valamint készséggel válaszoltak kérdéseimre és szakmai tanácsokkal láttak el.

Végül, hálával tartozom családomnak és barátaimnak a folyamatos támogatásukért és biztatásukért.

7. Irodalomjegyzék

1. Proksch E, Brandner JM., Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology*. 2008;17(12):1063–72.
2. Yousef H, Alhaji M, Fakoya AO, Sharma S. *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
3. Murphrey MB, Miao JH, Zito PM. *Histology, Stratum Corneum*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
4. Kolarsick PA, Kolarsick MA, Goodwin C. *Anatomy and physiology of the skin*. *J Dermatol Nurses Assoc*. 2011;3(4):203-213.
5. Sequeira-Martin SM. *Subcutaneous tissue: Composition and clinical significance*. *Dermatol Clin*. 2021;39(2):191-198.
6. Leung DYM, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. *New insights into atopic dermatitis*. *J Clin Invest*. 2004;113(5):651-657.
7. Kim J, Kim BE, Leung DYM. *Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications*. *Allergy Asthma Proc*. 2019;40(2):84-92.
8. Guttman-Yassky E, Waldman A, Ahluwalia J, Ong PY, Eichenfield LF. *Atopic dermatitis: pathogenesis*. *Semin Cutan Med Surg*. 2017;36(3):100-103.
9. Bieber T. *Atopic dermatitis*. *N Engl J Med*. 2008;358(14):1483-1494.
10. Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. *Atopic dermatitis*. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):1.
11. Sarkar R. *Atopic dermatitis*. *Forbes India*. 2021
12. Lifshitz C. *The impact of atopic dermatitis on quality of life*. *Ann Nutr Metab*. 2015;66(Suppl 1):34-40.
13. Nakahara T, Kido-Nakahara M, Tsuji G, Furue M. *Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis*. *J Dermatol*. 2020;48(2):130-139.
14. Nagy G. *Az atópiás dermatitis klinikai jellemzői gyermekkorban*. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle*. 2017;93(4):209-216.
15. Frazier W, Bhardwaj N. *Atopic dermatitis: Diagnosis and Treatment*. *Am Fam Physician*. 2020;101(10):590-598.
16. Lee JH, Son SW, Cho SH. *A Comprehensive Review of the Treatment of Atopic Eczema*. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016;8(3):181-190.

17. Guttman-Yassky E, Nograles KE, Krueger JG. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part II: immune cell subsets and therapeutic concepts. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(6):1420-1432.
18. Langelier M-F, Eisemann T, Riccio AA, Pascal JM. PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification. *Curr Opin Struct Biol*. 2018;53:187-198.
19. Suskiewicz MJ, Prokhorova E, Rack JGM, Ahel I. ADP-ribosylation from molecular mechanisms to therapeutic implications. *Cell*. 2023;186(21):4475-4495.
20. Demény MA, Virág L. The PARP enzyme family and the hallmarks of cancer Part 1. Cell intrinsic hallmarks. *Cancers*. 2021;13(9):2042.
21. Chambon P, Weill JD, Doly J, Strosser MT, Mandel P. On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei. *Biochem Biophys Res Commun*. 1966;25(6):638-643.
22. Amé JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, et al. PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem*. 1999;274(25):17860-17868.
23. Szántó M, Brunyánszki A, Kiss B, Nagy L, Gergely P, Virág L, Bai P. Poly(ADP-ribose) polymerase-2: emerging transcriptional roles of a DNA-repair protein. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(24):4079-4092
24. Saleh-Gohari N, Bryant HE, Schultz N, Parker KM, Cassel TN, Helleday T. Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Mol Cell Biol*. 2005;25(16):7158-7169.
25. Venkitaraman AR. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 20):3591-3598.
26. Mukhopadhyay A, Elattar A, Cerbinskaite A, Wilkinson SJ, Drew Y, Kyle S, et al. Development of a functional assay for homologous recombination status in primary cultures of epithelial ovarian tumor and correlation with sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2010;16(8):2344-2351.
27. Franzese E, Centonze S, Diana A, Carlino F, Guerrera LP, Di Napoli M, et al. PARP inhibitors in ovarian cancer. *Cancer Treat Rev*. 2019;73:1-9.

28. Mateo J, Lord CJ, Serra V, Tutt A, Balmaña J, Castroviejo-Bermejo M, et al. A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. *Ann Oncol.* 2019;30(9):1437-1447.
29. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(7):517-528.
30. Berger NA, Besson VC, Boulares AH, Bürkle A, Chiarugi A, Clark RS, et al. Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases *Br J Pharmacol.* 2018;175(2):192-222.
31. Szabó Cs, Lim LHK, Cuzzocrea S, Getting SJ, Zingarelli B, Flower RJ, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) synthetase attenuates neutrophil recruitment and exerts antiinflammatory effects. *J Exp Med.* 1997;186(7):1041-1049.
32. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 1996;313(Pt 1):17-29.
33. Dombi M. A sokarcú sejthalál és a PARP1 karrierje: A védőenzim is árthat. *Élet Tud.* 2016;71(25):777-779.
34. Molnár et al., *Front Pharmacol.* közlésre elfogadva
35. Arroyo AB, Bernal-Carrión M, Cantón-Sandoval J, Cabas I, Corbalán-Vélez R, Martínez-Menchón T, et al. NAMPT and PARylation are involved in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9):7992.
36. Bellare GP, Patro BS. Resveratrol sensitizes breast cancer to PARP inhibitor, talazoparib through dual inhibition of AKT and autophagy flux. *Biochem Pharmacol.* 2022;199:115024.
37. Murray J, Thomas H, Berry P, Kyle S, Patterson M, Jones C, et al. Tumour cell retention of rucaparib, sustained PARP inhibition and efficacy of weekly as well as daily schedules. *Br J Cancer.* 2014;110(8):1977–84.
38. Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *BioTechniques.* 2007;42(1):71-75.
39. Ständer, S. Atopic Dermatitis. *N Engl J Med.* 2021, 384(12), 1136–1143
40. Curtin NJ, Szabó Cs. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(10):711-736.
41. Paller AS, Spergel JM, Mina-Osorio P, Irvine AD. The atopic march and atopic multimorbidity: many trajectories, many pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(1):46-55.

42. Zaffini R, Gotte G, Menegazzi M. Asthma and poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: A New Therapeutic Approach. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:2817-2825.

Függelék

Önállóan elvégzett kísérletek:

- Állatkísérletek (i.p. injekció és az egerek hátbőrének kezelése, mintavétel)
- Epidermisz vastagságának mérése
- RNS és fehérjeizolálás egérbőrből, az RNS és fehérjeminták koncentrációinak mérése
- cDNS átírása RNS mintákból, kvantitatív PCR

Segítséggel elvégzett kísérletek:

- Citokin array
- ELISA
- Eredmények kiértékelése

Etikai engedélyszám: 5/2023/DEMÁB

Támogatás: Munkánkat a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János kutatói ösztöndíja és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) Fiatal Kutatói (FK134588) pályázata támogatta.

NYILATKOZAT

Alulírott KOVÁCS VIRÁG ZSÓFIA.....(Neptun kód: H59NWD),
a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karának hallgatója ezennel
büntetőjogi felelősségem tudatában nyilatkozom és aláírással igazolom, hogy
A PARP INHIBITOROK HATÁSAINAK VIZSGÁLATA AZ.....
ATÓPIÁS DERMATITISZ EGY EGÉRMODELLJÉBEN.....
című pályamunkám saját, önálló munkám; az abban hivatkozott nyomtatott és
elektronikus szakirodalom felhasználása a szerzői jogok nemzetközi szabályainak
megfelelően készült.

Tudomásul veszem, hogy pályamunka esetén plágiumnak számít:

- szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
- tartalmi idézet hivatkozás megjelölése nélkül;
- más szerző publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Alulírott kijelentem, hogy a plágium fogalmát megismertem. Tudomásul veszem, hogy
plágium esetén pályamunkám visszautasításra kerül.

Debrecen, 2025.....év02.....hó. 24.....nap

Kovács Virág Zsófia.....

aláírás