

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Oxidatív stressz és poli (ADP-ribóz) szerepének vizsgálata melanomákban és diabétesz eredetű proliferatív retinopátiában**

**Dr. Géhl Zsuzsanna**

Témavezető: Prof. Dr. Virág László



**DEBRECENI EGYETEM**  
**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2018**

**OXIDATÍV STRESSZ ÉS A POLI (ADP-RIBÓZ) SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA  
MELANOMÁKBAN ÉS DIABÉTESZ EREDETŰ PROLIFERATÍV  
RETINOPÁTIÁBAN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az Orvostudományi tudományágban

Írta: Dr. Géhl Zsuzsanna

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris orvostudomány doktori iskolája  
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Virág László egyetemi tanár

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

tagok: Dr. Csont Tamás, PhD

Dr. Bak István, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja : Debreceni Egyetem ÁOK, Biofizikai és  
Sejtbiológiai Intézet 2.209 sz. diszkussziós terem  
2018.szeptember 10., 11óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Lekli István, PhD

Dr. Vámosi Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

tagok: Dr. Lekli István, PhD

Dr. Vámosi Péter, PhD

Dr. Bak István, PhD

Dr. Csont Tamás, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati  
Intézet „A” épület tanterme,  
2018. szeptember 10., 13óra

## BEVEZETÉS

Az oxidatív stressz a legtöbb betegség pathogenezisében tetten érhető, és a nyomában aktiválódó DNS törést érzékelő és javító rendszer elemei, mint például a poli (ADP-ribóz) polimeráz (PARP) szintén sok kórfolyamathoz járul hozzá. A disszertáció alapját képező munkákban egyrészt a melanómák poli (ADP-ribóz) (PAR) státuszát és ennek a klinikai-szövetteni stádiumbeosztással megfigyelhető összefüggéseit vizsgáltuk, másrészt a diabéteszes retinopátia folyamatában kerestük a redox diszreguláció üvegtestben jelen lévő jeleit.

### 1. A PAR és PARP gátlók szerepe az onkológiában

A **bőr malignus melanómája** (CM) a legmalignusabb bőrdaganat. Több típusa ismert, leggyakoribb a felszínesen terjedő melanoma (SSM), viszonylag gyakori forma a nodularis melanoma (NM) és a lentigo maligna (LM). Kezelése elsősorban sebészi eltávolítás, áttétek esetén kemoterápia, besugárzás.

Az **uveális melanoma** (UM) a leggyakoribb primer intraokuláris rosszindulatú daganat a felnőtt korosztályban. Az átlagos túlélési idő alacsony, ami a metasztázisok magas arányával magyarázható. Miután a tumor sokáig növekedhet tünetmentesen, a kései felismerés miatt mérete sokszor konzervatív kezelést nem tesz lehetővé, és a műtéti megoldás gyakran a daganatos szemgolyó eltávolítása.

A bőr és uveális melanómák egymástól lényegesen eltérő klinikai lefolyást mutatnak, ami nem meglepő, mivel eltérő a genetikai háttérük, és a metasztatizálásuk módja. A szem immunprivilegizált volta -melyet a metasztatizáló uveális melanoma sejtek is megtarthatnak- szerepet játszhat az eltérő viselkedésben. Számos gyógyszer, mely a bőrmelanomáknál terápiás hatékonysággal bír, az uveális melanómák illetve annak metasztázisa esetén hatástalan. Míg a súlyos, metasztatizáló CM-ban a BRAF mutáció szerepe alapján a BRAF inhibitorok és MEK inhibitorok hatékonyaknak mutatkoztak, addig az UM gyógyszeres kezelése máig sok kívánnivalót hagy maga után. Sajnos napjainkban még nem ismert olyan gyógyszer, ami megnövelné a túlélés esélyét, az onkológiában használt kemoterápiás szerek

itt hatástalanok. Ahhoz, hogy egyéb daganatokhoz hasonlóan sikeres gyógyszeres kezelési lehetőségek váljanak elérhetővé, elengedhetetlen az UM biológiai viselkedésének molekuláris szintű vizsgálata, ismerete.

Számos betegségben jól ismert a reaktív oxigén és nitrogén tartalmú származékok (ROS/RNS) pathogenetikai szerepe. A ROS/RNS okozta szövetkárosodási útvonal egy késői, így klinikai beavatkozásra is elegendő időt (széles terápiás ablakot) engedő lépése a **PAR** metabolizmus fokozódása. A PAR polimer a PARP enzim által képződik, melyet a  $\text{NAD}^+$  molekulákból ADP-ribóz egységeket lehasítva és azokat polimerizálva alakítja ki. Ennek a sokrétű biológiai funkcióval bíró poszttranszlációs fehérjemódosítási folyamatnak szerepet tulajdonítanak a sejthalál, a DNS hibajavítás, a replikáció, a transzkripció és differenciálódás szabályozásában. A PARP aktivációs útvonal a szem patológiájában is fontos szerepet játszik. A PARP legismertebb feladata a genom integritásának fenntartása. A PARP gátlása során károsodik a bázis kivágásos hibajavítás. Bár a poli-ADP-riboziláció DNS hibajavításban betöltött szerepe alapján a mutációk számának fokozódására és daganatképződésre számíthatnánk a PARP gátlása során, kísérletes bizonyítékok állnak rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy PARP gátlószerek csökkentik a tumor kialakulását és a metasztatizálási folyamatot is kedvezően befolyásolják.

A PARP gyógyszeres gátlása a HRR (homologous recombination repair) deficienciával járó BRCA mutációval összefüggésbe hozható daganatokban mutatott effektivitást. Így BRCA mutációval járó ovarium karcinómák esetén már a klinikumban is elfogadott gyógyszeres csoport. Hatása a „szintetikus letalitás” paradigmán alapul. Vagyis, míg normál sejtekben a HRR a DNS hibákat kijavítaná, a homológ rekombináció zavara és a nem homológ DNS-repair gátlásának együttes fennállása a tumorsejtek halálát okozza. A PARP gátlószerek egy új, izgalmas csoportja az onkoterápiás repertoárnak, ugyanakkor a melanómák esetében még kevés a tapasztalat ezen szerek hatékonyságával kapcsolatban. A PARP gátlók többféle protoonkogénnel mutatnak szintetikus letalitást, így a BAP 1 csírvonalbeli mutációja során kialakuló daganatok esetében alkalmazott PARP gátló hatásának vizsgálatában uveális melanómák esetekben is folynak klinikai tanulmányok, míg metasztatizáló bőrmelanómák esetében PARP gátló szert temozolomiddal kombinálva értek el eredményt. A klinikai vizsgálatok sikeréhez, illetve további klinikai vizsgálatok megalapozott tervezéséhez segíthet hozzá a PARP szerepének vizsgálata melanómák esetében. A daganatok PAR tartalmának vizsgálata későbbiekben a PARP gátlókra érzékeny betegcsoport szelektálására is lehetőséget teremt.

## 2. Oxidatív stressz a diabéteszes retinopátia (DRP) kialakulásában

A hiperglikémiától a diabéteszig, illetve a diabéteszes szövődmények, mint a DRP kialakulásában az oxidatív stressznek kiemelkedő szerepe van. Fiziológiásan a szénhidrátok lebontását végző anyagcsere folyamatokban termelődő elektrondonorok szabadgyököket termelnek, amit a szervezet antioxidáns rendszere takarít el. Azonban a glükóz vérszintjének emelkedése esetén ez az egyensúly felborul, oxidatív stressz jön létre. Ebben a folyamatban kiemelkedő szerepet játszik az ún. **AGE (advanced glycation endproducts)** vegyületcsoport. Ezek a fehérje vagy lipid eredetű molekulák a redukáló cukrok, mint pl. a glükóz nem-enzimatis glikációja során alakul ki. Az AGE fontos faktora a diabétesz szövődményeinek –különösen a vaszkuláris szövődmények- kialakulásának. Termelődése során az excesszív mennyiségben jelen levő glükóz molekulák és fehérjék szabad aminos csoportjaival labilis Schiff bázis alakul ki, mely hosszabb idő alatt Amadori terméké alakul. Az Amadori termékek további átalakulásával jönnek létre az AGE-k hetek, hónapok alatt. Az AGE illetve prekursorai kovalens keresztkötést képeznek a sejtmátrix, bazálmembránok, érfalkomponensek fehérjéivel, azok funkcióját megváltoztatva. Speciális sejtfelszíni receptorokhoz (pld. RAGEs (receptor for advanced glycation endproducts)) kapcsolódva proinflammatorikus és prooxidáns hatással bírnak, és a retinopátia kialakulásában is szerepet játszanak. A diabéteszes betegek glikémiás kontrollja, vagyis a vércukorszint megfelelő beállítottsága visszatükröződik a vér (és szövetek) AGE szintjében. A glikált fehérjék-mint pl. a glikált hemoglobin A1c- elterjedten használt a mindennapi klinikai praxisban. Információt ad az elmúlt 6-8 hét szérum glükóz szintjéről. Az oxidatív stressz reaktív molekuláinak kimutatása ugyan nem könnyű, de az oxidatív folyamatban keletkezett stabilabb végtermékek kimutatása fontos információt adhat egy adott szerv oxidatív státuszáról. A fehérjék oxidációját legjobban jellemző molekulák egyike a **fehérje-karbonil**, előnye relatív korai kialakulása és stabilitása. Az antioxidáns védekezés egyik fő enzime a **redukált glutation (GSH)**, mely a glutation reduktáz segítségével alakul ki az oxidált GSSG formából. A szövetek GSH szintje fontos információt ad a sejteket ért toxikus hatásról.

## CÉLKITŰZÉSEK

Egyre több vizsgálat tisztázza a szervezet anyagcsere és daganatos megbetegedéseiben a PAR szerepét. Ugyanakkor kevés azon munkák száma, ahol a biomarkerek szerepét a szem megbetegedéseiben vizsgálja, humán szövetekben és humán eredetű szemmintákban. Az oxidatív stressz szerepe a diabétesz és DRP kialakulásában egyaránt jól ismert. A rossz glikémiás kontroll, ami a proliferatív diabéteszes retinopathia (PDR) egyik fő etiológiai tényezője ROS/RNS termelődést vált ki, mely oxidatív stressz kialakításával a diabétesz szemszövődményeinek egyik legfontosabb etiológiai tényezője. A súlyos PDR-ban szenvedő betegeknél a szénhidrát anyagcsere megfelelő beállítása mellett sokszor szükség lehet műtéti beavatkozásra is. A vitrectomia során eltávolításra kerül a szem belsejét kitöltő üvegtest, mely a diabétesz anyagcsere termékeinek rezervoárja, a benne oldott anyagok jól tükrözik a retinában zajló biokémiai folyamatokat.

### **Célunk volt:**

1. Melanoma sejttenyészetben igazolni a PAR jelenlétét.
2. Malignus bőrmelanomák esetén megvizsgálni a PAR daganatszövetben való megjelenését, annak összefüggését a melanomák szövettani alcsoportjaival, elemezni, hogy a bőrmelanomában észlelt PAR festődés mutat-e korrelációt a betegség súlyosságával illetve a PAR festődés nemek szerinti eloszlását megvizsgálni.
3. A malignus uveális melanoma miatt eltávolított szemből készült metszeteken igazolni, hogy az uveális melanománál sok más rosszindulatú daganathoz hasonlóan összefüggést mutat-e a PAR tartalom a tumor kialakulásával.
4. A tumormentes szemszöveteken a PAR eloszlását vizsgálni a szem hátsó szegmentumában.
5. A PDR-ban a lokálisan megjelenő oxidatív stressz többféle folyamatában szereplő oxidatív stressz markerek: a patogenezisben fontos szerepet játszó AGE, a fehérje oxidációt jelző fehérje-karbonil és az antioxidáns védekező rendszert képviselő glutation szintjének elemzése.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 1. PAR kimutatása bőr és uveális melanoma szövettani metszeteken hisztokémiai módszerekkel

Vizsgálatunk során a Debreceni Egyetem Bőrklínikáján 2002-2007 között műtétiileg kezelt **bőrmelanómás** betegek eltávolított daganatából származó bőrmintákat dolgoztuk fel. A formalin-fixált, majd paraffinba ágyazott, a szövettani archivumban tárolt mintákat retrospektív dolgoztuk fel. A paraffin blokkokból rutin szövettani metszeteket készítettünk, az immunhisztokémiai vizsgálatokat ezeken végeztük. A vizsgált minták Clark I-V stádiumú (Breslow 0,06-11,00 mm, T1a-4b) melanomák és bőr melanoma metasztázisok voltak. Szövettani besorolásuk alapján 17 felszínesen terjedő melanoma (SSM), 17 lentigo maligna (LM), 17 noduláris melanoma (NM) és 15 bőr metasztázist vizsgáltunk. Kontrollként a melanocitás névuszt és a névuszt körüli ép bőrt használtuk.

Az **uveális melanoma** vizsgálatához a mintákat a Semmelweis Egyetem Szemészeti Klinikáján 2005-2006 között történt enukleációk során diagnosztikus célra elkészített formalin-fixált, paraffinba ágyazott anyagból nyertük. A szövettani archivumban tárolt beágyazott mintákat retrospektív dolgoztuk fel. A paraffin blokkokból rutin szövettani metszeteket készítettünk, az immunhisztokémiai vizsgálatokat ezeken végeztük. Összesen 12 mintát, ebből 5 orsó, 3 epitheloid és 4 kevert sejtes uveális melanomát vizsgáltunk.

#### **PAR festődés melanoma sejtenyészetén**

A PAR festődés specificitásának vizsgálatához WM35 humán melanoma sejtvonalat használtunk. A sejteket az ATCC-től (Manassas, VA, USA) szereztük be és MCDB 153 médiumban (Sigma-Aldrich) tenyésztettük, melyet 10% FCS-sel, 20% Leibovitz médiummal (Life Technologies), 5 µl/ml marhainzulinnal, 1,68mM kalcium kloriddal, penicillinnel (50 U/mL) és streptomycinnel (50 µg/mL) egészítettük ki. A sejteket a tenyésztőmédiumban kezeltük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> –al 5 percig, 400 µM-os koncentrációban. A sejtek egy részét 30 percig 10 µM-os PJ34 PARP inhibitorral is előkezeltük. A sejteken a PAR immunfestést az alább leírt módon végeztük a deparaffinálási, antigénfeltárási lépések elhagyásával, metanol (100%, -20°C, 5 perc) és paraformaldehid (4%-os oldat PBS-ben, pH 7,4, 10 perc szobahőn) fixálást követően.

## **PAR kimutatása**

A vizsgálatokban használt anti-PAR antitest (10H klón) az Alexis Biochemicalstól, (Lausanne, Svájc) származik. Az immunfestési folyamathoz a Vector Elite ABC kitet (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) használtuk. A PAR kimutatása, lokalizációja immunhisztokémiai módszerekkel történt. Deparaffinálás után az 5 µm-es metszeteket H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-val [3% (v/v) metanolban] kezeltük 20 percig az endogén peroxidáz aktivitás gátlása céljából. Majd 5 perc PBS-ben történő mosás után 5 percig kuktában melegítettük a metszeteket nátrium-citrát pufferben (0,01 M, pH 6,0) antigén feltárás céljából, majd a metszeteket desztillált vízben öblítettük, és 5 percig PBS-ben mostuk. Ezután a nem-specifikus reakciók kiküszöbölése céljából 1% (w/v) marha szérum albumin és 1 % (v/v) ló szérum keverékében inkubáltuk szobahőmérsékleten 20 percig. Ezután egy éjszakán keresztül blokkoló oldatban (1% BSA, ló serum) oldott anti-PAR monoklonális antitesttel inkubáltuk 4°C-on, majd 3x10 perces PBS-el történő mosás után újabb inkubáció következett biotinált másodlagos egér IgG ellenes ló antitesttel (ezt a Vector kit tartalmazta és a blokkoló oldatban 1:600 hígításban alkalmaztuk) szobahőmérsékleten 45 percig. Ismét 3x10 perc PBS mosás után a metszeteket 2%-os avidin–biotin–peroxidáz komplex (ABC) reagenssel kezeltük 30 percig. Ismét 3x10 perc PBS mosás után Ni-DAB szubsztráttal (1,6 mM 3,3'-diaminobenzidin tetraklorid, 140 mM NaCl, 90 mM NiSO<sub>4</sub>, 100 mM Na-acetát, 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 6,6) reagáltattuk a metszeteket 4 percig. Majd 0.1M-os, 7,2 pH-s TBS -ben való öblítés után 3 perces inkubálás következett 0,5%-os kobalt kloridban (0,1M-os, 7,2 pH-s TBS -ben oldva) szinelőhívás céljából. Desztillált vizes öblítés után Chromotrop 2R (Chroma, Stuttgart, Németország) oldattal (500 mg/l Chromotrop 2R, 0,005% (v/v) ecetsav) háttérfestést végeztünk. Minden festési ciklusban volt egy negatív immunhisztokémia kontroll (izotípus kontroll antitest). A kezdeti vizsgálatokban a melanin tartalmú sejtek feltételezett zavaró hatása miatt a melanint eltávolítottuk a metszetekből, de úgy tűnt, a melanin nem interferál a PAR immunhisztokémiai kimutatásával, ezért ezt a lépést a végső procedúrából kihagytuk.

## **2. Oxidatív stressz markerek kimutatása proilferatív diabéteszes retinopátiában (PDR) szenvedő betegek üvegtesti mintájából**

A vizsgálathoz PDR miatt műtétre kerülő diabéteszes betegek üvegtesti mintáit használtuk fel. Az üvegtesti mintákat vitrectomia során nyertük: a műtét elején hígítatlan mintát vettünk eppendorf csövekbe, ezeket -80 °C-on tároltuk feldolgozásig. 10 beteg üvegtesti mintáját

vizsgáltuk meg kontroll csoporttal összevetve, amihez 8 epiretinális membrán miatt vitrectomián átesett beteg üvegtesti mintáit használtuk.

A mintákból az alábbi markereket vizsgáltuk meg, melyek a szemben zajló oxidatív stresszben érintett biokémiai folyamatokról adnak információt.

### **2.a. Advanced Glycation End Products (AGE) meghatározás**

A glikált proteinek mennyiségének meghatározásához Oxi-Select Advanced Glycation End Product Competitive ELISA Kitet (Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA) használtunk a gyári instrukcióknak megfelelően.

### **2.b. Fehérje karboniláció meghatározás**

A ROS és RNS molekulák képesek a fehérjék aminosav oldalláncait karbonillá oxidálni. A fehérje-karbonil meghatározáshoz minden mintát desztillált vízzel hígítottunk a 20 µg/200 µl koncentrációig. Ehhez 50 µl 80% os triklórecetsavat (TCA) adtunk, ezt centrifugáltuk, majd jégen inkubáltuk 5 percig. Ezután 13000g-n 2 percig történő centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk, majd az üledéket újraülepítettük 500 µl jéghideg acetonban. Ezt -20°C-on inkubáltuk 5 percig, majd ismét centrifugáltuk 13000g-n 2 percig. Az aceton eltávolítása után az üledéket 20 µl desztillált vízben oldottuk, majd a fehérje karbonil kimutatásához az OxyBlot Protein Oxidation Kitet (Merck Millipore, Budapest, Magyarország) használtuk a gyári instrukciók alapján. A derivatizáció befejezése után, a kinyert dinitrofenol terméket spektrofotometriával határoztuk meg 405 nm-en.

### **2.c. Glutation meghatározás**

A mintákat 10 percig jéghideg 10%-os TCA oldatban precipitáltuk. Majd 5000 g, 4 °C-on történő centrifugálás után a felülúszót használtuk további vizsgálatokhoz. A glutation esszé (GSH esszé) 96 lyukú lemezen végeztük. A mintához nátrium-foszfát puffert (1M) és oftálaldehidet (0.5%) adtunk, és 30 perces szobahőmérsékleten történő inkubáció után 390/460 nm-en fluorescenciát mértünk. A felülúszót N-etilmaleimiddel keverve használtunk vakként minden mintához. A GSH-val standard görbét készítettünk. A fehérje koncentrációt BCA kolorimetriás módszerrel határoztuk meg.

## **3. Statisztikai módszerek**

A **bőr és uvea melanoma** metszeteken a magfestődést szemikvantitatív módszerrel mértük egy szubjektív skálán, két egymástól független gyakorlott vizsgáló által. A skála pontjai: 0

(negatív), 1 (alacsony), 2 (közepes), 3 (erős), 4 (nagyon erős). Az immunfestett lemezeket a H&E festett párjukkal vetettük össze a melanocita eredetű festődés felmérése céljából. A két független vizsgáló által értékelt festődési értéket átlagoltuk, majd korreláltattuk a Breslow index-el, Clark stadiummal és AJCC score-al a Graphpad és SPSS17 softverek segítségével. A korrelációt Spearman féle korrelációs koefficienssel vizsgáltuk, a szignifikanciát  $p < 0.05$  határoztuk meg.

A **diabeteses és nem diabeteses minták** eredményeit Statistica11.0 szoftver segítségével végeztük. A számításokhoz a Mann-Whitney U Tesztet használtuk. A különbséget  $p < 0.05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

## EREDMÉNYEK

### 1. PAR képződés bőr és uveális melanómában

**1.a. Humán melanoma sejttenyészet** 10H (PAR ellenes) antitesttel igazolható a PAR jelenléte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően, mely a PARPi kezelt sejtekben nem észlelhető.

**1.b. A bőrmelanomáknál** a PAR magi festődését figyeltük meg a tumorsejtekben. Bár a festődés intenzitása meglehetősen különböző volt, a festődés intenzíven korrelált a Breslow indexel, Clark stadium beosztással és az AJCC score-ral. Megfigyeltük ugyanakkor, hogy ez a korreláció nőbetegeknél sokkal kifejezettebb volt. A Spearman korrelációs koefficiens és szignifikanciája nőbetegek esetében a fentiekhez hasonló sorrendben:  $r=0,6678$  ( $p=0,0004$ ),  $r=0,5584$  ( $p=0,0046$ ),  $r=0,5486$  ( $p=0,0055$ ), míg a férfi betegek esetében az értékek  $r=0,3227$  ( $p=0,1006$ ),  $r=0,2283$  ( $p=0,2520$ ) és  $r=0,3575$  ( $p=0,067$ ). A bőrmelanómák esetében tehát a PAR tartalom egyenes összefüggését találtuk a klinikai stádium súlyosságával, ami főként a nőknél volt kifejezett.

**1.c. A uveális melanomáknál** vizsgáltuk a *szem tumormentes részein* a mag PAR festődését, vagyis a szegmensek hátsó szegmentumának azon részeit ahol a PAR fiziológiásan is termelődik. A szegmensek rétegei közül a retinában PAR festődést észleltünk a nukleáris rétegek sejtmagjaiban illetve az érhártya ereinek a falában.

A *daganatos szöveten belüli* PAR festődés változó volt. Több esetben is megfigyelhető volt az intenzív erek körüli festődése a tumorszövetnek. Az esetek alacsony száma miatt a festődés intenzitását nem korreláltuk a tumor szövettani típusával, bár jellemzően eltérő volt a festődés intenzitása az egyes tumor típusok között.

### 2. Oxidatív stressz markerek proliferatív diabéteszes retinopátiában (PDR) szenvedő betegek üvegtestében

#### 2.a. AGE szint az üvegtestben

Kíváncsiak voltunk, vajon a diabéteszes betegek üvegtestében megfigyelhető-e a szérumban glikált hemoglobin szint változásához hasonló fokozott glikáció. Vizsgálataink során a kontroll csoporttal összevetve emelkedett AGE szintet találtunk a PDR betegek üvegtestében:

812.10 vs 491.69 ng/mg protein ( $p=0.058$ ). Az eredmények arra utaltak, hogy az üvegtesti cukorszint hasonlóan változik, mint a szérumban vagy más szervben.

### **2.b. Oxidatív stressz az üvegtestben**

Az oxidatív stressz a ROS és RNS keletkezése és eliminációja közötti egyensúly felborulásakor alakul ki. Ha a ROS/RNS eliminációja csökken az antioxidáns kapacitás elégtelen működése miatt, fehérje oxidáció és nitrálás, lipid és DNS károsodások jönnek létre. A ROS és RNS által triggerelt oxidatív fehérjekárosodást jelzik az aminosav oldalláncokon megjelenő karbonil csoportok. A fehérje-karbonil számos oxidatív stresszállapot vizsgálatának fontos biomarkere, és több betegségben, így a diabéteszben is sejtdiszfunkciót okoz. Vizsgálatunkban meghatároztuk a DRP betegek üvegtesti fehérje-karbonil szintjét. A DRP betegek üvegtestében szignifikánsan emelkedett szintet találtunk (2.08 vs 0.67  $A_{405}/100$   $\mu\text{g}$  protein;  $p=0.017$ ) a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az eredmény rámutat, hogy az oxidatív stressz a diabéteszes folyamatokban szerepet játszik és a ROS/RNS molekulák a szem fehérjéivel reakcióba lépnek.

### **2.c. Antioxidáns kapacitás az üvegtestben**

A ROS/RNS termelődése mellett az antioxidáns repertoár állapota és összetétele is kulcsszerepet játszik a szerv illetve szövet redox státuszában. Ezért elemeztük a PDR betegek üvegtestének antioxidáns háztartását. Meghatároztuk az egyik legfontosabb endogén antioxidáns, a redukált glutation (GSH) szintjét. A GSH szintet is szignifikánsan magasabbnak találtuk a kontroll csoporthoz képest. (4.53 vs 2.34  $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$  protein;  $p=0.019$ ). ( $p<0.05$ ).

## KÖVETKEZTETÉSEK

### 1. PAR képződés bőr és uveális melanomában

**1.a.** Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a PAR mind a bőr melanomákban (CM), mind pedig az uveális melanomában (UM) képződik.

**1.b.** Korábban a PARP-1 enzim expresszióját kimutatták humán CM-ban és korrelációt állapítottak meg az expresszió intenzitása és a tumor klinikai stádiuma között. Elsőként publikáltuk ugyanakkor különböző melanomák PAR tartalmát, ami jobban tükrözi a sejtek PAR metabolizmusát, mint a PARP-1 expresszió.

**1.c.** Eredményeink, melyek szerint a CM-ban a PAR tartalom korrelál a tumor Breslow indexével, Clark stádiumával és az AJCC score-al, terápiás jelentőséggel bírhatnak azoknál a betegeknél, ahol a kemoterápia mellett PARP gátló kezelés is szóba jön. A bőr melanoma mintákban a melanoma sejtekben egyenletes PAR festődését találtuk, ami arra utalt, hogy a PAR szintézis nem annyira mitózis függő ezekben a tumorokban.

**1.d.** Megfigyeltük, hogy CM-ban a PAR festődés és a klinikai stádium közötti összefüggés jóval kifejezettebb volt a nőknél. Korábban már ismert volt a nemek szerepe számos bőrbetegségben, így CM-ban is, ugyanakkor a PAR-iláció különböző betegségekben betöltött szerepének vizsgálata során is találtak nemi különbséget.

**1.e.** Kimutattuk, hogy a PAR a tumormentes szemgolyó bizonyos sejtjeiben: így a retina nukleáris rétegében és az érhártya ereinek falában is kimutatható.

**1.f.** Elsőként vizsgáltuk a PAR megjelenését UM-ban. Az UM metszetekben intenzív PAR festődés volt jellemző a tumor ereinek sejtjeiben illetve az erek körüli tumorszövetben. Ez utalhat arra, hogy a PAR szintézis a tumor oxigenizációval függ össze. A daganat saját ereinek kialakulása, vérellátása fontos a tumorszövet megfelelő oxigén és tápanyagellátásához.

A PARP gátlók napjainkban az onkológiai gyakorlat elfogadott gyógyszereivé váltak. A PARP gátlók megjelenése nagy reményeket kelt a BRCA mutációval illetve a homológ rekombináció zavarával járó tumorok kezelésében. Miután a bőr és uveális melanomák klinikai viselkedése egymástól eltérő, melynek hátterében többek között az eltérő protoonkogén spektrum is állhat, fontos lehet annak ismerete, hogy egy esetleges PARP gátló kezelés a melanoma által involvált szerv mely részeit éri el, amire a PAR eloszlás alapján következtethetünk. Mivel a melanoma eltérő stádiumaiban egyéenként eltérő PAR festődést

találtunk a CM esetekben, szükséges lehet a PARP gátló kezelésre való kiválasztásban a betegek gondos szelektálása.

## **2. Oxidatív stressz markerek vizsgálata diabétesz eredetű retinopátiában**

Üvegtesti mintákban vizsgáltuk a PDR-al összefüggésbe hozható oxidatív stresszhez vezető folyamatok markereit. Már korábban ismert volt, hogy a fehérje glikáció markere az AGE szintje emelkedik diabéteszes betegeknél. Akár közel optimális szénhidrát anyagcsere beállítás mellett is előfordulhat a vércukor szint olyan ingadozása, mely hatására a vér és különböző szövetek fehérje glikációja fokozódhat. Diabéteszben AGE-k keletkeznek a szemben, közreműködve a diabétesz komplikációinak kialakulásában.

2.a. A PDR-s betegek üvegtestében emelkedett AGE szintet találtunk, ami utalhat a szem belüli glükóz szint emelkedésére. Miután a szisztémás keringés és üvegtest közötti metabolikus equilibrium kialakulása lassú, ezért az üvegtestben mért magas AGE szint a hiperglikémia tartós fennállására utal betegeink esetében, másrészt a proliferatív stádiumba való átmenet kialakításában is szerepet játszhat.

2.b. A szöveti oxidatív stressz jellemzője az oxidatív protein, DNS és lipid módosítás. A fehérjeoxidáció markereként megmértük az üvegtest fehérje-karbonil tartalmát. A diabéteszes betegek emelkedett üvegtesti fehérje-karbonil szintje alátámasztja azt a feltételezést, hogy az üvegtest is része a szem diabétesz eredetű oxidatív környezetének. Az üvegtest fehérjékben, különösen albuminban és II típusú kollagénben gazdag, így a RON/RNS származékok nagy valószínűséggel találnak fehérje célpontot. Ugyanakkor korábbi vizsgálatok alapján az emelkedett fehérje-karbonil szintet egy súlyosabb oxidatív hatásnak tulajdonítjuk, ami szerepet játszhat a szövődmények kialakulásában. Így felveti lehetőségét karboniláció gátlók jövőbeli klinikai alkalmazásának is.

2.c. Oxidatív stressz jelenléte mellett értelemszerűen az antioxidáns rendszer is működésben lép. Korábbi vizsgálatok alapján azt vártuk, hogy a fokozott igénybevétel miatt a diabéteszes betegek üvegtestében az antioxidáns kapacitás is csökken. Munkánkban az egyik fő antioxidáns enzim, a redukált glutation (GSH) szintjét vizsgáltuk üvegtestben. Elsőként írtuk le, hogy a PDR betegek üvegtestében emelkedik a GSH szintje a kontroll szemekhez viszonyítva. Ezt a megnövekedett terhelésre kialakult adaptív válasznak tekintettük, hasonlóan ahhoz, ahogyan azt korábban PDR betegeknél megfigyelték az extracelluláris szuperoxid-dizmutáz esetében. Vizsgálataink alapján a redox homeosztázis jelentős átrendeződése figyelhető meg a diabéteszes betegek üvegtestében, mely magyarázatot adhat a DRP patomechanizmusának egyes lépéseire.



Nyilvántartási szám: DEENK/35/2018.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Géhl Zsuzsanna  
Neptun kód: PCK118  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Géhl, Z.**, Bakondi, E., Resch, M. D., Hegedűs, C., Kovács, K., Lakatos, P., Szabó, A., Nagy, Z., Virág, L.: Diabetes-induced oxidative stress in the vitreous humor.  
*Redox Biology*. 9, 100-103, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.07.003>  
IF: 6.337
2. **Géhl, Z.**, Bai, P., Bodnár, E., Emri, G., Remenyik, É., Németh, J., Gergely, P., Virág, L., Szabó, É.: Poly(ADP-ribose) in the skin and in malignant melanomas.  
*Histol. Histopath.* 27, 651-659, 2012.  
IF: 2.281

### További közlemények

3. Szabó, A., Papp, A., Borbándy, Á., **Géhl, Z.**, Nagy, Z. Z., Resch, M. D.: Aphakia korrekciója irisklip műlencse retropupillaris beültetésével.  
*Orvosi Hetilap*. 158 (1), 20-24, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2017.30607>  
IF: 0.349 (2016)
4. **Géhl, Z.**, Maneschg, O. A., Nagy, Z. Z.: Beidseitige progressive Chorioretinitis = Progressive Bilateral Chorioretinitis.  
*Klinische Monatsblat. Augenheilkunde*. 233, 298-299, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1557884>  
IF: 0.651
5. Gyenes, A., Nagy, Z. Z., Récsán, Z., **Géhl, Z.**: Primer herpeszvírus retinitis: esetbemutató.  
*Szemészet*. 153 (3), 123-127, 2016.





6. Resch, M. D., Németh, C., Barcsay, G., Ecsedy, M., Borbándy, Á., **Géhi, Z.**, Balogh, A., Szabó, A., Nagy, Z. Z., Papp, A.: Szemfenéki érfestés festék nélkül: az optikai koherencia tomográfia alapú angiográfia exsudatív típusú időskori maculadegenerációban.  
*Orv. Hetil.* 157 (42), 1683-1690, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2016.30548>  
IF: 0.349
7. Szentmáry, N., Seitz, B., **Géhi, Z.**, Szepessy, Z., Nagy, Z. Z.: Herpesz eredetű keratitisek klinikai megjelenési formái és kezelése.  
*Szemészet.* 152 (1), 33-39, 2015.
8. **Géhi, Z.**: Szakmák együttműködése az uveitisz diagnosztikájában.  
*Orvostovábbk. Szle.* 28 (2), 1-9, 2015.
9. **Géhi, Z.**, Kulcsár, K., Kiss, H., Németh, J., Maneschg, O. A., Resch, M. D.: Retinal and choroidal thickness measurements using spectral domain optical coherence tomography in anterior and intermediate uveitis.  
*BMC Ophthalmol.* 14 (103), 1-7, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2415-14-103>  
IF: 1.02
10. Maneschg, O. A., Volek, É., Németh, J., Somfai, G. M., **Géhi, Z.**, Szalai, I., Resch, M. D.: Spectral domain optical coherence tomography in patients after successful management of postoperative endophthalmitis following cataract surgery by pars plana vitrectomy.  
*BMC Ophthalmol.* 14 (76), 1-8, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2415-14-76>  
IF: 1.02
11. **Géhi, Z.**: A gümőkór szemészeti vonatkozása: 150 év tapasztalata Magyarországon a jelenkori világirodalom tükrében.  
*Szemészet.* 150 (4), 191-195, 2013.
12. **Géhi, Z.**, Resch, M. D.: Akut retina nekrozis: esetismertetés és irodalmi áttakintés.  
*Szemészet.* 3, 221-224, 2012.
13. **Géhi, Z.**, Németh, J., Virág, L.: Peroxinitrit-képződés és poli(ADP-ribóz) polimeráz aktiváció a szemben.  
*Szemészet.* 145 (3-4), 75-81, 2008.
14. Szabó, A., **Géhi, Z.**, Seres, A.: Photodynamic (verteporfin) therapy for retinal capillary haemangioma, with monitoring of feeder and draining blood vessel diameters.  
*Acta Ophthalmol. Scand.* 83 (4), 512-513, 2005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0420.2005.00476.x>  
IF: 1.581
15. **Géhi, Z.**, Megyesi, M., Tóth, J.: Vitrectomia által indukált atípusos sympathiás ophthalmia: esetismertetés.  
*Szemészet.* 141, 385-388, 2004.





16. **Géhi, Z.**, Bausz, M., Süveges, I.: A juvenilis krónikus arthritiszhez kapcsolódó uveitis talaján kialakult cataracta műtéti megoldása.  
*Szemészet.* 140, 31-35, 2003.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,588**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
8,618**

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

Debrecen, 2018.02.06.



A munkát a GINOP-2.3.2-15-2016-00020 TUMORDNS és GINOP-2.3.2-15-2016-00048-STAY ALIVE" pályázatok támogatták.