

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**UV-irradiációt követő DNS-károsodás és reparáció a bőr
sejtjeiben. In vitro vizsgálatok**

Dr. Emri Gabriella

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

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

DEBRECEN, 2004

Tartalomjegyzék

1.....	Bevezetés.....	4. o.
2.....	Célkitűzések.....	14. o.
3.....	Anyagok és módszerek.....	16. o.
4.....	Eredmények.....	22. o.
5.....	Megbeszélés.....	40. o.
6.....	Az eredmények gyakorlati jelentősége.....	49. o.
7.....	Összefoglalás.....	50. o.
8.....	Summary.....	52. o.
9.....	Az értekezésben előforduló hivatkozások.....	53. o.
10.....	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke.....	62. o.
11.....	Az értekezés témájával kapcsolatos poszterek és előadások.....	62. o.
12.....	Egyéb közlemények.....	63. o.
13.....	Köszönetnyilvánítás.....	64. o.
14.....	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai és kézírata.....	65. o.

RÖVIDÍTÉSEK

(6-4)-PD: pirimidin-(6-4)-pirimidon fotoproduktum

8-MOP: 8-metoxi-pszoralen

8OHdGuo: 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanozin

CA: kromoszóma aberráció

CPD: ciklobután-pirimidin-dimer

DPC: DNS-protein keresztkötések

DPH: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién

Dsbs: kettősszálú DNS-törés

EB: etídium-bromid

EDTA: etilén-diamin-tetra-acetát

FA: formaldehid

FB: fibroblaszt

FCM: áramlási citometria

FM: fluoreszcens mikroszkópia

KC: keratinocyta

MC: melanocyta

MMS: metil-metán-szulfonát

MN: mikronukleusz

NER: nukleotid excíziós reparáció

PUVA: 8-MOP+UVA

SEM: átlag standard hibája

Ssbs: egyszálú DNS-törés

UV: ultraibolya sugárzás

1. BEVEZETÉS

A napfény a szervezetünket, leginkább bőrünket érő, hatásaiban összetett, pozitívumokkal és negatívumokkal egyaránt rendelkező természetes környezeti tényező. Elindítója és fenntartója számos fizioiogiás (D-vitamin szintézis, antigénspecifikus immuntolerancia, etc.) és patológiás (napégés, fotoallergiás, fototoxikus, fotoaggravált kórképek, fotokarcinogenezis, photoaging) folyamatnak. Ezen hatásokért elsősorban a napfény elektromágneses spektrumának kb. 6 %-át kitevő UV-tartomány (200-400 nm) a felelős, amelyben biológiai hatás szempontjából UVC (200-280 nm), UVB ((280-320 nm) és UVA (320-400 nm) spektrumterület különíthető el. A mechanizmus, amin keresztül ezek a hatások megvalósulnak, összetett: fotokémiai reakciók, membránreceptorokon végbemenő változások, lipid- és fehérjemódosítások, illetve DNS-károsodás indukálása. Ez utóbbinak különösen nagy a jelentősége egyrészt a genetikai tartalom megváltozásának lehetősége miatt, mely a daganatképződés fontos eleme, másrészt, mert a DNS-léziók szignálként szerepelhetnek és ilyen módon kulcsfontossággal bírnak a napfény által indukált sejtbiológiai hatásokhoz, mint a sejtet, illetve a szervezet integritását védő DNS-reparációs folyamatok, sejtciklus-szabályozó, ellenőrző funkciók, apoptózis aktiválódásához, a melanocytákban (MC) a melanin-szintézis indukálódásához, az immunfolyamatok módosulásához, immunszuppresszió vagy éppen napfényallergia kialakulásához (Matsumura, 2004). Az UV-sugárzás DNS-en kifejtett hatásai nem minden esetben ugyanazok, mivel a változások hullámhossz- és sejtfüggőek, lefolyásukban és kimenetelükben a sejtípus, a sejt-proliferációs státusz, az anyagcsere állapot, a DNS-reparációs kapacitás, endogén és exogén fotoszenzibilizátorok jelenléte egyaránt fontos. Ezért nagy jelentőségűek azok a tanulmányok, melyek a különböző tényezőket nemcsak külön-külön, hanem együttesen is figyelembe véve vizsgálják az UV-sugárzás emberi bőrön kifejtett hatásait.

A jelen munkám célja kettős volt: ezen összehasonlító vizsgálatokhoz olyan alkalmas metóduosok keresése, melyek újabb perspektívákat nyitnak a fotodermatológiai kutatásban, másrészt az UV-okozta DNS-károsodás és reparáció normál humán bőrsejteken való *in vitro* tanulmányozása. Időrendben tekintve első projektem, a mikronukleusz (MN)-képződés MC-ban és fibroblasztokban (FB) végzett vizsgálata a leideni egyetem bőrgyógyászati klinikáján történt. A fotokemoterápia genotoxicitásának kísérletes vizsgálata a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Bőr- és Nemikórtani Klinika laboratóriumában, majd a formaldehid (FA) genotoxikus hatásainak vizsgálata a heidelbergi egyetemhez tartozó mannheimi bőrgyógyászati klinikán folyt.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

UV-sugárzás és DNS-károsodás

UVC/UVB

A DNS abszorpciós spektruma (260 nm-es maximummal) nagyjából a napfény UVC és UVB tartományát foglalja magában. Az UV-fotonok a DNS-ben elnyelődve ciklobután-pirimidin-dimereket (CPD: TT>>TC>CT>>CC dimerek, Mitchell, 1992) és pirimidin-(6-4)-pirimidon fotoproduktumokat (6-4)-PD: TC>>CC>TT≈CT) indukálnak. Emellett a 300 nm-nél hosszabb UV-sugárzás jelenlétében a (6-4)-PD fotoizomerizációja is bekövetkezik, az ún. Dewar-izomer keletkezik. Az UVC,- illetve UVB-sugárzás hatására képződő fő fotoproduktum a CPD, a (6-4)-PD jóval kisebb mennyiségben képződik. Hasonló mennyiségű CPD létrehozásához az UVB-ből mintegy százszor nagyobb energiamennyiségre van szükség, mint UVC-ből (Douki, 2000). Az UVC-sugárzást az ózon elnyeli, így az atmoszférát ez a sugártartomány már nem éri el. Az ózonréteg jelenleg is észlelhető károsodása, elvékonyodása miatt azonban a rövidebb hullámhosszú UVB-sugárzás nagyobb részarányban éri el a földet (van der Leun, 1993, Madronich, 1994).

Az említett DNS-léziók a nukleotid excíziós reparáció (NER) révén javíthatók ki (Hoeijmakers, 2001). A (6-4)-PD reparációja gyors, hatékony, nagyrészt a globális genom reparáció révén megy végbe, a CPD reparációja lassú, inkomplett, főleg transzkripcióhoz kapcsolt reparációs mechanizmuson keresztül valósul meg (Mullenders, 1993). Típusos pontmutációként GC→AT tranzíció, ha a NER nem megfelelő, gyakrabban CC→TT mutáció jön létre. Az elégtelen reparáció miatt emellett a tovább folyó replikáció közben DNS-hurkok, majd egyszálú DNS-gap-ek keletkeznek a dimerek helyén, melyek endonukleázokkal szemben nagyon érzékenyek. Így kettőszálú DNS-törések (dsbs) jönnek létre, ezek révén pedig az UV-sugárzásra jellemző kromatid típusú kromoszóma aberrációk (Bradley, 1981). A CPD és (6-4)-PD felismerése együtt jár a sejtciklus ellenőrző pontjainak aktiválódásával és a sejtciklus késleltetésével, mely lehet időleges, de végződhet a sejt halálával is. Ennek szabályozásában az elmúlt években bonyolult kapcsolati rendszereket térképeztek fel, melyek bizonyos gének (ciklinek, ciklin-dependens kinázok és ezek regulátorai) adott sejtciklus-időpontban történő specifikus expressziójával jellemezhetők. Ebben központi szerepet tölt be a p53 tumorszuppresszor fehérje (Hall, 1993). Expressziója bizonyos típusú sejt-, illetve DNS-károsodás esetén megnövekszik, majd a következményesen megnövekedett p21 fehérje expresszió a G1-ciklin-dependens-kinázok gátlásával egy átmeneti sejtcikluskésleltetést idéz elő a G1-fázisban. Ez időt biztosít a DNS-reparáció befejezésére a replikáció előtt. Ha a sejt

a besugárzás pillanatában a G1/S-fázis határán, illetve korai S-fázisban vannak, amikor a sikeres DNS-reparáció esélye lecsökken, az UV-irradiáció okozta kromoszómakárosodás valószínűsége nagyobb. Ha a DNS-károsodás mértéke túl nagy, a p53 más fehérjékkel együttműködve a sejtet az apoptózis irányába indítja el. A sejtciklust reguláló fehérjék funkcióvesztő károsodása elősegíti a tumorprogressziót (Hunter, 1994). A G2/M-fázisban történő sejtciklus-késleltetés, mely a posztreplikációs reparációra biztosít időt a mitózisba lépés előtt, sokkal kevésbé egy adott specifikus DNS-károsodásra visszavezethető sejtciklus-válasz. Ez a folyamat a p34^{cdc2} fehérje foszforilációs státuszának kontrollálásával és a ciklin B oszcilláló szintézise által szintén pontosan szabályozott (Maity, 1994). A sikertelen DNS-reparáció ebből a sejtciklus-ellenőrző pontból is apoptózis irányába viszi a sejtet.

A dimerek és fotoproduktumok kimutatása történhet *in situ*, jelzett monoklonális antitestek segítségével, vagy indirekt módon, a nem szemikonzervatív DNS-szintézis nukleoradiográfiás vagy ELISA-alapú mérésével, a T4 endonukleáz V szenzitív helyek, illetve a reparáció intermedier egyszálú DNS-töréseinek kimutatásával alkalikus elúciós vagy comet-assay felhasználásával. A következményes kromoszómakárosodás demonstrálására citogenetikai assay-k, a sister kromatid kicserélődés és a mikronukleusz (MN)-indukció vizsgálata szolgálnak.

UVA

A hosszú hullámú UVA-tartományból a DNS már csak nagyon kis mennyiséget nyel el. Ezért a direkt DNS-károsodás: CPD, (6-4)-PD képződése nem számottevő (egy nagyságrenddel több UVA-energia kell hasonló mennyiségű CPD indukálásához, mint amennyit UVB okozna, Douki, 2000). Ezzel szemben megnő a valószínűsége a sejtmembránok lipidjeinek, illetve a citoplazma polimerjeinek excitációjára, mely különböző típusú szabad gyökök képződéséhez vezet. Ezeknek a hosszabb féléletidejű komponensei a sejtmagba jutva, további reakciókban nagy energiájú, rövid életidejű radikálokat hoznak létre, melyek már elég kis távolságra a DNS-től egyszálú, esetleg kétszálú DNS-töréseket, bázismódosulásokat (8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanozin (8OHdGuo), abázikus helyek), DNS-fehérje keresztkötéseket produkálnak. Az egyszálú DNS-törések gyorsan visszakapcsolódnak, a báziskárosodások a bázis excíziós reparáció révén kijavítódnak, a DNS-fehérje keresztkötéseket enzimek hasítják. A sejtciklus késleltetése az S-fázisra (De Laat, 1995), illetve a G2/M-átmenetre (Bänrud, 1999, Leszczynski, 1996) szorítkozik, vagy egyáltalán nem jelenik meg (Weller, 1996), kisebb mértékű DNS-károsodást sejtetve. Ennek ellenére pontmutációk (típusosan AT→CG transzverzió (Sage, 1996)), sőt

kromoszómakárosodás is létrejöhet (Bänrud, 1999). Az UVA okozta DNS-károsodás azért nagy jelentőségű, mert a napfény UV-spektrumában ez a tartomány nagy részarányt (95%) képvisel. Másrészt, az UVB-t elnyelő hatékony fényvédők biztosította hosszabb idejű napfényen tartózkodás és a szolárium-lámpák is plusz UVA-terhelést jelentenek. Emellett az UVA penetrációja a bőrbe jóval kifejezettebb és mélyebb, mint az UVB sugárzása. Mindezek alapján az UVA-sugárzás ma már nem tartható ártalmatlannak.

Az UVA spektrum okozta DNS-szálltörések immunkémiai módszerrel, alkalikus elúcióval vagy comet-assay-vel mutathatók ki, míg a bázismódosítások DNS-reparációs enzimekkel (formamido-pirimidin-glikoziláz, Nth protein, Nfo protein), szekvenálással.

Meg kell továbbá említeni azt is, hogy az ún. szoláris szimulált fény (UVB+UVA) DNS-károsító hatása az előbbiektől eltérő a szélesebb spektrum jelenléte következtében. A mutációk tekintetében például az UVB-re jellemző GC→AT események és az UVA-specifikus AT→CG bázis szubsztitúciók mellett gyakoribbá válnak a CC→TT típusú változások (Sage, 1996).

A humán bőr sejtjei

A bőr három rétege a hám (epidermisz), az irha (dermisz) és a bőralja (szubkutisz). Legkívül helyezkedik el az epidermisz, mely főként keratinocytákból (KC, 80 %), MC-ből (5-10 %) és Langerhans sejtekből (5-10 %) épül fel. A FB a dermiszben és a szubkutiszban található. Az UV-sugárzás penetrációjának mélysége egyrészt hullámhossz-függő: az UVA-fotonok a dermiszt is eléri, míg az UVB-sugárzás fő targetje az epidermisz (Bruls, 1984). A biológiai hatást befolyásoló további tényező a stratum corneum vastagsága, amelyben az UV-sugárzás egy része szóródik és visszaverődik, illetve a melanintartalom, mely a sugárzás egy részét képes elnyelni. Mindemellett a különböző sejtípusok is eltérően válaszolnak az őket ért genotoxikus stresszre (Smith, 1996). Ennek hátterében olyan tényezők állnak, mint pl. a különböző típusú DNS-reparációs útvonalak aktiválódásának eltérő gyakorisága (Hoeijmakers, 2001), az apoptózisra való érzékenység különbözősége (Smith, 1996), az eltérő sejtciklus-hossz (De Leeuw, 1994, Kaufmann és Wilson, 1994), illetve aktuálisan a sejtek sejtciklus-fázis állapota (Weller, 1996). Ezért egy adott genotoxikus behatásra a mutációs frekvencia, a kromoszómakárosodás és a sejt túlélés is eltérő. Példának okáért Otto (1999) azt találta, hogy a FB-ban ugyanazon UVB-dózis nagyobb mértékű DNS-károsodást indukál, mint KC-ban. De Leeuw (1994) kimutatta, hogy a legrosszabb túlélési rátát bármely hullámhosszúságú UV-sugárzásra a FB adják. A KC kevésbé, legkevésbé pedig a MC

érzékenyek a letális hatással szemben. A FB-ban emellett a DNS-reparáció fidelitása is kisebb a KC-hoz képest (Schmidt-Rose, 1999).

Az UV-sugárzás okozta DNS-károsodás következményei a bőrben

Bőrdaganatok

Az epidemiológiai és kísérleti adatok arra utalnak, hogy a humán bőrtumorok incidenciájának növekedése, legalábbis részben, a bőr napfény expozíciójának fokozódásához kapcsolódik (Mukhtar és Elmets, 1996). Ez főleg a nem melanoma bőrtumorokra (aktinikus keratózis, bazalioma, spinalioma) vonatkozik. A melanoma kialakulásában, progressziójában az UV-sugárzás szerepe kevésbé tisztázott (Weinstock, 1996; Gilchrist, 1999). A fotokarcinogenezis manapság elfogadott modellje soklépcsős folyamatot tételez fel a tumor kifejlődésének hátterében (Yuspa és Dlugosz, 1991), amelyben nemcsak az UVB, hanem az UVA is fontos szerepet játszik (Matsui és DeLeo, 1991). Ez utóbbit többek között szőrtelen albino egereken végzett kísérletek támasztják alá (De Gruijl, 1993), másrészt az a megfigyelés, hogy egy hal modellben az UVA-sugárzás hatékonyan bizonyult melanoma kialakulásában (Setlow, 1993). A tumorok molekuláris analízise bőrdaganatok sejtjeiben a genetikai módosítások egész spektrumát mutatja (Leis és Livingstone, 1996; Heim és Mitelman, 1995). Pontmutációkon és kis deléciókon túlmenően teljes gén, kromoszómafragment vagy teljes kromoszóma elvesztése is megjelenhet, ami citogenetikailag detektálható (Solomon, 1991). Humán bazaliomákban és spinaliomákban a kromoszómavesztés különböző mintázatai találhatóak (Quinn, 1994). Aktinikus keratózisban ismert a heterozigótás veszteségének magas gyakorisága (Rehman, 1994). Humán melanoma sejtekben súlyos kromoszóma aberrációk (CA) figyelhetők meg (Trent, 1989; Dracopoli, 1989). A súlyos genetikai változások közül, melyekről azt tartják, hogy a bőr karcinogeneziséhez vezethetnek (Yunis, 1983; Rees, 1994), néhányat ismertén az UV-fény indukál (IARC, 1992). Az még nem tisztázott, hogy az UV-spektrum mely része okoz ilyen defektusokat, illetve, hogy az UV-sugárzás milyen mértékű kromoszóma aberrációt (CA) indukál.

A MN-képződés a kromoszómakárosodás igen érzékeny paramétere (Heddle, 1983). A MN olyan genetikai anyagot reprezentálnak, amely a sejtosztódás során nem tudott beépülni a leány-magvakba (Cornforth és Goodwin, 1991). Ezek a DNS-tartalmú kerek részecskék belső és külső membránból álló burokkal vannak körülvéve (Paglin, 1997). Korábbi vizsgálatok xeroderma pigmentosum-ban (Bielfeld, 1989) illetve familiáris melanoma malignum-ban

(Roser, 1989) szenvedő betegekből származó FB kultúrákban a szoláris UV-sugárzás okozta MN-indukciót magasabbnak találták egészséges egyénekhez képest. Ez jól korrelál a betegek napfény-expozíció okozta emelkedett tumor rizikójával.

Immunszuppresszió

Jól ismert, hogy az UV-sugárzás elsősorban a sejtmediált immunválaszok (késői típusú túlérzékenység, kontakt hiperszenzitivitás) szisztémás és lokális szupprimálásáért felelős (Kripke, 1990). A hatás kifejlődéséhez az szükséges, hogy az UV-fotonok energiája a sejt által érzékelhető szignállá alakuljon, amihez alkalmas kromofór vegyületek kelljenek. Az elmúlt évek során a kutatások két fő kromofórt valószínűsítettek az UV immunszuppresszív hatásának hátterében: a stratum corneumban elhelyezkedő transz-urokánsav molekulát (Norval, 1996) és a DNS-t (Vink, 1996). Ez utóbbival kapcsolatban Kripke és munkatársai (1992) vizsgálatai kimutatták, hogy a CPD-képződés mértékének csökkentése excíziós reparációs enzimet tartalmazó liposzómák bőrbe való bejuttatása révén ki tudja védeni az UVB-indukálta lokális és szisztémás immunszuppressziót. Kettősszálú DNS-törések indukálása in vivo a KC DNS-ben restriktív enzim segítségével immunszuppressziót idézett elő (Vink, 1996). Számos kísérletes adat emeli ki tehát a DNS-károsodás fontos szerepét ebben a folyamatban. Az immunszuppresszióban feltételezett mechanizmus egyrészt immunmodulatorikus citokinek (pl. IL-10) termelésének a kiváltása a KC-ban a DNS-károsodás által, melyek a keringésbe jutva szisztémás hatást is kifejthetnek, másrészt a γ -interferon indukálta intercelluláris adhéziónak (ICAM)-1 sejt felszíni expressziójának gátlása (Krutmann, 1996). Emellett az UV az epidermisz antigénprezentáló sejtjeinek a DNS-ét is közvetlenül károsítja, amelyeknek - valószínűleg részben a megváltozott citokin milieu hatására is - megváltozik az antigénprezentáló képessége, így módon lokálisan tolerogén immunválasz fejlődik ki az adott antigénre (Vink, 1996). A sejtes immunválasz gátlása a bőrtumorokkal szembeni immunvédekezés képességének csökkenésével is jár (Krutmann, 1996).

Fotoallergia

A fotoszenzitív (fotoallergiás) bőrbetegségek, köztük a polimorf fényexanthea (PFE) patomechanizmusa nagyon kevésbé ismert, ami miatt a terápia is problémát jelent. Horkay (1973) vetette fel első ízben a nagyfokú fényérzékenységgel járó kórképben a NER lehetséges szerepét. A PFE betegek perifériás limfocitáiban az UV-irradiációt követő reparációs DNS-szintézis szignifikáns csökkenését írta le, összehasonlítva nem fényérzékeny személyek

limfocitáival. A KC-ban a csökkenés nem volt szignifikáns (Horkay, 1978). Elképzelhető, hogy az UV-sugárzás okozta DNS-károsodásnak ezen kórképben is patogenetikai szerepe van. A tünetek kialakulásának hullámhossztól való függése PFE-ben (Nyugat-Európában inkább az UVA, Magyarországon inkább az UVB a provokáló) rámutat a DNS-léziók típusának a fontosságára, és további vizsgálatokat sürget ebben az irányban.

Exogén kémiai anyag hatása az UV-sugárzás okozta DNS-károsodásra

Fotoszenzibilizálás

A bőrtumorok emelkedő incidenciájának hátterét kutatva lényegesek azok a tanulmányok is, melyek a bőr karcinogenezis többlépcsős folyamatában lehetséges additív, szinergisztikus interakciókat vizsgálnak az UV-sugárzás és a gyógyszerek, kozmetikumok, egyéb környezeti tényezők között (Brash, 1998, Minamoto, 1999, Kraus, 1996). Ilyen jellegű vizsgálatok eddig nem nagy számban történtek, technikailag nehezek (Loveday, 1996). Teoretikusan, a kémiai anyagok a bőrbe abszorbeálódva direkt DNS-károsodást indukálhatnak, gátolhatják a DNS-reparációt, replikációt vagy transzkripciót, fotokémiai reakciókat eredményezhetnek, szabad gyököket generálhatnak, vagy megzavarhatják a sejtciklus szabályozást (Kraus, 1996, Goldsmith, 1996, Davies, 1990). Mindez módosíthatja a napfény UV-sugárzásának tumort iniciáló hatását.

Az említett "fotoszenzitivizáló" anyagok lehetnek terápiás célzattal alkalmazott kémiai vegyületek (pl. 8-metoxi-pszoralen (8-MOP), egyéb, szintén növényi eredetű (paszternák, zeller, füge, lime) molekulák vagy gyógyszerek (pl. tetracyclinek, fluorokinolonok, fenotiazinok), illetve a környezetünkből származó (pl. krémekből, aftershave-ből, fényvédőkből, textilekből etc. felszabaduló) vegyi anyagok. Kérdéses, hogy ezek közül melyek csak fototoxikusak, fotoallergének, és melyek fotomutagének, fotokarcinogének is (Loveday, 1996).

A fotokémiai reakciók során az arra alkalmas kémiai anyagok, elnyelve az UV-sugárzás energiáját, magasabb energiaszintre, excitációs (szingulett vagy triplett) állapotba kerülnek. Ezután, mint szabad gyökök, azaz nagyon reaktív molekulák viselkednek (I. típusú fotokémiai reakció) vagy más molekulákkal kölcsönhatásban újabb szabad gyököket, főként reaktív oxigén szabad gyököket indukálnak (II. típusú fotokémiai reakció). Az utóbbi folyamat a gyakoribb, az excitáló hullámhossz leginkább az UVA, vagy a látható fény (400-700 nm). A következmény a DNS oxidatív károsodása, a membrán lipidjeinek peroxidációja, a membrán-asszociált és citoplazmatikus fehérjék módosítása. A DNS-ben bekövetkező

változások egyszálú és kétszálú DNS-törések, báziskárosodás (8OHdGuo, abázikus helyek), DNS-fehérje keresztkötések. A nem fotokémiai reakciókban résztvevő kokarcinogénekről (pentoxyfillin, koffein, aldehidek) mind kísérleti adatok, mind epidemiológiai bizonyítékok szempontjából jóval kevesebbet tudunk (Weller, 1996, Grafström, 1983).

Fotokemoterápia

A fotokemoterápia során pszoraleneket (általában 8-MOP) alkalmazunk közvetlenül a bőrön oldat, illetve krém formájában vagy per os. Ezt 20 perccel-2 órával később UVA-besugárzás követi, a bőrben való 8-MOP akkumuláció maximumán. Történetileg, a pszoraleneket tartalmazó növényi extraktumok együttes alkalmazása természetes napfényel i. e. 1500-ra vezethető vissza; Indiában és Egyiptomban a vitiligo kezelésében használták. Az első klinikai közlés 1948-ból való (El-Mofty). Bár azóta ez a kezelési eljárás nagyon elterjedt mint számos bőrbetegség (psoriasis, vitiligo, atopiás dermatitis, parapsoriasis, mycosis fungoides) kiváló adjuváns terápiája (Bethea, 1999), hatásának mechanizmusa nem teljesen tisztázott. Az egyik összetevő a beteg bőr epidermiszét infiltráló aktivált/kóros limfociták apoptózisának indukciója (Yoo, 1996, Coven, 1999). Az is ismert, hogy a fotoaktivált pszoralen elsősorban a nukleinsavra hat (Gasparro, 1988, Yang, 1989), a biológiai hatások pedig az alkalmazott UV-sugárzás hullámhosszától függenek (Ortel, 1990), azaz a pszoralen fotoaktivációjától. Így valószínű, hogy a PUVA (PUVA=8-MOP+UVA) biológiai hatásaiban a DNS-pszoralen fotoadduktumoknak fontos szerepe van (Ortel, 1990, Gasparro, 1988). Ismert, hogy a 8-MOP az I. típusú fotokémiai reakcióban vesz részt, azaz az UV-fotont abszorbeáló molekula a DNS-szálak közé interkalálódva és UV-fotont elnyelve egy pirimidin bázissal 3,4- illetve 4',5'-monoadduktumot képez, majd egy újabb foton hatására DNS-DNS keresztkötést hoz létre. Az ilyen típusú DNS-károsodás reparációja nem tisztázott. Escherichia coli-ban, élesztő sejtekben, plazmid DNS-en végzett kísérletek alapján a NER és a rekombinációs reparáció komplex együttműködése (Magana-Schwencke, 1991, Lage, 2003) valószínű. Humán limfoid sejteken végzett kísérletek különböző DNS-reparációs időket mutattak UVB- és PUVA-kezelést követően. Ami a bőrt illeti, a fotokemoterápia hatékonysága sok esetben nagyobb, illetve más jellegű a fototerápiához (UVA önmagában vagy UVB) képest, ami a DNS-károsodás eltérő természetéből eredhet ugyancsak. A PUVA-ra típusos mutáció is különbözik attól, amit az UVB- vagy az UVA-sugárzás után észlelhetünk, ez esetben gyakoribb az 5'TpA helyek mutációja. Ezért az okozott DNS-károsodás vizsgálata abból a szempontból is fontos, hogy a PUVA-karcinogenezis hátterét is

jobban megismerjük, minthogy PUVA-kezelés alatt a bőrdaganatok megjelenésének rizikója emelkedik (Stern, 1994).

A fotoadduktumok kimutatására eddig alkalikus elúciót, nagy nyomású folyadék kromatográfiát, monoklonális antitestek felhasználását írták le.

UV, formaldehid, karcinogenezis

A formaldehid (FA) a környezetszennyezés egyik fő eleme (Casteel, 1987). Esszenciális ipari nyersanyag kemikáliák előállításához, építőanyagok, háztartási termékek gyártásához. FA szabadul fel fa, természetes gáz inkomplett égésekor, dohányzáskor, de a kozmetikumok is gyakran tartalmaznak FA-t (0.0001-0.0848% (m/m) vagy FA felszabadító komponenseket (Quaternium 15, diazolidinyl urea), mint konzerváló szert (Rastogi, 2000). Maximális megengedett koncentrációja krémekben – az EU Kozmetikai Direktiva szabályozása szerint - 0.2% (m/m). Ebben a mennyiségben, protein keresztkötések létrehozása révén, a FA előnyös a szintetikus komponensek gyors kémiai degradációjának, illetve a bakteriális kontaminációnak a kivédésére. Ismertek azonban bőrre kifejtett káros hatásai is. Aldehyd-alapú gyantákkal foglalkozó munkásokon esetenként bőrkiütések (irritáció) (Makinen, 1999) figyelhetők meg, gyakori a FA-del szembeni kontakt allergia is (Agner, 1999), mely miatt a FA az európai standard epicutan tesztsor konstans tagja. Ezen kívül nemrégiben fényérzékenységet is közöltek egy tosylamid/formaldehid gyanta okozta kontakt-dermatitisszel szövődve (Vilaplana, 2000). A levegőből, textilekből vagy kozmetikumokból abszorbeálódott FA tényleges koncentrációja a bőrben nem ismert. A FA-hidrát, ami vizes oldatban keletkezik, bizonyítottan könnyen diffundál a bőrbe (Robbins, 1984). A FA ubiquiter, a legtöbb sejtből jelen van az alkohol dehidrogenáz III által enzimatiszusan létrejött glutationált formában (Cheung, 1999, Barber, 1998). Egy-szénatomos transzfer reakciókhoz és NADH-generációhoz ez a forma szubsztrátot jelent. Az exogén FA eliminálása is az alkohol dehidrogenáz feladata. A kapacitását meghaladó FA bizonyítottan citotoxikus, mutagén (Grafström, 1990) és klasztogén (Merk, 1998, Speit, 2000). A citotoxikus és genotoxikus hatásokért egyrészt a nukleáris DNS és hisztonfehérjék között képződött DNS-fehérje keresztkötések (Voitkun, 1999) perzisztálása lehet felelős. Másrészt fontos lehet a replikációban (Permana, 1994) és a DNS-reparációban (Grafström, 1986) szereplő enzimek FA-okozta kémiai módosítása is, mely genetikai instabilitáshoz vezethet. Az in vitro megfigyelt G→A tranzíciós mutációknak és bázis miszinkorporációnak a deoxiguanozin FA-indukálta N²-metilációja lehet az oka (Snyder, 1986). Állatkísérletes megfigyelés, hogy a belélegzett levegőben nagyobb koncentrációban (≥6 ppm) alkalmazott FA patkányok és

egerek orrüregében elszarusodó laphámrákot tud okozni (Casteel, 1987). Egy nemrégiben kiértékelt, USA-ban készült eset-kontroll tanulmány nazofaringeális elszarusodó laphámrák magasabb előfordulási arányát állapította meg emberben is munkahelyi FA-expozíció esetén, mely korrelált a FA kumulatív dózisával (Vaughan, 2000). Bőrtumorok fokozott rizikójára FA-expozíciót követően nincs ismert epidemiológiai bizonyíték, ámbar bonctermi dolgozók között a bőrtumorok magasabb mortalitással járó megjelenési formáit tapasztalták (Walrath, 1983).

Grafström (1990) közölte, hogy az N-metil-N-nitrozourea okozta DNS-károsodás bronchiális sejtekben 100-300 μM FA jelenlétében nem tudott kijavítódni. Ehhez hasonlóan röntgen-besugárzást követően a FA jelenléte az egyszálú DNS-törések újrakapcsolódását és UV-irradiáció után a NER során a reparációs DNS-szintézist gátolta (Grafström, 1983). Heck (1999) kimutatta, hogy a FA-indukálta DNS-protein keresztkötések (DPC) gátolni tudják a DNS-polimerázt, sőt a teljes replikációs komplexet, illetve a DNS-struktúrát moduláló topoisoméráz II-t is. Ezek magyarázhatnák a FA-nek az UV-sugárzás utáni reparációra kifejtett esetleges gátló hatását bőrsejtekben.

Az egyszálú, illetve kétszálú DNS-törések, alkali labil helyek kimutatására az alkalikus comet-assay használatos mint nagyon érzékeny metódus (Collins, 1997, Slamenova, 1997). Alkalmassnak bizonyult limfocitákban, FB-ban, HaCaT KC-ban UVA-irradiáció által okozott DNS-károsodás detektálására, illetve a sejtek NER képességének vizsgálatára UVC- és UVB-irradiáció után (Alapetite, 1996, Henriksen, 1996, Lehmann, 1998). Ezenkívül az assay-vel tanulmányozhatók a DNS-DNS, DNS-fehérje típusú keresztkötések is, ha az UV-irradiációt egyszálú DNS-töréseket okozó ágenssel (MMS, ionizáló sugárzás) kombináljuk (Pfuhrer, 1999, Merk, 1999). Az MMS a DNS bázisainak N⁷-metilációját okozza, ez pedig abázikus helyeket eredményez. Ezek erős alkalikus környezetben labilisak, egyszálú DNS-töréseket formálnak a comet-assay során (Homme, 2000). Az ionizáló sugárzás közvetlenül DNS-száltöréseket indukál (van der Schans, 1983). A keresztkötések indukciója a DNS-törések comet-képző hatásának a csökkenésével arányos.

2. CÉLKITŰZÉSEK

I. Fotokemoterápia (PUVA) hatására bekövetkező DNS-károsodás és reparáció vizsgálata

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

b) Hogyan viszonyul a PUVA okozta DNS-károsodás és reparáció az UVB-, illetve az UVA-sugárzás ilyen irányú biológiai hatásához hiperproliferatív KC modell HaCaT (immortalizált humán keratinocytá)-kultúrákban? Eredményeinket az UVB és UVA tekintetében az irodalomból ismert adatokhoz viszonyíthatjuk, a PUVA esetében viszont elsőként választottuk az ezen assay-vel szerezhető új információk előnyeit a terápia hatásmechanizmusának, illetve karcinogenitásának kutatásában.

II. UV-irradiációt követő DNS-károsodás összehasonlító vizsgálata normál humán MC-ban és FB-ban kromoszóma-károsodás (MN-indukció) tanulmányozása segítségével

a) Klinikailag relevánsan alacsony dózisu UVB- és UVA-sugárzás indukál-e MN-t humán FB-ban és MC-ban? Ha igen, ennek hatékonysága mennyire tér el a γ -sugárzás hatásosságától? Nincsenek UVB-re vonatkozó adatok normál, nem-transzformált humán bőrsejteket illetően, és nem ismert, hogy az UVA-sugárzás is képes-e vajon kromoszómakárosodás indukálására.

b) Alkalmazható-e, illetve módosításokkal alkalmassá tehető-e egy korábban leírt multiparametrikus áramlási citometriás módszer (FCM, Wessels és Nüsse, 1995) a MN-képződés mérésére ezekben a sejt kultúrákban? A módszer objektivitása, gyorsasága, jobb statisztikai kiértékelhetősége mellett ad-e a partikulumok DNS-tartalmának mérése új információt a sejtben bekövetkező változásokról?

III. FA által okozott, illetve FA által módosított, UV-irradiáció indukálta DNS-károsodás és reparáció összehasonlító vizsgálata normál humán KC-ban és FB-ban

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

b) Van-e különbség a FB-ban és a KC-ban végbemenő DNS-károsodás és reparáció között UVC-, UVA- és szoláris szimulált UV (UVB+UVA)-sugárzást követően comet-assay-vel vizsgálva? Azonos kísérleti körülmények között végzett ilyen típusú összehasonlító vizsgálat még nem történt.

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

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

a. Sejttenyésztés

Összehasonlító vizsgálatainkhoz MC-t és FB-t újszülöttek (II. bőrtípus) urológiai osztályon eltávolított praeputiumának bőréből nyertük Liu és Karasek (1987) módosított módszerével. A bőrt a kötőszövettől megtisztítva apró darabokra vágtuk és tripszin oldatban (0.25 % tripszin, 0.15 M NaCl, 0.04 M KCl, 0.1 % glükóz, pH 7.5) inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Ezt követően a bőrdarabokat sejttenyésztő médiumba tettük, és az epidermiszt elválasztottuk a dermisztől. MC tenyészetekhez az epidermális sejtszuspenziót Eisinger és Marko (1982) leírása szerint növesztettük tovább, Halaban módosításaival (1986). A médium alapja Ham's F-10 volt, kiegészítve 10 nM 12-O-tetra-dekanoil-forbol-13-acetáttal, 2.5 nM kolera-toxinnal, 0.1 mM izobutil-metil-xantinnal, 5 % újszülött borjú szérummal (Hyclone, Logan UT), 100 IU/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel. Ha a kultúrákban megjelentek FB, a tenyészeteket geneticinnel (100 µg/ml) kezeltük 48-72 órán át. A dermiszből nyert FB-at 10 % újszülött borjú szérummal, 100 IU/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel kiegészített Ham's F-10-ben növesztettük tovább 37 °C-on, 5 % CO₂-atmoszférán. Hetente kétszer cseréltünk médiumot. A sejtnövekedést fázis-kontraszt mikroszkóp alatt ellenőrizve log-fázisban tartottuk fenn. A kultúrákat a kísérleteinkhez 2-9 passzálás között használtuk.

HaCaT sejttenyészeteket felhasználó kísérleteinkhez az immortalizált KC sejtvonalat DMEM sejttenyésztő médiumban tartottuk fenn, mely 10 % újszülött borjú szérumot, penicillint és streptomycint tartalmazott.

KC-t és FB-t felnőtt, egészséges (II-III. bőrtípusú egyének), napfénytől védett (emlőplasztikai műtétekből) normál bőréből nyertünk. A bőrt a fentebb leírtakkal megegyező módon dolgoztuk fel, de ez esetben az epidermális sejtek szuspenzióját mitomycin-kezelt (23.9 µM) humán FB kultúrára szélesztettük FAD2 sejttenyésztő médiumban (DMEM és Ham's F-12 (3:1) kiegészítve újszülött borjú szérummal, adeninnel, inzulinnal, trijód-tyroninnal, hydrocortisonnal, epidermális növekedési faktoral, kolera-toxinnal, penicillinnel és streptomycinnel). A KC-at 37 °C-on, 10 % CO₂ atmoszférán tartottuk fenn. Szubkonfluens kultúrák elérésénél a FB-at 0.02 % EDTA hozzáadásával távolítottuk el (4 perc, 37 °C), majd a sejteket szérummentes KC médiumban (KGM, Clonetics, US&Can) tenyésztettük tovább. Passzáláshoz 0.1 % tripszint és 0.02 % EDTA-t alkalmaztunk (5 perc, 37 °C). A sejteket 2-3 passzálás után használtuk fel kísérleteinkhez. A FB nyeréséhez az apró bőrdarabkákat Petri-

csészébe lefektetve tenyésztettük RPMI 1640 médiumban (Biochrom KG, Berlin, Németország) kiegészítve 10 % újszülött borjú szérummal és penicillinnel, streptomycinnel, 37 °C-on, 5 % CO₂ atmoszférán. Passzáláshoz a sejt kultúrákat 0.05 % tripszinnel és 0.02 % EDTA-val kezeltük (4 perc, 37 °C). A továbbiakban szérummentes FB sejttenyésztő médiumot használtunk (FGM, Promocell, Heidelberg, Németország). Kísérleteinkhez a 3-7. passzázs sejteit használtuk.

b. UV-irradiáció

MC és FB vizsgálatokhoz az UVB irradiációhoz 3 darab, egyenként 40 W Philips TL-01 fluoreszcens csövet (Philips Nederland BV, Eindhoven, Hollandia) használtunk, melyek főleg 313 nm UVB-sugárzást biztosítottak (Sternborg és mts., 1988). A dózis-ráta 3 W/m² volt. Az UVB besugárzás alatt a Petri-csészék tetejét eltávolítottuk. UVA-irradiációra egy Sellas Sunlight lámpát (típus 2001, Sellas, Gevelsberg, Németország) alkalmaztunk UVB-filterekkel (UVASUN kék lemez és UVASUN kék film) felszerelve a 340 nm alatti sugárzás kizárására. A filtereket is figyelembe vevő emissziós spektrumot egy optikus spektrométer (Philips Drachten, Hollandia) segítségével határoztuk meg. A dózis-ráta 70 W/m² volt. Az aktuális sugárzás mérésére IL-700 kutató radiométert használtunk (International Light Inc., Newburyport, MA) SEE 400 detektorral, melyhez WBS 320 filtert alkalmaztunk. A ⁶⁰Co γ -irradiáció 3.3 Gy/perc dózis-rátával volt biztosítható. A kontroll minták azonos körülmények között, de sugárzástól védve voltak kezelve.

HaCaT sejtes kísérleteinkben UVB (313 nm) sugárzást Philips TL-01 csövek (0-60 mJ/cm²), UVA (320-400 nm) sugárzást (0-5 J/cm²) Waldmann PUVA 800 lámpa (H. Waldmann GmbH&Co., Németország) biztosítottak.

A KC és FB vizsgálatokhoz az UVC irradiációhoz (254 nm) UV Stratalinker 2400 (Stratagene, 2 mW/cm², 3 és 4 mJ/cm², 15 cm irradiációs távolság) készüléket alkalmaztunk. 365 nm UVA besugárzást egy CAMAG Deluxe (alacsony nyomású Hg) UV-lámpa (Muttensz, Svájc, 2 mW/cm², 3 J/cm², 6.5 cm irradiációs távolság) biztosított. Széles spektrumú UVB besugárzás UVC blokkoló filterrel felszerelt ORIEL xenon arc szoláris szimulátor (Oriel Corporation, Stratford, CT, USA, Model 81160) segítségével történt. A 30 mJ/cm² UVB (290-320 nm) irradiációt 7.5 cm távolságról adtuk le (1.00 mW/cm²). Az UVA részaránya (320-400 nm) 0.24 J/cm² (8.00 mW/cm²) volt. A sugárzás intenzitásának mérésére IL-1400A radiométert használtunk (International Light, Inc., Newburyport, MA, USA) Solar Blind

vákuum (SEL 240, 185-310 nm) és UV stabilizált szilikon (SEL 033, 310-390 nm) fotodióda detektorokkal. Az UVC és UVB besugárzás idejére a Petri-csészék tetejét eltávolítottuk.

c. Comet-assay (üstökös-assay, egy sejt gél-elektroforézis, SCGE)

A sejteket 10^4 sejt/cm² sűrűségben 24 ó-val a besugárzás, illetve kémiai expozíció előtt Petri-csészékben (d=3,5 cm) szélesztettük. A 8-MOP-t a sejttenyésztő médiumban 300 ng/ml végkoncentrációban alkalmaztuk 2 órás inkubációs idővel. A formaldehid (FA) (Merck) különböző koncentrációit sérülésmentes médiumban adtuk a sejt kultúrákhoz. A FA kereszt kötő kapacitásának meghatározására a sejtekhez a FA-kezelés után metilmetánszulfonátot (MMS) (250 μ M) adtunk és a kultúrákat 30 percig inkubáltuk. Besugárzás előtt a médiumot PBS-re (1 ml) cseréltük. Az alkalikus üstökös-esszét Collins (1997) leírása alapján alkalmaztuk. A sejteket tripszinizálással távolítottuk el a Petri-csésze aljáról, majd beágyaztuk alacsony olvadáspontú agaróz gélbe (0.5 %) egy normál olvadáspontú agarózzal bevont csiszolt tárgylemezen. A sejteket ilyen formában egy éjszakán át 4 °C-on lízisnek tettük ki (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 % N-lauroyl-szarkozinát, 1 % Triton, 2 % DMSO, pH 10). Ezután a lemezeket erősen alkalikus oldatban (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13.0) vagy neutrális assay esetén pH 8.0 (89 mM Tris, 89 mM bórsav, 2 mM EDTA) oldatban hagytuk equilibrálódni 25 percig, melyet elektroforézis követett (21 V (0.86 V/cm), 300 mA, 25 perc). Neutralizálás (0.4 M Tris, pH 7.5) után a sejtmagokat etídium-bromiddal (EB) festettük (20 μ g/ml). Az üstökös hosszát, intenzitását fluoreszcens mikroszkóp (Leica, Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) alatt értékeltük ki, reprezentatív mintákat fotodokumentáltunk. A sejtmagokat 4 kategóriába soroltuk, (i) sejtmag üstökös nélkül, (ii) sejtmag üstökössel, melynek hossza nem nagyobb a sejtmag kétszeresénél, (iii) sejtmag üstökössel, melynek hossza nagyobb a sejtmag kétszeresénél és (iv) sejtmag üstökössel, melynek hossza nagyobb a sejtmag háromszorosánál. Lemezenként legalább 1x100 sejtmagot tanulmányoztunk.

d. Mikronukleusz (MN)-assay

Fluoreszcens mikroszkópos meghatározáshoz üveg tárgylemezeken, áramlási citometriai mérésekhez Petri-csészékben 4×10^3 sejt/cm² sejtsűrűséggel exponenciálisan növekvő sejteket szélesztettünk. A FB-at 24 órával, a MC-at 72 órával később irradiáltuk PBS-ben. A besugárzást követően a sejteket ismét médiumban tovább tenyésztettük 37 °C-on és 5 % CO₂-atmoszférán. A MN-képződést a FB-ban 4, a MC-ban 8 nappal később vizsgáltuk.

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

Az áramlási citometriai méréshez a sejtmagok és a MN szuszpenzióját Wessels és Nüsse (1995) módszere szerint, néhány módosítással készítettük elő. $3-6 \times 10^5$ sejt pelletjéhez 0.5 ml I. oldatot (10 mM NaCl, 3.4 mM Na-citrate, 10 mg/l szarvasmarha pancreas eredetű RNase A és 0.03 % (v/v) Nonidet P-40) adtunk, majd 1.3×10^{-5} M végkoncentrációig EB-ot (Sigma). Másfél óra szobahőmérsékleten és sötétben történt inkubálás után a mintához 0.5 ml II. oldatot (71.4 mM citromsav, 0.25 M szukróz és 2 mM EDTA) adtunk. A további tárolás 4 °C-on történt, a mérést következő napon végeztük el. A sejtmembrán festésére 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién (DPH) (Sigma) fluoreszcens festéket alkalmaztunk, melyet a mérés előtt csak 3-4 órával adtuk a mintához 1.1×10^{-4} M végkoncentrációban.

Az áramlási citometriai mérést egy Epics Elite (Coulter, Luton, UK) készülékkel végeztük, mely két Ar⁺-ion laserrel volt felszerelve, 480 nm és 351/363 nm laser emittálására az EB illetve a DPH excitációs spektrumának megfelelően. A két festék excitációjához időkéssleltetést (~40 usec) vezettünk be a két laser-nyaláb közé. Ez a beérkező jelek közötti élesebb elkülöníthetőséget eredményezte. Az alkalmazott optikai filterek egy 630 nm hosszú hullámhosszat átengedő filter és egy 450 nm sávot átengedő filter kombinációban egy 550 nm hosszú átengedő dikroikus tükörrel az EB, illetve a DPH jelrögzítés céljából. Az EB átlag fluoreszcencia intenzitását a G1-fázisú sejtmagoknak 2000 fluoreszcencia egységnél állítottuk be. A mérés triggereként a sejtmagok EB-fluoreszcenciájának 0.05 %-át határoztuk meg. Az adatokat listmode-ban rögzítettük az Elite software segítségével. Bivariáns logDPH-logEB dot plot-ton egy MN-at és sejtmagokat optimálisan befogó kapuban mintánként 1500 partikulát értékeltünk (6000-12000 összes adat). A kapun belüli részecskéket a görbe alatti terület (pulse area) és jelintenzitás (peak signal) alapján a sejtciklusra vonatkozó adatokra is elemeztük, a sejtmag összecsapódásokra korrigálva (Bauer és Boezeman, 1983). Adott EB- és DPH-fluoreszcencia intenzitással rendelkező partikulákat különgyűjtöttünk (sorting) tárgylemezen (500-1000 adat) és fluoreszcens mikroszkóp alatt azonosítottuk, hogy mely régióba esnek a MN, a nukleuszok, illetve a sejttörmelék.

Egy-egy sejt kultúrában a MN és a G2/M-fázisban lévő sejtmagok százalékos arányát meghatároztuk. A G2/M-fázisú magokat mint a G1-fázisú magok DNS-tartalmának kétszeresét tartalmazó részecskéket határoztuk meg. A MN-előfordulásból kivonva a háttér (nem irradiált minta), 3-5 független kísérlet eredményeit a dózis függvényében ábrázoltuk. Az

adatok regressziós analízise Windows 95 Microsoft Excel 5.0a software segítségével történt. Statisztikai szignifikanciát Student's t-tesztel számoltunk ($p < 0.05$).

A FA-expozíció és az UV-sugárzás együttes hatásának vizsgálatakor elvégzett kísérleteinkben a FB-at ugyancsak tárgylemezen szélesztettük (10^3 sejt/cm²) 24 ó-val a kísérlet előtt. A sejteket szérumentes médiumban (FGM) 6 órára FA-expozíciónak tettük ki, majd PBS-re cserélve a médiumot besugarztuk UV-fénnyel. Ezután a sejteket RPMI médiumban engedték osztódni 72 órán át (1-2 sejtciklus). A lemezeket PBS-ben mostuk, majd hypotóniás oldatba (0.1 M NaCl, 1.7 mM KCl) helyeztük, végül metanolban (5 perc, -20 °C) és acetonban (10 másodperc, -20 °C) fixáltuk. A mintákat EB festés (20 µg/ml) után fluoreszcens mikroszkóp alatt elemeztük. A MN intakt interfázis sejtben mint a sejtmagtól teljesen elkülönülő, de ugyanazon fluoreszcencia intenzitást hordozó partikulák jelentek meg, átmérőjük 1/8-1/2-e a sejtagnak (Cornforth és Goodwin, 1991). Tárgylemezenként legalább 4x500 sejtet értékeltünk.

e. Proliferációs assay

A FB-at és a KC-at szérumentes FGM-ben, illetve KGM-ben tenyésztettük 96-lyukú plate-ekben (Nunc, Wiesbaden, Németország) 3×10^4 /cm² (200 µl/lyuk) sejtdenzitással szélesztve ki a sejteket. A sejtkoncentrációkat a sejtek mikroszkóp alatti (Bürker-kamra) számolásával ellenőriztük. 24 ó inkubáció (5 % CO₂, 37 °C) után friss médiumra cseréltük az elhasználtat, amelyhez az esetek egy részében FA-t (10 µM) adtunk. A FA-expozíció végén a médiumot ismét lecseréltük, ez esetben 10 % (v/v) alamarBlueTM-t (Biosource, Nivelles, Belgium) tartalmazó tápfolyadékra. A festék redukciót, mely a fluoreszcencia intenzitás növekedésében nyilvánult meg, 4, 8, 12, 24 óra múlva spektrofluorimetriával (FL1000TM, Dynatech Laboratories, Sullyfield, Virginia, USA) mértük (560 nm excitációs és 590 nm emissziós hullámhosszon). A méréseket kvadruplikátumokban végeztük. A háttér fluoreszcenciát sejtmentes, reagenst tartalmazó tápfolyadékra határoztuk meg. Adatainkat az átlag mérési eredményt és a standard deviációt kiszámolva, a háttérre korrigálva relatív fluoreszcens egységekben (RFU) adtuk meg. Az alamarBlueTM fluoreszcencia és sejtszám összefüggését korrelációs analízis alapján határoztuk meg (Excel 97). A Pearson korrelációs koefficiens (R) és a kapcsolt szignifikancia valószínűségét (p) meghatároztuk minden időpontra.

f. Statisztikai analízis

Az üstökös-assay-ben a relatív DNS-migrációt tárgylemezenként 100 sejtet analizálva határoztuk meg 0-3-mal megszorozva a fentebb definiált üstökös kategóriáknak megfelelően (Collins, 1997, Slamenova, 1997). A kísérleteket akkor értékeltük ki, ha a sejtmagok $95\pm 5\%$ -ának nem volt üstökös migrációja a kontroll mintában. A MN-képződést mint MN-szal rendelkező sejtek százalékos arányát adtuk meg. Az adatokat mint $\text{átlag}\pm\text{az átlag standard hibája (SEM)}$ jelenítettük meg. Statisztikai szignifikancia számolásához Student's t-próbát ($p<0.05$) alkalmaztunk. Az adatok regressziós analízisét a FA-okozta keresztkötések esetén a Microsoft Excel 97 program segítségével végeztük.

4. EREDMÉNYEK

- a) Fotokemoterápia (PUVA) hatására bekövetkező DNS-károsodás és reparáció

HaCaT sejteket vizsgálva alkalikus comet-assay-vel, üstökös-képződést (ssbs, alkali labil helyek) közvetlenül az irradiációt követően csak UVA-besugárzás (5 J/cm^2) esetén láttunk (**1. a) ábra**). A DNS-migráció másfél órával később már csaknem teljesen eltűnt, jelezve az indukált DNS-károsodás gyors reparációját. UVB-irradiációt (60 mJ/cm^2) követően DNS-migrációt csak fél óra múlva kezdtünk észlelni (**1. b) ábra**). Ez arra utalt, hogy a comet-assay itt nem direkt DNS-károsodást mutat, hanem inkább az indukálódott NER következtében időlegesen megjelenő egyszálú DNS-töréseket. Ahogy a DNS-szálak újraszintetizálódtak és kapcsolódtak, az üstökös-képződés ismét eltűnt. Az alkalikus comet-assay önmagában nem bizonyult alkalmasnak a fotokemoterápia alatt bekövetkező DNS-törések követésére. Neutrális comet-assay-vel, amellyel DNS-kettősszálú töréseket tudunk kimutatni, úgy tűnt, hogy sem az UVA-, sem az UVB-irradiációt követően nem keletkeztek ilyen típusú DNS-léziók. Ezzel szemben 8-MOP-nel (300 ng/ml) előkezelve a sejteket, majd UVA-val (2 J/cm^2) besugarazva őket (PUVA) a neutrális assay eredményei szerint DNS-kettősszálú törések jöttek létre másfél órával később, nem azonnal a besugarazást követően (**2. ábra**).

- b) Kromoszóma-károsodás összehasonlítása MC-ban és FB-ban γ -, UVB- és UVA-irradiációt követően

A MN-képződés humán bőrsejt-kultúrákból történő áramlási citometriai méréséhez az 1995-ben Wessels és Nüsse által leírt metódust némileg módosítottuk a magok, sejtmagok és a nemspecifikus sejttörmelék jobb elkülönítése céljából. Így pl. szükséges volt, hogy a sejtlízis számára hosszabb időt adjunk a magok és MN elkülönüléséhez, hogy 1 mM EDTA-nak a mintához adásával védjük a MN-at a felszabaduló endonukleázoktól, és hogy időkéselettetett kettős laser áramlási citometriát alkalmazzunk (**3. ábra**). A MN elhelyezkedését a DPH/EB dot plot-ton sorting segítségével határoltuk be. Jellemzően ezek a részecskék a sejttörmelékhez képest alacsonyabb DPH-fluoreszcenciát mutattak, illetve a G1-fázisú sejtmagok DNS-tartalmát jelző EB-fluoreszcenciának 1-20 %-val rendelkeztek.

Előkísérletek során meghatároztuk azt az irradiáció utáni optimális mérési időt, amikor a sejtek nagy részében a sejtosztódás már megtörtént, lehetővé téve a MN-képződés mérését, de a minta még nem hígult fel többszöri sejtosztódással. Mivel ezen paramétert az irradiáció dózisa befolyásolja, a legnagyobb alkalmazott dózis esetén legmegfelelőbb időpontot

választottuk. Ezek a dózisok nem okoztak 50 %-nál nagyobb sejthalált egyik irradációs típusban sem. Mikroszkópos értékelést használva megállapítottuk, hogy FB számára 4 nap, MC számára 8 nap volt az optimális.

A MC-ban γ -irradiációt követően 9 Gy dóziséig, FB-ban 4 Gy dóziséig láttunk fokozatos éles emelkedést a MN-képződést illetően (**4. a) ábra**). FB-ban $1,1 \text{ J/cm}^2$ dóziséig lineáris dózis-válasz összefüggést tapasztaltunk UVB-irradiáció után is. MC-ban nagyobb UVB-dózisok voltak szükségesek (2 J/cm^2 -ig) ahhoz, hogy körülbelül a FB-ban mért MN-frekvenciának megfelelő MN-indukciót elérjük (**4. b) ábra**). A maximum MN-indukció FB-ban $1,27 \pm 0,24 \%$ volt, MC-ban $1,1 \pm 0,24 \%$. A G2/M-fázisú sejtmagok aránya szintén növekedett a dózissal. A növekedés ugyanazon ionizáló sugár- vagy UVB-dózist tekintve magasabb volt FB-ban, mint MC-ban.

Az áramlási citometriai metódus beállítása és eredményeink alátámasztása érdekében fluoreszcens mikroszkóp alatt is ellenőriztük a MN-indukciót. FB-ban lineáris dózis-válasz összefüggést tapasztaltunk a MN-képződés tekintetében UVA-irradiációt követően is ($0-30 \text{ J/cm}^2$) (**5. ábra**). A maximum MN-előfordulás a kontroll MN-előfordulás körülbelül kétszerese volt ($p < 0,05$). Mikroszkópos vizsgálatokkal számszerűen magasabbnak adódott a MN-frekvencia az áramlási citometriával kapott eredményhez képest identikus dózisokat tekintve. A G2/M-fázisú sejtek aránya szintén dózis-dependens módon növekedett, körülbelül 20 %-ig, ahogyan azt az áramlási citometriai mérések mutatták. MC-ban UVA-irradiáció után nem volt észlelhető MN-indukció, sem sejtciklus-késleltetés.

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

Comet-assay

A FA $0-100 \mu\text{M}$ koncentrációban 20 óra alatt detektálható DNS-migrációt, azaz DNS-száltöréseket, alkali labil helyeket nem indukált sem a KC-ban, sem a FB-ban. Egy rövid MMS-expozíció ($250 \mu\text{M}$, 30 perc) szignifikáns ($p < 0,001$) DNS-károsodást, és ezzel comet-képződést hozott létre mindkét sejttypusban. A sejtek FA-del való előkezelése ($0-100 \mu\text{M}$, 4 illetve 8 órás inkubáció) az MMS-okozta DNS-vándorlás mértékének egyenes arányos csökkenését idézte elő a DPC produkciója révén ($R^2 > 0,95$) (**6. ábra**).

3 mJ/cm^2 UVC-besugárzás után közvetlenül comet-assay-vel detektálható DNS-károsodást (ssbs, alkali labil helyek) nem láttunk sem KC-ban, sem FB-ban, hasonlóan HaCaT-sejteken UVB-vel végzett korábbi kísérleteinkhez. 30 perc elteltével DNS-migráció

vált láthatóvá, legvalószínűbben a NER indukálódása révén (**7. ábra**). Ezután üstökös-képződés még 1-2 óráig látható volt az assay-vel, azonban az idő teltével egyre kisebb mértékben, 6 óra alatt a kontroll szintre lecsökkenve. Sejt-szinten a magok az irradiációt követő 0.5-5 órában eléggé nagy heterogenitást mutattak a DNS-migráció mértékét illetően mindkét sejttípusban (részleteket nem mutatjuk). A két sejttípus között nem volt szignifikáns különbség a DNS-reparációs kinetikában. Ezzel ellentétben FA jelenléte KC-ban már 0.5 órával a besugárzás után, FB-ban 4.5 órával a besugárzást követően szignifikáns különbséget eredményezett az UVC-okozta DNS-migrációban. 20 órával az irradiáció után még FA-expozíció esetén sem volt látható DNS-vándorlás.

3 J/cm² UVA-besugárzást követően mindkét sejttípusban azonnal szignifikáns DNS-károsodás volt mérhető, csakúgy, mint korábban a HaCaT sejtekben (**8. ábra**). Ám ez a DNS-károsodás most is gyorsan, mindössze 1 óra alatt eltűnt a sejtekből. FA-expozíció nem befolyásolta sem a DNS-károsodás mértékét, sem a DNS-reparációt.

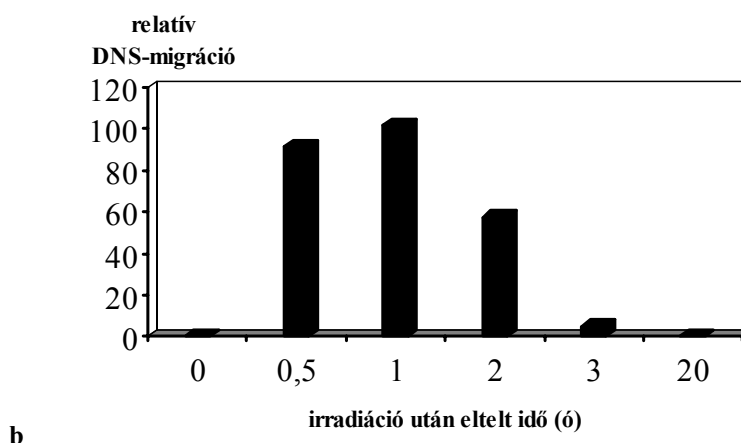
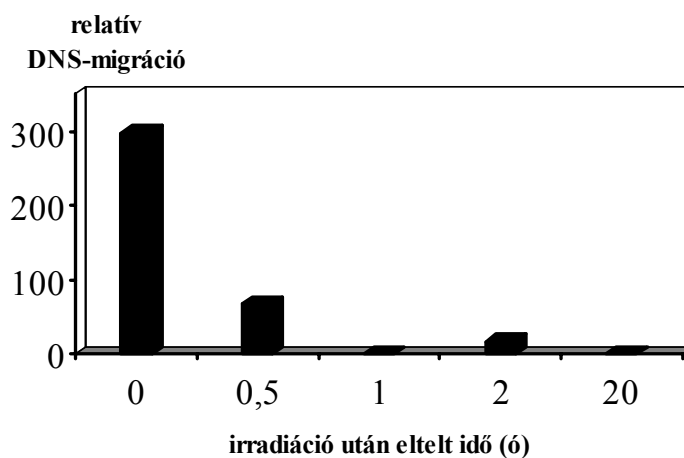
0.24 J/cm² UVA-val kísért 30 mJ/cm² UVB-irradiáció (szoláris szimulált UV) az UVC-besugárzás hatásához hasonló változásokat hozott létre (**9. ábra**). Az üstökös-képződés a besugárzás után 0.5-2 órával vált láthatóvá, ám ez esetben hamar, már 3 óra múlva le is csökkent a kontroll szintjére. 10 µM FA-expozíció a szoláris irradiációt megelőzően szignifikánsan (p<0.05) hosszabb üstökösöket eredményezett a csak besugárzott mintákhoz képest 0.5-3 órával az irradiációt követően mind FB-ban, mind KC-ban.

Proliferáció

10 µM FA-expozíció nem okozott szignifikáns változást a sejtek proliferációjában a kontrollhoz képest (**10. ábra**). UVC-irradiáció után a sejt kultúrákban a proliferáció csökkent, a FB-ban erőteljesebben, a KC-ban kisebb mértékben (**11. ábra**). A FA-előkezelés a FB-ban tovább erősítette az UVC-irradiáció negatív hatását figyelembe véve a besugárzás után 4, illetve 24 órával mért proliferációs rátákat. Ezzel szemben KC-ban az irradiációt követő azonnali, illetve 1 óra múlva mért toxicitás erősödött fel az AlamarBlueTM fluoreszcencia intenzitást alapul véve. Az UVA-besugárzás nem befolyásolta szignifikánsan a sejtproliferációt. FA hatására is csak kissé csökkent a sejtek növekedése (**12. ábra**). A szoláris UV-irradiáció (UVB+UVA) sem változtatta meg számottevően a proliferációt a sejtekben. FA-előkezelés is csak kis mértékben csökkentette a sejtnövekedést (**13. ábra**).

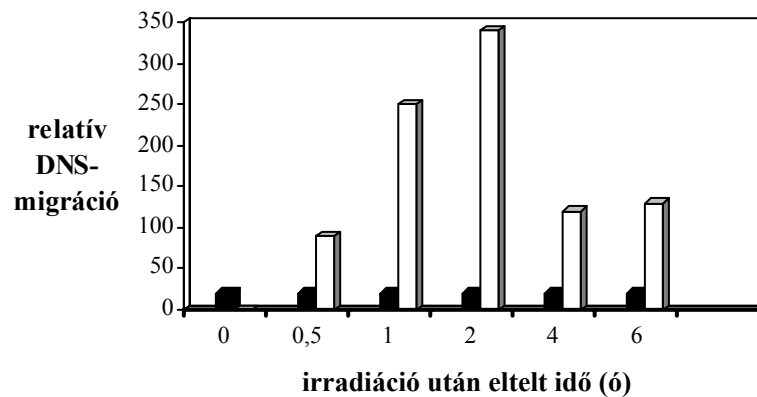
MN-képződés

A MN-képződést FB-ban vizsgáltuk UVC-irradiáció után (**I. tábl.**). A mérés optimális idejét befolyásolja az adott sejtre jellemző sejtciklus-idő és a MN-t indukáló ágens is (l. lentebb). Kísérleteinkben a besugárzást (4 mJ/cm^2 UVC) követően 72 óra elmúltával találtuk szignifikánsan emelkedettnek a MN-t tartalmazó sejtek arányát. $12,5 \text{ }\mu\text{M}$ FA önmagában nem okozott fokozott MN-indukciót. Ezzel szemben 6 óra inkubáció ilyen FA-koncentráció mellett szignifikánsan ($p < 0.05$) megnövelte az UVC-indukálta MN előfordulási gyakoriságát.



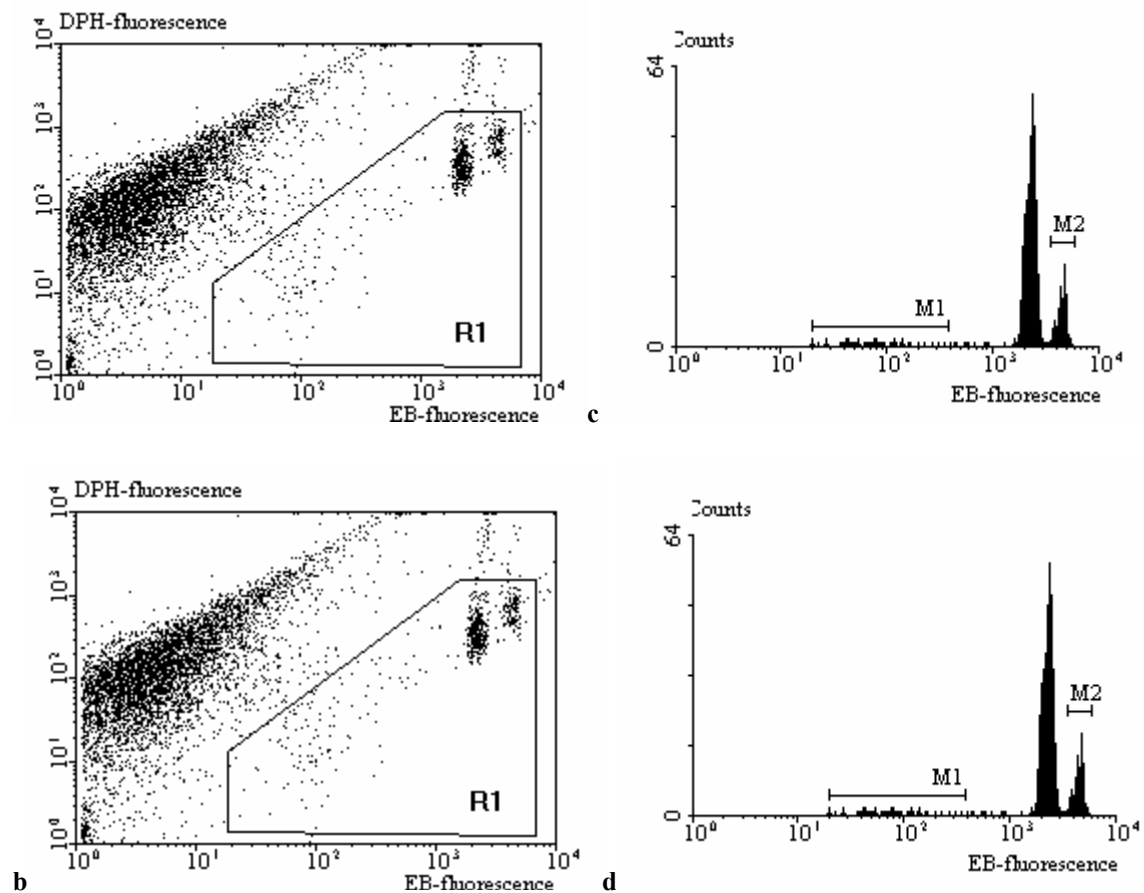
1. ábra UVA- illetve UVB-irradiáció által indukált DNS-károsodás és -reparáció HaCaT sejtekben alkalikus comet-assay-t alkalmazva a meghatározás módszereként.

UVA-irradiációt követően (3 J/cm^2 , **a) ábra**) comet-képződést ki tudunk mutatni a besugarzás előtt agarózba ágyazott, majd így irradiált sejtekben (0 ó), azaz azonnal létrejött ssbs-t, alkali labil helyeket detektáltunk. A comet-képződés mértékének időben való követése a kezdeti DNS-károsodás reparációjának kinetikájáról adott információt. A relatív DNS-migrációt mintánként 100 sejtet egy vizuális pontrendszer szerint kiértékelve határoztuk meg (l. Anyagok és módszerek). A kontroll (nem irradiált) mintákban a sejtmagok 95 ± 5 %-a nem mutatott üstökös-képződést. Az ábrákon egy-egy reprezentatív kísérlet eredményeit mutatjuk. UVB-irradiáció (30 mJ/cm^2 , **b) ábra**) esetén nem volt comet-képződés 0 ó-nál, a DNS-migráció időbeni változása a NER-ből eredő eseményeket reprezentálta. Neutrális comet-assay alkalmazásával sem UVA-, sem UVB-irradiáció nem mutatott így detektálható DNS-károsodást (nem mutatjuk).



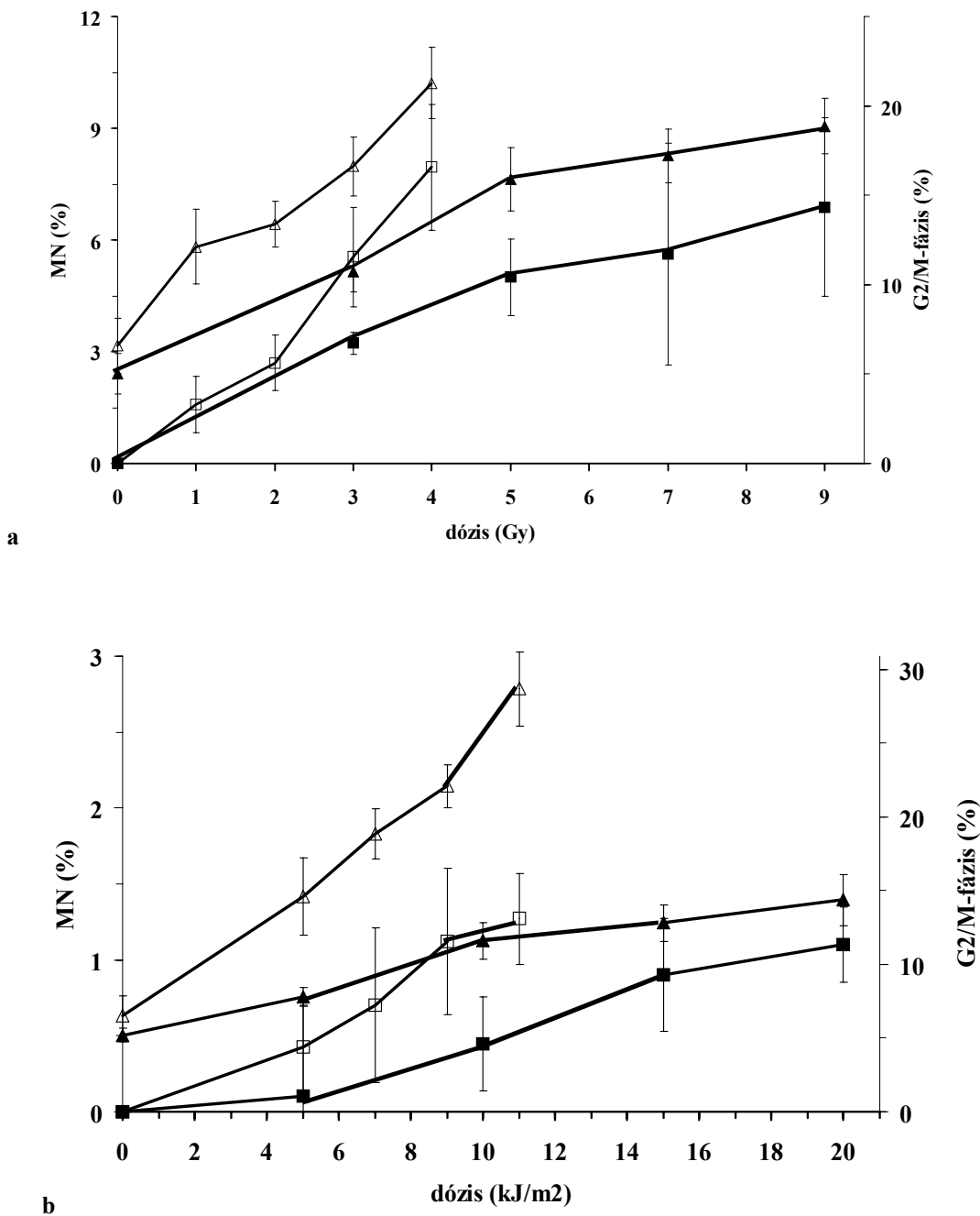
2. ábra PUVA (300 ng/ml 8-MOP+2 J/cm² UVA-irradiáció) által indukált DNS-károsodás és -reparáció HaCaT sejtekben.

Alkalikus comet-assay alkalmazásával (*telt oszlopok*) a PUVA-okozta DNS-károsodás nem volt vizsgálható. Neutrális comet-assay során (*üres oszlopok*) DNS-károsodásra utaló üstökös-képződés illetve időben változó, DNS-reparációs események zajlását sejtető DNS-migráció-változás volt észlelhető. A relatív DNS-migrációt mintánként 100 sejtet vizsgálva, vizuális pontrendszer szerint értékeltük (l. Anyagok és módszerek). A kontroll (nem irradiált) mintákban a sejtmagok 95±5 %-a nem mutatott üstökös-képződést. Az ábra reprezentatív kísérlet eredményét mutatja.

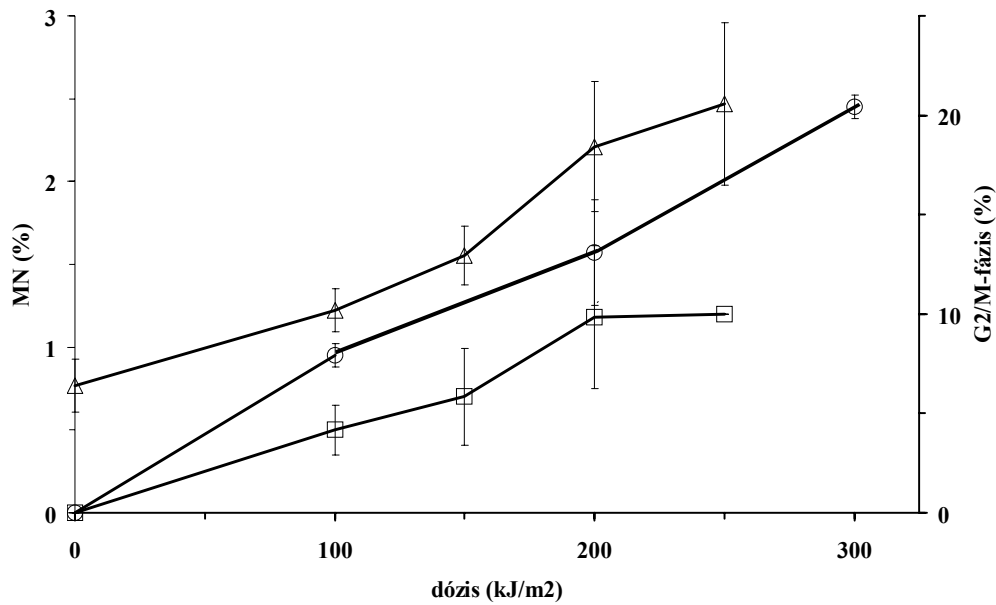


3. ábra Humán FB-ból származó sejtmag-MN szuszpenzió áramlási citometriai mérése, nem irradiált (*a,c*) illetve γ -irradiált (4 Gy; *b,d*) mintákban.

A dot plot-tok (*a,b*) DPH-fluoreszcencia intenzitást (relatív membrán-tartalom) ábrázolnak EB-fluoreszcencia intenzitás (relatív DNS-tartalom) függvényében, logaritmus skálákon. Az R1 ablak a nukleuszok és MN sejttörmelékktől való elkülönítését mutatja, amint azt sorting segítségével behatároltuk. Minden alkalommal 1500 részecskét értékeltünk a kikapuzott mintán (R1) belül (6000-12000 összes esemény). A histogramok (*c,d*) a részecskék DNS-tartalom szerinti megoszlását mutatják az R1 ablakon belül, a részecskék számát ábrázolják az EB-fluoreszcencia intenzitás (logaritmus skála) függvényében. A sorting során MN-nak bizonyultak a G1-fázisú sejtmagok DNS-tartalmának 1-20 %-val rendelkező részecskék (M1). A második csúcs (M2) a G2/M-fázisú sejtmagokat reprezentálja.



4. ábra MN-indukció (négyzetek, bal oldali y-tengely) és a sejtek akkumulálódása G2/M-fázisban (háromszögek, jobb oldali y-tengely) γ - (a) ábra illetve UVB- (b) ábra irradiációt követően. A MN és a G2/M-fázisú sejtmagok százalékos arányait a FB-ban (üres négyzet és háromszög) illetve a MC-ban (telt négyzet és háromszög) FCM mérésel határoztuk meg (1. Anyagok és módszerek, illetve 2. ábra). Mindegyik adatpont 4-5, egymástól független kísérlet átlag \pm SEM értékét mutatja. Ábrázolás előtt a nem irradiált mintákra mért MN-képződést (1.5 ± 0.3 % FB-ban és 1.0 ± 0.3 % MC-ban) kivontuk.

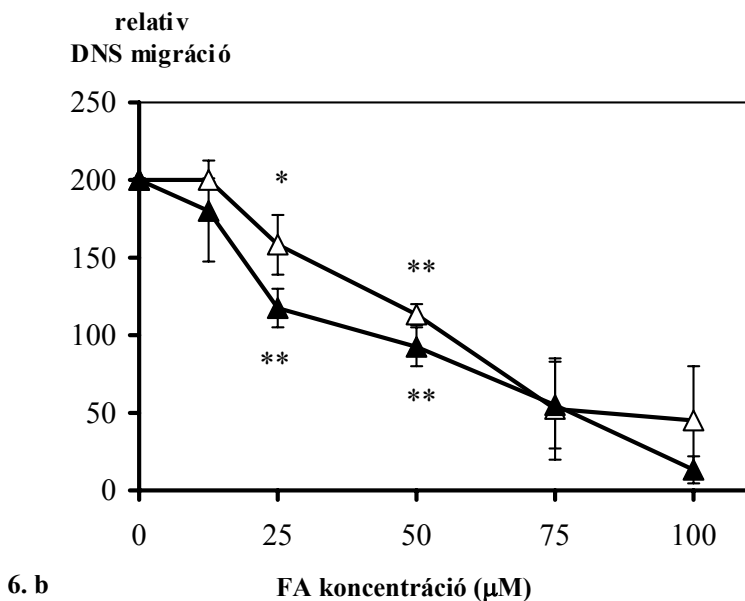
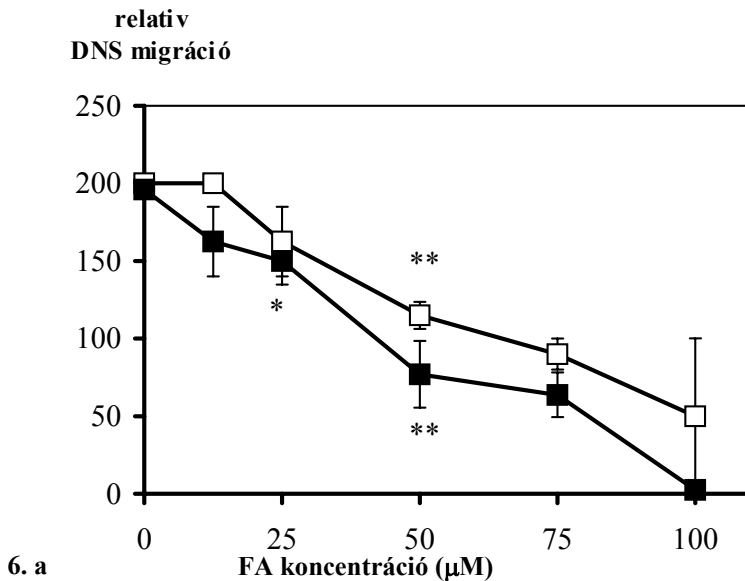


5. ábra MN-indukció (*bal oldali y-tengely*) és G2/M-fázisban való sejtciklus-késleltetés (*jobb oldali y-tengely*) tenyésztett normál humán FB széles-spektrumú UVA-besugárzását követően. A FCM (*négyzet*) és FM (*kör*) MN-assay-k érzékenységének összehasonlítása.

A nem irradiált kontroll mintákban mért MN-képződést (FB-ra ez 1.5 ± 0.3 %) kivontuk az ábrázolás előtt. A G2/M-fázisú sejtmagok százalékos arányát (*háromszög*) a FCM-metódus során állapítottuk meg a MN-méréssel egy időben, ugyanazon mintában. Mindegyik adatpont átlag \pm SEM értéket mutat 3-5, egymástól független kísérlet eredményeinek összegzéséből.

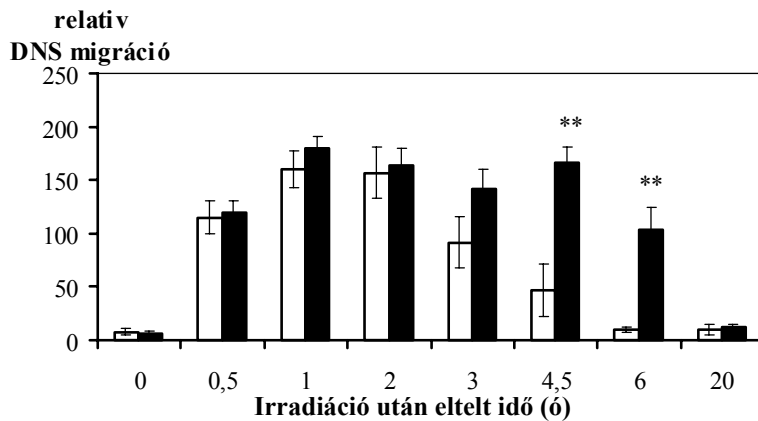
6. ábra FA DPC-t indukáló képességének meghatározása comet-assay segítségével normál humán bőrből származó FB-ban (**a** ábra) és KC-ban (**b** ábra).

Az adatpontok különböző koncentrációjú FA (0-100 μM) 4 ó (üres szimbólumok) illetve 8 ó (telt szimbólumok) expozíciója következtében módosult MMS által indukált comet-képződést mutatnak (átlag \pm SEM, n=4). A relatív DNS-migrációt vizuális pontrendszert követve, mintánként 100 sejtet kiértékelve határoztuk meg (1. Anyagok és módszerek). A kontroll (FA és MMS expozíció nélküli) mintákban a sejtmagok 95 \pm 5 %-a nem mutatott üstökös-képződést. A keresztkötő képesség tekintetében szignifikáns különbséget (*p<0.05, **p<0.01) észleltünk a FA-expozíciónak kitett és ki nem tett minták között az MMS-expozíció utáni DNS-migrációkat összehasonlítva. Nem volt szignifikáns különbség azonos FA-koncentrációkat tekintve a 4 ó illetve 8 ó expozíciók hatása, sem a két sejttípus között.

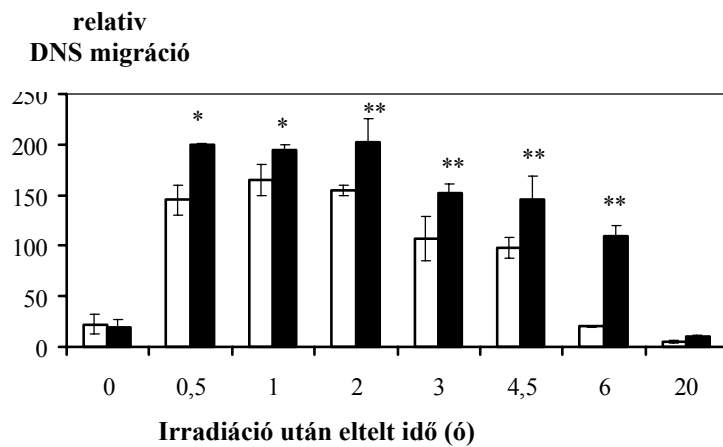


7. *ábra* FA hatása az UVC által indukált DNS-reparáció időkinetikájára FB-ban (*a) ábra*) és KC-ban (*b) ábra*).

UVC-irradiáció (3 mJ/cm², *üres oszlopok*) FB-ban és KC-ban is idő-specifikus változásokat indukált a DNS-migrációt tekintve a comet-assay során, a NER-ből eredő eseményeket reprezentálva. A 0 ó-kor, azaz az irradiációt követően azonnal mérhető DNS ssbs-t, alkali labil helyeket agarózba ágyazás után besugarazott sejteken tudtuk meghatározni. A reparációs kinetika 10 μM FA jelenlétében (*telt oszlopok*) megváltozott. Az adatok a relatív DNS-migráció átlag±SEM értékét mutatják (n=5). Szignifikáns (*p<0.05, **p<0.01) különbséget észleltünk a DNS-migrációt illetően a FA-expozíciónak kitett és ki nem tett UVC-irradiált minták között.



7. a

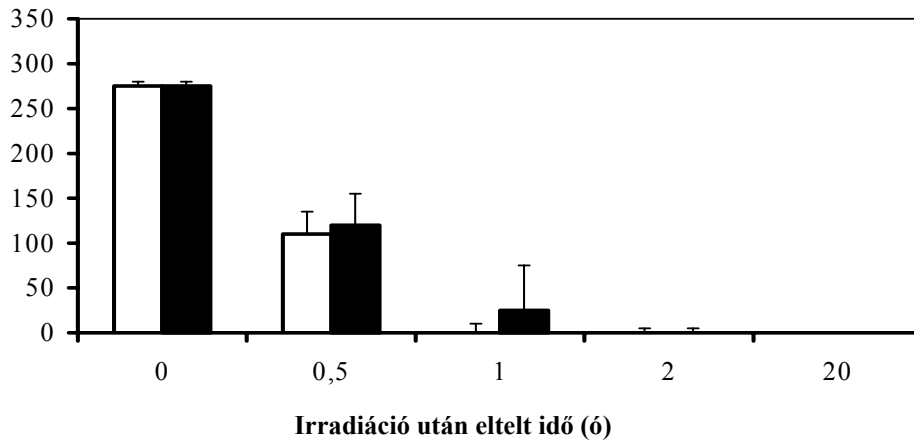


7. b.

8. ábra Comet-képződés UVA-irradiációt követően FB-ban (**a** ábra) és KC-ban (**b** ábra).

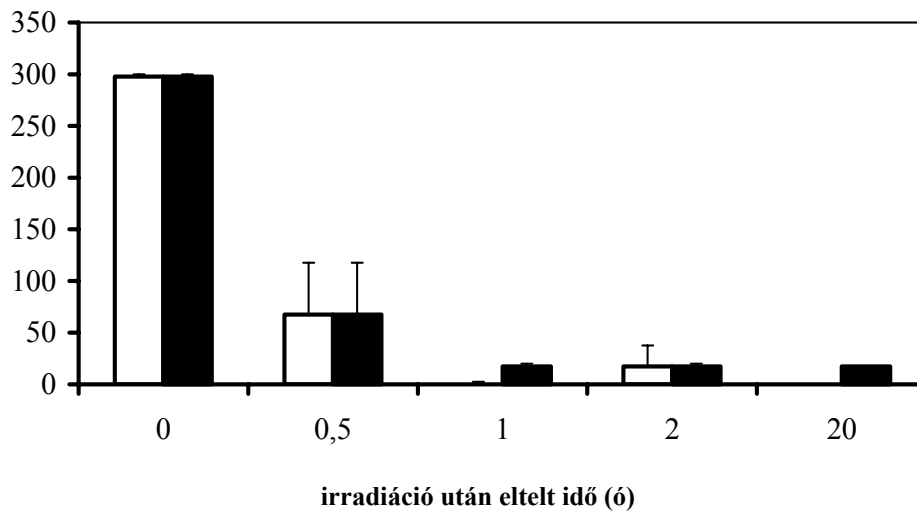
UVA-irradiáció (3 J/cm^2 , *üres oszlopok*) FB-ban és KC-ban is DNS-károsodást indukált azonnal a besugárzás alatt, azaz comet-képződése már agarózba ágyazott sejteket irradiálva (0 ó) volt megfigyelhető. A DNS-léziók 1 ó-n belül reparálódnak látszottak mindkét sejttypusban, FA jelenlétében is ($10 \mu\text{M}$, *telt oszlopok*). Az adatpontok a relatív DNS-migráció átlag \pm SEM (n=3) értékeit reprezentálják.

relatív
DNS migráció



8. a

relatív
DNS migráció

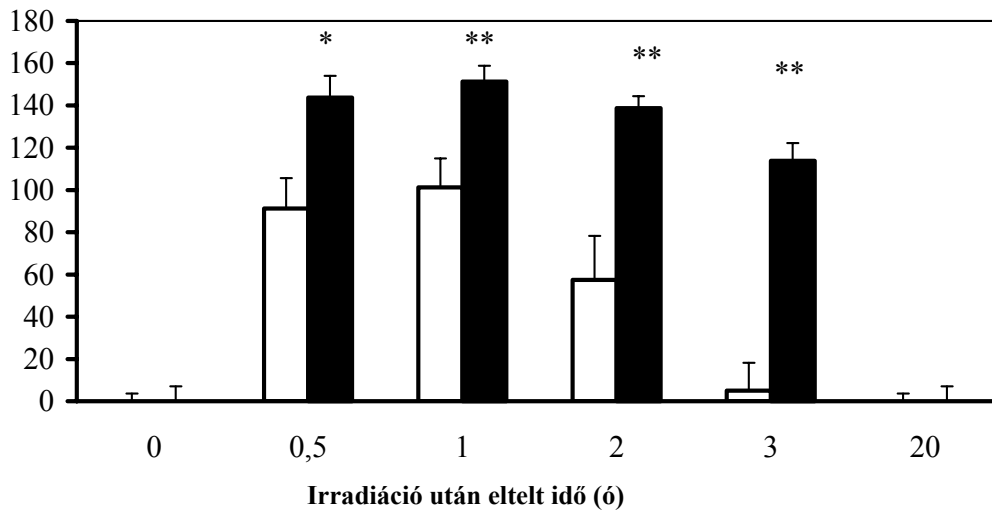


8. b

9. ábra FA hatása a DNS-reparáció időkinetikájára szoláris szimulált UV-irradiációt követően FB-ban (**a** ábra) és KC-ban (**b** ábra).

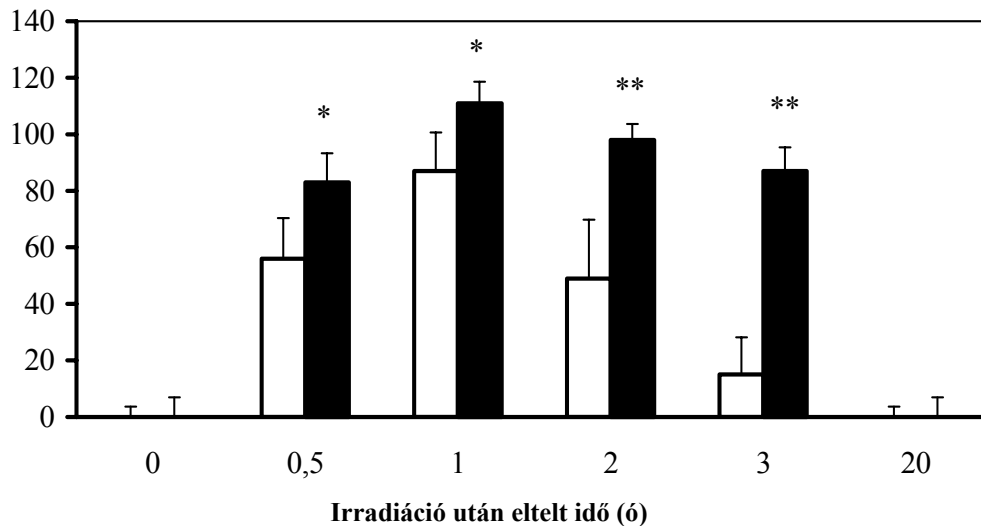
Az UVB-irradiáció (30 mJ/cm²) és a kísérő kis dózisu UVA-sugárzás (0.24 J/cm²) nem okozott assay-nkben detektálható DNS ssbs-, alkali labil hely-képződést 0 ó-nál, azaz a besugárzás idején közvetlenül (*üres oszlopok*), ezzel szemben ssbs-indukciót mutatott később, a NER aktivációjára utalóan, mind FB-ban, mind KC-ban. 10 µM FA jelenlétében a DNS-reparáció módosult (*telt oszlopok*, *p<0.05, **p<0.01). DNS-száltörések az irradiáció után 20 ó-val FA jelenlétében sem voltak már láthatóak. Az adatpontok a relatív DNS-migráció átlag±SEM (n=4) értékeit reprezentálják.

relative
DNA migration



9. a

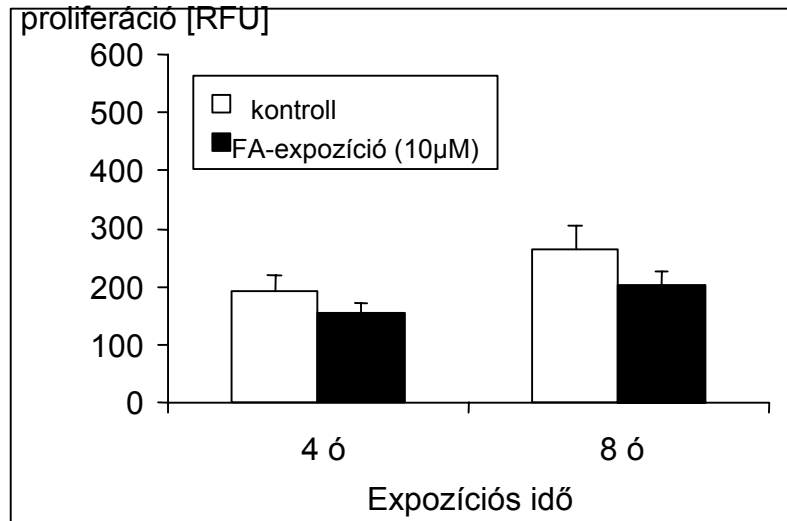
relativ
DNS migráció



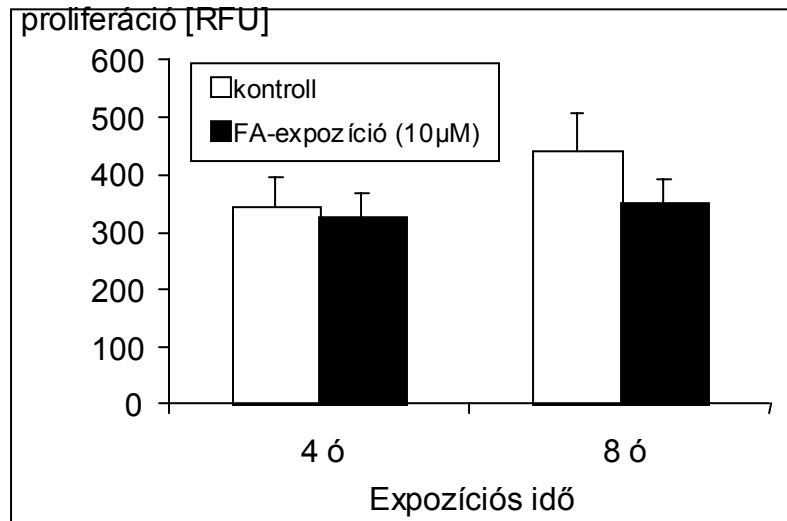
9. b

10. ábra FA hatása a FB és KC proliferációjára.

Az adatpontok relatív fluoreszcencia egységekben (RFU) fejezik ki a proliferációs rátát (átlag \pm SEM 4 kísérletből, quadruplikátumokban történt mérésekből). A proliferációs ráta nem különbözött szignifikánsan a 4 ó illetve 8 ó FA-expozíció (10 μ M, *telt oszlopok*) után mért értékeket a kontrollhoz (FA-expozíció nélkül, *üres oszlopok*) viszonyítva sem FB-ban (*a* ábra), sem KC-ban (*b* ábra). A KC proliferációs rátája kissé magasabb volt a FB-hoz képest.



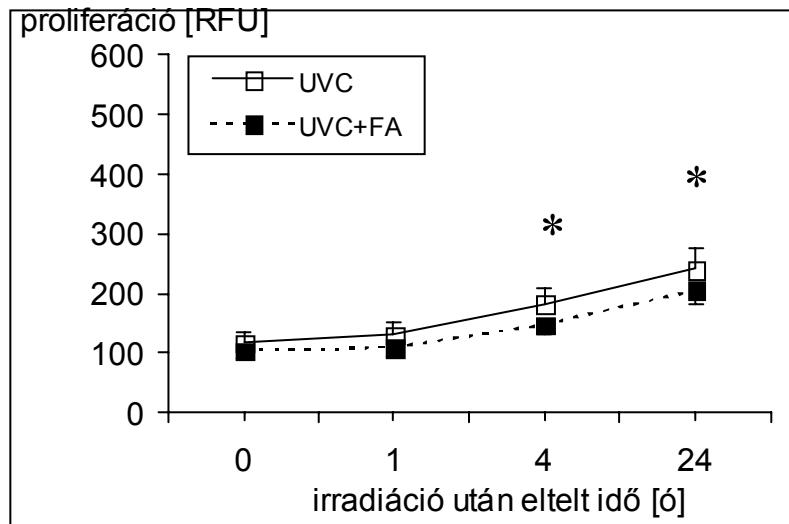
10. a



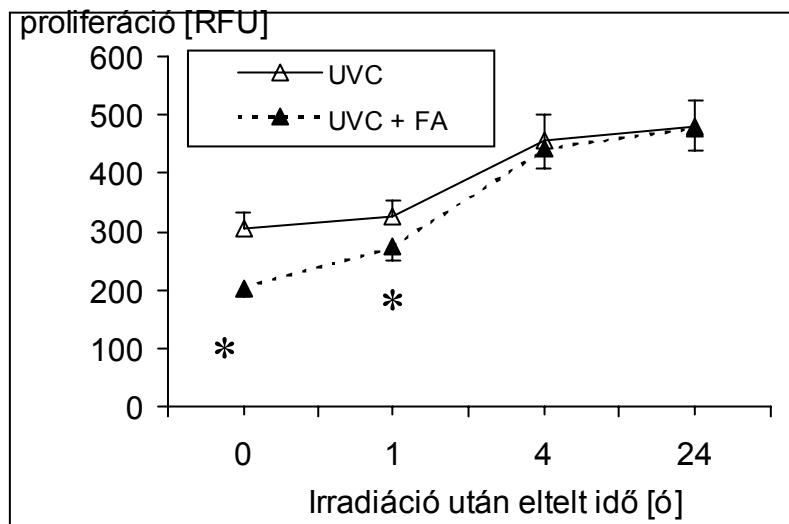
10. b

11. ábra FB és KC proliferációja UVC-irradiációt követően FA jelenlétében és a nélkül.

UVC-irradiáció (3 mJ/cm²) idő-specifikus változást indukált a FB **(a) ábra, üres szimbólumok)** és a KC **(b) ábra, üres szimbólumok)** proliferációjában is. FA-expozíció (10 μM, 8 ó, *telt szimbólumok*) az UVC-irradiáció előtt csökkentette a FB proliferációs rátáját, ez a csökkenés szignifikáns különbséget (*p<0.05) 4 ó-val illetve 24 ó-val az irradiációt követően mutatott **(a) ábra)**. A KC proliferációs rátája szignifikánsan (*p<0.05) csökkent már az irradiáció utáni első órában, de nem látszott FA-függő különbség az UV-expozíció után 24 ó-val **(b) ábra)**. A proliferáció érzékenyebben változó paraméter volt FB-ra nézve, mint KC-ra. Az adatok átlag±SEM értékeket jeleznek (5 kísérlet eredményeiből, quadruplikátumokban történt mérésekből).

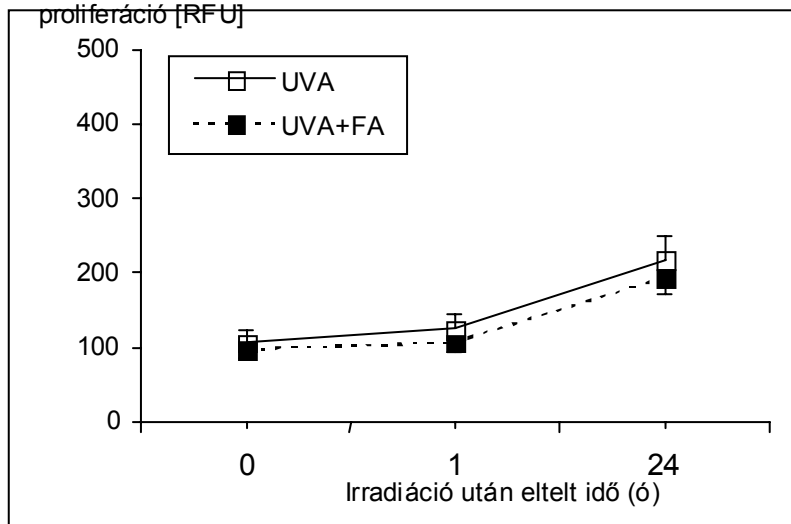


11. a

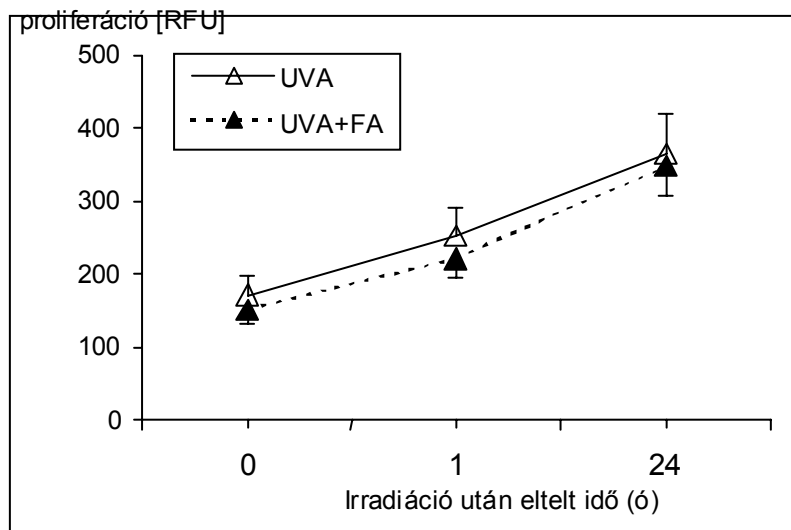


11. b

12. ábra FB (**a** *ábra*) és KC (**b** *ábra*) proliferációja UVA-irradiációt követően, FA jelenlétében illetve a nélkül. FA-expozíció (10 μ M, 8 ó, *telt szimbólumok*) UVA-irradiáció (3 J/cm²) előtt sem a FB, sem a KC proliferációs rátáját nem befolyásolta szignifikánsan. A FB kissé érzékenyebbek voltak az UVA-besugárzás proliferációt befolyásoló hatására, mint a KC.



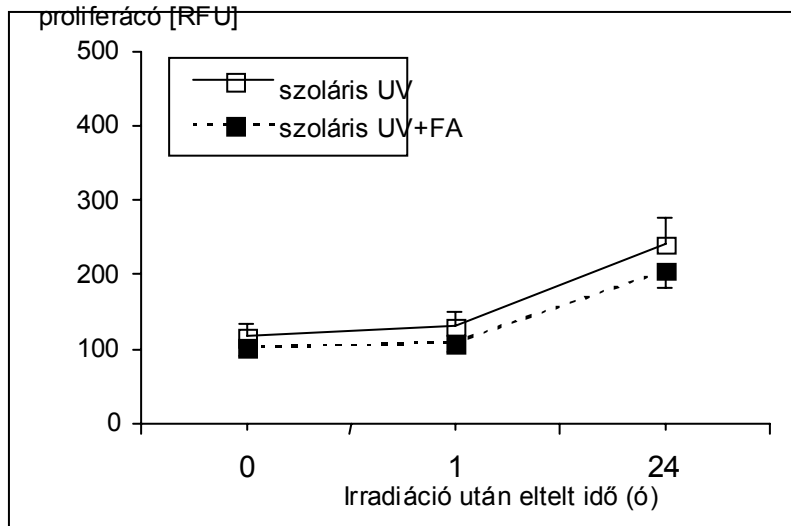
12. a



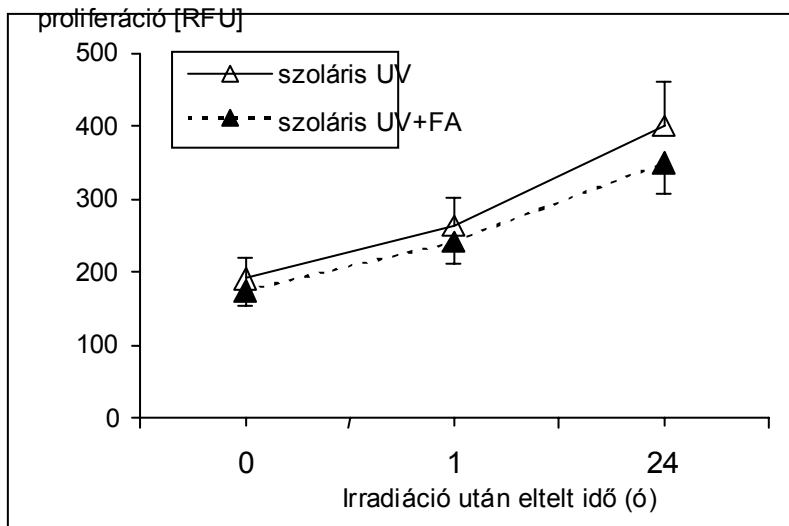
12. b

13. ábra FB (a) *ábra*) és KC (b) *ábra*) proliferációja szoláris szimulált UV-sugárzást követően (üres szimbólumok).

FA (10 μM) jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan sem a FB, sem a KC szoláris UV-irradiációt (30 mJ/cm^2 UVB és 0.24 J/cm^2 UVA) követő proliferációs rátáját (*telt szimbólumok*). A KC proliferációja szignifikánsan ($p < 0.05$) nagyobb mértékű volt a FB-hoz képest. Az adatpontok 4 kísérletből származó átlag \pm SEM értékeket reprezentálnak.



13. a



13. b

	Mikronukleusz-indukció (átlag±SEM)
Kontroll	0.48±0.10
Formaldehid expozíció	0.30±0.04
UVC irradiáció	1.84±0.45*
Formaldehid és UVC expozíció	4.00±0.83*

I. táblázat FA-expozíció hatása az UVC-irradiációt követő MN-indukcióra FB-ban.

A MN-indukció mértékét, mint a mintában jelenlévő mikronukleált sejtek százalékos arányát adtuk meg (átlag±SEM, n=5). UVC-irradiáció (4 mJ/cm²) szignifikáns (*p<0.05) MN-képződést okozott a kontrollhoz (nem irradiált és nem FA-exponált) képest. Az UVC-irradiációt megelőző FA-expozíció (12.5 µM, 6 ó) szignifikánsan (*p<0.05) megnövelte a MN-előfordulás gyakoriságát az UVC-irradiált, de FA-nek ki nem tett mintákhoz viszonyítva.

5. MEGBESZÉLÉS

a) Fotokemoterápia (PUVA) hatására bekövetkező DNS-károsodás és reparáció

Vizsgálatainkban demonstrálni tudtuk, hogy az UVB, az UVA és a PUVA által okozott DNS-károsodás típusa, reparációja jelentősen különbözik egymástól. Az UVA-irradiáció hatására elsősorban egyszálú DNS-törések keletkeznek oxidatív útvonalakon (Wenczl, 1997). Ezek gyors újrapcsolódása eredményezi az üstökös-képződés comet-assay-ben észlelhető gyors lecsengését. Az UVB-sugárzás a DNS-ben elnyelődve CPD-t hoz létre, melyek reparációjához nukleotid excízióra van szükség. Az egyszálú DNS-törések megjelenése így tranziens, reparációs intermedier termékek következménye (Schothorst, 1991). Eredményeink összhangban vannak az irodalomban leírtakkal (Lehmann, 1998). Kettősszálú DNS-törések keletkezésére utaló változást neutrális comet-assay-vel sem UVA, sem UVB irradiáció után nem észleltünk a vizsgált dózisok után. A PUVA-okozta DNS-károsodás és reparáció kimutatására (monoadduktumok, DNS-DNS keresztkötések) az alkalikus comet-assay nem bizonyult eredményesnek. Más keresztkötő ágensek, mint a mitomycin C, cisplatinum vizsgálatából ismert, hogy ezek az üstökös-képződés mértékét csökkentik (Pfuhrer, 1996). Valószínűnek látszik, hogy a pszoralen hozzáadása a sejtekhez az indukált DNS-DNS intra- és interstrand keresztkötések miatt gátolta az UVA-okozta DNS-vándorlás detektálását. Mielőtt a keresztkötések kvantifikálására törekedtünk volna (l. lentebb, FA hatásának mérése), elvégeztük a neutrális comet-assay-t. Érdekes módon a PUVA-kezelés nyomán DNS-kettősszálú töréseket tudtunk demonstrálni, amely nem azonnal a besugárzást követően mutatkozott, hanem másfél órával később, majd az üstökös-képződés néhány óra múltán csökkent. Az UVB-besugárzás után tapasztaltak és ezek magyarázatának analógiájára felmerül, hogy a látott DNS-törések a PUVA indukálta DNS-reparáció intermedierjei. Az assay során beágyazott sejteket elektroforézis nélkül is megvizsgáltuk. Az apoptotikus sejtekre jellemző halo-képződést (Singh, 2000) nem láttunk, ami mint másik lehetőség, magyarázhatta volna az észlelt üstökös-képződést. A PUVA-okozta DNS-monoadduktumok és keresztkötések kijavítására az irodalomban a NER és a rekombinációs reparáció lehetősége egyaránt ismert (Van Houten, 1986, Averbek, 1992), illetve a kettő együttműködése is lehetséges (Lage, 2003). A mi kísérleteink olyan reparációs útvonalra utalnak, melyben köztes terméként DNS-kettősszálú törések keletkeznek. Mindent egybevetve, a DNS-adduktumok javítási mechanizmusa a bőrsejtekben további tanulmányozást igényel, ami a jövő feladata lesz, a beállított assay viszont alkalmasnak tűnik a foto(kemo)terápia klinikai hatásának követésére a betegség mellett.

b) UV-irradiációt követő kromoszóma-károsodás (MN-indukció) összehasonlító vizsgálata normál humán MC-ban és FB-ban

Vizsgálatainkhoz első lépésként egy korábban leírt multiparametrikus áramlási citometriás módszert (Wessels és Nüsse, 1995) dolgoztunk át sejttenyészeink sajátosságainak megfelelően. A módosított eljárással alacsony dózisú UV és γ -irradiációt követően mind MC-ban, mind FB-ban dózis-válasz összefüggést találtunk MN-képződésre és G2/M-fázisban megmutatkozó sejtciklus-késleltetésre.

Az indukált MN olyan mérési végpontot jelentenek, amikor a sejtekben már különböző reparációs útvonalak lezajlottak, a sejt osztódott. Ezért az irradiáció után a MN megjelenéséig bizonyos időre van szükség, míg a sejtosztódás megtörténhet. Hossza a sejtciklus idejétől és a MN-indukáló ágenstől is függ (Geard és Chen, 1990). A vizsgálandó sejtekhez adaptálva a módszert, figyelembe kellett vennünk a MC 31 órás, (De Leeuw, 1994), a FB 12 órás sejtciklus idejét (Kaufmann és Wilson, 1994). Empirikus úton meghatározva, MC-ban az irradiációt követően 8 nap, FB-ban 4 nap várakozás volt szükséges optimálisan detektálható MN-képződéshez. Módosításokat kellett bevezetnünk a sejtmagok és a MN fluoreszcens jelzésére, illetve az FCM-ra vonatkozóan is. Ily módon a FM méréshez hasonló tendenciájú eredményeket tudunk elérni, miközben kihasználtuk az áramlási citométer előnyeit: nagyobb mennyiségű minta lemérhetősége, objektivitás, gyorsaság. A citometriás mérésekkel kapott alacsonyabb MN-előfordulási gyakoriság legvalószínűbben a sejttenyésztés és a minta előállítása során adódott sejtörmelék óvatos kikapuzásának volt a következménye (Weller, 1996). Nüsse és Marx (1997) azt találta, hogy a mintában apoptotikus testek is lehetnek, amelyek meghamisíthatják a mérést. Mintáinkban az apoptózis indikátorának tartott sub-G1-fázisú partikulumok jelenléte kizárható volt. Apoptotikus sejteket a sejt kultúrák feldolgozásának idején sem figyeltünk meg.

A γ -sugárzás hatásának vizsgálata bőrsejteken azért ígérkezett perspektivikusnak, mert lehetőséget adott az in vitro és in vivo alkalmazott UV-dózisok, illetve ionizáló sugárzás experimentális (Yuspa és Dlugosz, 1991) és radioterápiás (Treankle, 1963, van Vloten, 1987) dózisainak összehasonlítására a MN-indukáló hatásra vonatkozóan. Az irodalomból már ismert volt néhány ilyen kísérletes adat FB-ra (Geard és Chen, 1990) és más sejtekre vonatkozóan (Schreiber, 1992). Kísérleteinkben mi is FB-at használtunk, az alkalmazott γ -sugárzás dózis-rátája is hasonló volt, mint Geard és Chen (1990) munkájában. Módosításként viszont sejt kultúráinkat nem tripszinizáltuk az irradiáció után, hogy a sejtek fiziológiás

működéseit, a DNS-reparáció feltételeit optimálisan tartjuk. Feltehetően ez okozhatta a kísérleteinkben észlelt alacsonyabb MN-gyakoriságot.

Az UV-indukált MN-képződésről mostanáig kevés adat áll rendelkezésünkre. Az UVB-sugárzás ilyen hatását normál humán FB-ban Krepinsky (1980) és Roser (1989), elszarusodó laphámrákból származó KC-sejtvonalban Weller (1996) vizsgálták. Fotoszenzibilizált KC-ban MN-képződés volt megfigyelhető látható fénnel történt besugárzás után (Pflaum, 1998). Hörcsög és egér 3T3 sejtkultúrákban (Bänrud, 1999) UVA-irradiáció után binukleált sejtek és MN voltak láthatók. Kísérleteinkben sejtkultúránkat ugyanazzal az UVB (313 nm)-fényforrással sugaroztuk be és ugyanolyan dózissal, mint amelyet korábban a T4 endonukleáz V-érzékeny helyek indukciójának (Enninga, 1986), illetve a sejt túlélésnek (De Leeuw, 1994) a meghatározására használtunk. UVA-irradiációra is ugyanazt a 365 nm monokromatikus fényt alkalmaztuk. Ily módon összehasonlító megállapításokra is lehetőségünk nyílt. Az irodalmi adatokat tekintve, ami az endonukleáz-érzékeny helyek indukcióját illeti, humán FB-ban Enninga (1986) az UVB és UVA hatékonyságának arányát 125:1-nek találta. Hasonlóan magas volt az arány Kielbassa (1997) hörcsögsejteken végzett vizsgálataiban is. Kísérleteinkben a FB-ban a MN-indukciót tekintve mi kisebb arányszámot találtunk (25:1). Hasonlóan kis arányszámot találunk Peak és Peak (1990) kísérleteiben a DNS-kettősszalú töréseket illetően. Magyarazatként szolgálhat, hogy az UVA-indukálta MN nem csak illetve elsősorban nem endonukleáz-szenzitív helyekből származnak, hanem más léziókból is (pl. direkt DNS-kettősszalú törésekből, Peak és Peak, 1990). Összességében azonban ezek a tanulmányok az UVA-sugárzás okozta kromoszómakárosodás rizikójára mutatnak rá, melynek a fotokarcinogenezisben betöltött lehetséges szerepe nem elhanyagolható.

A MC-ban a FB-kal összehasonlítva jóval alacsonyabb volt a MN-indukció mértéke mind γ -, mind UVB-irradiáció után, és nem észleltünk szignifikáns MN-indukciót UVA-irradiációt követően. Ennek egyik lehetséges magyarázata a MC hosszabb sejtciklusa. Schreiber (1992) is alacsonyabb MN-frekvenciát tapasztalt olyan sejtekben, melyek sejtciklusa hosszabb volt. A sejtek érzékenysége a γ -sugarak okozta MN-indukcióra feltehetően sejtciklus-dependens (Wolff, 1968), és az UVB-sugárzás klasztogén hatása is S-fázis dependenciát mutat (Kaufmann és Wilson, 1994). Az S-fázis hossza minden sejt típusban azonos és független a sejtciklus idejétől. Egy hosszabb sejtciklussal rendelkező sejtekből álló kultúrában a sejtek kisebb százaléka található S-fázisban, mint egy rövidebb sejtciklusú sejtekből álló kultúrában (De Robertis és De Robertis, 1987), ez viszont a mikronukleált sejtek kisebb arányát vonja maga után egy adott időpontban történő vizsgálatkor.

FCM-val az MN-indukció vizsgálatával egy időben a sejtciklus-késleltetésről, pontosabban a G2/M-fázis-késleltetésről is képet nyertünk az ugyanazon mintában jelenlévő sejtmagok jellemzése során. Ez a folyamat aktív fiziológiai válasz γ - (Kastan, 1991) vagy UV- (Kusewitt, 1992) irradiáció indukálta DNS-károsodásra. Valószínűleg ez a késleltetés ad lehetőséget a DNS-károsodás javítására a következő mitózis előtt (Bologna, 1994, Kaufmann és Kaufman, 1993), azaz ellenőrzőpontként értelmezhető a sejt genetikai integritásának megőrzésére. Számos irodalmi adat szól emellett. Kaufmann és Wilson (1994) szerint a MN-képződés és a sejtciklus-késleltetés között párhuzamot lehet vonni. Ataxia teleangiectasia-s betegek FB-jaiban, akiknél az ionizáló sugárzás által indukált DNS-károsodásra adott sejtciklus-késleltetési válasz hibás (Shackelford, 1999), több MN indukálódik, mint egészségesek sejteiben (Kaufmann és Wilson, 1994). Weller (1996) úgy találta, hogy több MN képződik, ha a sejtciklus-késleltetés funkciót koffein hozzáadásával gyengíti. A γ -irradiáció okozta G2/M-késleltetésre nyert adataink amellet szólnak, hogy a MN-t és a késleltetést is kettősszálú DNS-törések indukálják (van der Schans, 1983, Burns és Sargent, 1981). Az UV által indukált MN is DNS-kettősszálú törésekből adódik, valószínűleg excíziós reparációs eseményekből (Bradley, 1981), esetleges direkt hatásból (Peak és Peak, 1990).

Az UVB, UVA és γ -sugárzás MN-indukáló hatását érdemes equitoxikus dózisok (D50) alapján is összehasonlítani. A D50 a FB túlélésére vonatkozóan γ -sugárzás esetén 2 Gy (Stacey, 1989), UVB esetén 1 J/cm^2 (313 nm, Enninga, 1986), UVA esetén 15 J/cm^2 (Scharffetter, 1991). Az ezen dózisoknak megfelelő MN-frekvenciák 3 %, 1 % és 1 %. Megjegyzendő, hogy az 1 J/cm^2 UVB és a 15 J/cm^2 UVA körülbelül 1 és 0.2 minimális eritéma dózissal felel meg Parrish (1982) méréseit figyelembe véve. Ilyen UV-dózisoknak könnyen ki vagyunk téve a nyári napon (Wenczl, 1997), az UVA magas dózisainak pedig a szoláriumok mesterséges fényű lámpái alatt (Miller, 1998), illetve UVA1-terápia során (Stege, 1996). Az 1-2 Gy γ -sugárzás súlyos genotoxikus ártalmat jelent tenyésztett humán FB-ban (Geard és Chen, 1990, Stacey, 1989), így ezek a dózisok relevánsnak tekinthetők. Ismert továbbá, hogy a nagyobb kumulatív dózisok kísérleti állatokban relatíve rövid idő alatt bőrdaganat kialakulását eredményezhetik (Yuspa és Duglosz, 1991). Traenkle (1963) bőrdaganat kifejlődését írta le évekkal az ionizáló sugárzást követően. Ebben az esetben a lehetséges mechanizmus a DNS-törések indukciója, mely génátrendeződést vagy kariotípus abnormalitást okoz (Yandell, 1986). Humán vonatkozásban 12 Gy átlag dózissal Rtg-sugárzás a 42 éves követési időben a kezelt betegekben 6 % bőrdaganat incidenciát okozott (van Vloten, 1987). Az UVB és UVA bőrsejtekben megmutatkozó szignifikáns klasztogén hatása, amelyet

igazolni tudtunk, arra utal, hogy a humán bőr UVB és UVA besugárzása hozzájárul genetikai instabilitás kialakulásához, pl. heterozigótaság vesztesékekhez, mely DNS-léziók viszont a bőr karcinogenezisében ismert tényezők.

- c) FA által okozott, illetve FA által módosított, UV-irradiáció által indukált DNS-károsodás és reparáció összehasonlító vizsgálata normál humán KC-ban és FB-ban

A FA elsősorban DNS-fehérje keresztkötéseket indukál, ahogyan azt alkalikus elúciós technikával (Grafström, 1990), KCL/SDS-assay-vel (Zhitkovich, 1992) vagy comet-assay-vel végzett vizsgálatok bizonyítják (Merk, 1999, Pfuher, 1996). A comet-assay ugyanolyan szenzitív a DNS-egyszálú törések és alkali labil helyek kimutatására, mint az alkalikus elúciós technika, de egyszerűbb, gyorsabb és sejt szinten értékelhető (Collins, 1997, Slamenova, 1997). A módszert ma már image analízis program használata teszi még precízebbé. Kísérleteinkhez mi még vizuális értékelést használtunk, és fotódokumentációval igyekeztünk a szubjektivitást kizárni, érzékenysége viszont így is elegendő volt kismértékű DNS-károsodás kimutatásához. A DNS-fehérje keresztkötések meghatározásához azt a lehetőséget használtuk ki, hogy az üstökösök hossza, amelyet egy DNS-egyszálú töréseket okozó ágens, ionizáló sugárzás (Merk, 1999) vagy metil-metán-szulfonát (MMS, Pfuher, 1996) hoz létre, arányosan csökken a keresztkötések következtében. Bár a DNS-fehérje és DNS-DNS közti keresztkötések nem differenciálhatók ily módon, a FA esetében ez utóbbi DNS-károsodás jóval kisebb valószínűségű. A FA hatását normál humán nem-transzformált KC-ban és FB-ban vizsgáltuk, ez esetben MMS (250 μ M) rövid idejű inkubációjával kombináltan. 4 órás FA-expozíció után FB-ban 50 μ M ($p < 0.05$), KC-ban 25 μ M ($p < 0.05$) FA-koncentrációnál láttunk szignifikáns keresztkötés-képződést. 8 órás expozíció után ennek elérésére 25 μ M FA elegendő volt mindkét sejttípusban. Az irodalmat áttekintve, korábban limfoblasztokban 50 μ M FA 2 órás inkubációjáról mutatták ki, hogy szignifikáns keresztkötés-képződést okoz (Craft, 1987). Ezzel szemben humán SV40-transzformált FB-ban és V79 sejtekben 100 μ M-nak találták a hatékony FA-koncentrációt (4 órás expozíció) MMS-t (Pfuher, 1996) vagy ionizáló sugárzást (Merk, 1999) alkalmazó comet-assay-vel és KCL/SDS-assay-vel (Merk, 1998, Zhitkovich, 1992) is. E felett a koncentráció felett dóziszfüggő keresztkötés-indukciót láttak, mely a citotoxicitással is korrelált, és független volt a sejt típusától. Grafström (1986) azt találta, hogy 100 μ M FA 1 órás expozíciója már elegendő DPC létrehozásához bronchiális FB-ban és KC-ban, de ez a dózis már erősen citotoxikus is volt egyben. A mért DNS-

károsodás alacsonyabb lehet, ha az aldehid-expozíció szérumban történik, mert a szérumban a FA molekulákat (Nilsson, 1998). Ezért lényeges megemlíteni, hogy az előbbi kutatók és mi is szérumban alkalmaztuk. Az irodalmi adatok és a vizsgálati eredményeink közti különbségekre magyarázat lehet a különböző sejtvonalak eltérő endogén glutation-tartalma. Nilsson (1998) humán szájnyalakártya FB-at és KC-at vizsgálva szérumban azt találta, hogy 10 μM FA szignifikánsan csökkentette a kolóniaformáló képességet. Ez rámutat arra, hogy DNS-károsodás már ilyen alacsony koncentrációnál is jelentkezhet. Mi az MMS-kombinált alkalikus comet-assay-ben dóziszfüggő keresztelés-képződést láttunk. Úgy tűnik, hogy a normál humán bőr KC-nak és FB-nak primer kultúrái kissé érzékenyebbek FA-re, mint a bronchiális sejtek vagy V79 sejtek. Sem Merk (1999), sem mi nem tudtuk DNS-egyszálú töréseket kimutatni FA-expozíciót követően. Továbbá, sem a FB, sem a KC proliferációja nem változott szignifikánsan 10 μM FA expozícióját követően. Ezért ezt a koncentrációt választottuk, amikor a további vizsgálatokban a FA esetleges hatását tanulmányoztuk az UV- okozta DNS-károsodásra. A DNS-károsodás, illetve reparációs időkinetika mérésére ebben az esetben is a comet-assay-t használtuk. Mint már említettük, ezzel az assay-vel indirekten vizsgálhatjuk a CPD képződést, mivel a reparációs enzimek által felismert és a mellettük behasított DNS-léziókat, azaz a következményes egyszálú DNS-töréseket detektálja. Ezek a törések általában rövid életűek, ezért a comet-assay-ben akkor detektálhatók, ha elég nagy számú száltörés van túlsúlyban a reparációs DNS-szintézis, ligáció rovására, azaz a reparációs folyamat elején. Az assay DNS-károsodást kimutató érzékenysége ilyen módon reparációs DNS-szintézis inhibitorokkal (pl. aphidicolin, Collins, 1997) fokozható, illetve CPD kimutatására specifikussá tehető például az agaróz gélbe beágyazott DNS T4 endonukleáz V-zal (pirimidin dimerek melletti DNS-behasítást végző reparációs enzim, Angelis, 1999) való előkezelése révén. Ezekben az esetekben azonban elvesznek a reparációs DNS-szintézis, ligáció hatékonyságára, illetve a DNS-prekursor raktárakra vonatkozó információk (Collins, 1997). Kísérleteinkben az UVA-, UVB- és UVC-irradiáció hullámhossz-specifikus és időfüggő változásokat indukált a comet-assay-ben a DNS-eltérésben (üstökös-képződésben).

UVA-irradiáció (3 J/cm^2) után a DNS-migrációban jelentős növekedés volt észlelhető a kontrollhoz viszonyítva. Mivel a sejteket hordozó lemezeket azonnal a besugárzás után lízis-pufferbe merítettük (l. "Módszerek"), az egyszálú DNS-törések nagyjából a besugárzás ideje alatt képződhettek. Nagy valószínűséggel ezeket a töréseket az UVA-indukálta szingulett oxigén okozza (Lehmann, 1998). Reparációjuk nagyon gyorsnak tűnt, mindkét

sejttípusban 1 órán belül komplettálódott 10 μM FA jelenlétében is. Ezek az eredményeink a korábbi közlésekkel egybehangzóak (Alapetite, 1996, Henriksen, 1996, Lehmann, 1998).

UVC-irradiáció után a vizsgált két sejttípusban DNS-elvándorlás nem jelentkezett azonnal, csak 30 perccel később. Limfocitákban ismert egy comet assay-vel detektálható gyors reparáció UVC-károsodás után (Alapetite, 1996, Henriksen, 1996). Valószínűleg nem az összes rövid életű reparációs intermedier egyszálú DNS-törés detektálható comet-assay-vel (ld. fentebb). Alapetite már 1996-ban leírta, hogy a megfigyelt DNS-száltörések nagyobbik része nagy valószínűséggel a (6-4)-PD reparációjának tulajdonítható (Alapetite, 1996). Mások (Nakagawa, 1998) humán bőr FB-ban UVC után (3 mJ/cm^2) immunhisztokémiai módszerrel egy gyorsabb (6 órán belüli) reparációt írtak le a (6-4)-PD kijavítására és egy lassúbb (24-48 óra) reparációt a CPD-re. Ha a sejteket szoláris szimulátorral alacsony dózissal irradiáltuk és a DNS-migráció időkarakterisztikáját vizsgáltuk, azt az UVB által aktivált NER-ra találtuk jellemzőnek. A FA-del előkezelt sejtekben az irradiálás után 30 perccel kezdődően mindkét sejttípusban szignifikánsan hosszabb üstökös ($p < 0.05$) láttunk, amely a maximumot 1 óra múlva érte el, hasonlóan az UVC után tapasztaltakhoz. Az UVB-irradiáció dózisát (30 mJ/cm^2) és az UVC dózisát (3 mJ/cm^2) az emberi bőrre leírt *in vivo* hatások (eritéma képződés, sunburn sejt formálódás) függvényében választottuk meg, követve a comet-assay-re, illetve a FB-ra és a KC-ra ismert és közölt irodalmi adatokat (Alapetite, 1996, Nakagawa, 1998, Pathak, 1982, Rosario, 1979, McKelvey-Martin, 1993). Mivel a (6-4)-PD mennyisége sokkal kisebb UVB után, mint UVC után (Douki, 2000), ez magyarázhatja, miért nem volt több üstökös az UVB-irradiált mintákban 3 órával a besugárzás után egyik sejttípusban sem a kontrollokhöz és az UVC-vel irradiált sejtekhez képest. Hasonló eredményeket kapott Lehmann (1998) is, aki HaCaT sejteket vizsgált. Az első órákban növekvő DNS-elvándorlást látott UVB-irradiáció (15 mJ/cm^2) után, ám a DNS-migrációnak az expozíció után 3 órával kezdődő csökkenése lassúbb volt, összehasonlítva a mi adatainkkal. Megjegyzendő, hogy a CPD szintje további paraméter lenne az UVB és UVC indukálta DNS-fotoproduktumok excíziós kinetikájának leírásában; ez egyben kijelöli a jövő kutatásainak irányát is.

Jelen vizsgálatainkban elsőként közlünk humán primer epidermális KC és FB UV-indukált reparációs kinetikájáról összehasonlító adatokat ugyanazon hullámhosszú UV-besugárzást és dózisokat alkalmazva. Eredményeink nem mutattak szignifikáns ($p < 0.05$) különbséget a két sejtféleség között egyik fajta UV-irradiáció esetében sem. Az irodalmat áttekintve, Fornace (1982) tanulmányában hasonló reparációs kinetikát mutattak UVC-okozta DNS-károsodás esetén alkalikus elúciós technikát használva az ugyanazon a donorból

származó bronchiális epitheliális sejtek és FB is. Keyse (1987) szerint a reparációs kinetika függ a dimerek kezdeti mennyiségétől, annak ellenére, hogy látszólag egy bizonyos időintervallumon belül az indukált károsodásnak mindig egy állandó mennyiségű része reparálódik. Otto (1999) kimutatta, hogy UVB- és UVC-irradiáció után FB-ban nagyobb mértékű a reparációs DNS-szintézis, mint KC-ban, ugyanazon UVB-dózis FB-ban nagyobb mennyiségű DNS-léziót (CPD és (6-4)-PD) indukál. A kolóniaformáló képességet tekintve a FB tűnnek bármely hullámhosszú UV-besugárzás citotoxikus hatásával szemben a legérzékenyebb bőrsejttípusnak (De Leeuw, 1994). Eredményeink azt mutatják, hogy a reparáció első fázisa a FB-ban és a KC-ban nem különbözik egymástól, de a DNS-reparáció hatékonysága még alacsonyabb lehet, ha mértéke nagyobb DNS-károsodásnál nem növekszik (Otto, 1999) vagy inkomplett marad (Schmidt-Rose, 1999).

Ha a sejt kultúrákat 10 μ M FA expozíciónak tettük ki irradiáció előtt, UVA-besugárzás után nem láttuk a DNS-egyszálú törések újrakapcsolásának gátlását. Ugyanakkor UVC vagy szoláris UV-irradiációt követően a FA módosította a DNS-reparáció idő-karakterisztikáját. Alacsony koncentrációjú FA (10 μ M) alkalmazása UVC vagy UVB előtt szignifikánsan ($p < 0.05$) hosszabb üstökösöket indukált a csak besugározott sejtekhez képest FB-ban és KC-ban egyaránt 4-6, illetve 0.5-3 órával a besugárzást követően. Lehetséges, hogy a DNS-károsodás mértéke a mintákban különböző, a hosszabb üstökös FA expozíciókor a NER során a több incíziós eseményből adódik. Ez idáig olyan fotokémiai reakció a FA és UV-irradiáció között, amely további DNS-károsodáshoz vezetne, nem ismert. Az egyszálú reparációs hézagokat betöltő DNS-reszintézis/ligáció aktivitásának károsodása a NER során szintén felelős lehet a hosszabb és lassabban csökkenő üstökösökért. A FA-nek a DNS-reparációs folyamatokat gátló hatását korábban már leközlötték, de oka csak részben ismert. Kísérleteinkben demonstráltuk a FA DNS-fehérje keresztkötést indukáló hatását, amely felelős lehet a reparáció gátlásáért és sejtproliferáció csökkenéséért is. 1999-ben Yang azt találta, hogy humán lymphoid sejtekben az akrolein, egy 3-szénatomos telítetlen aldehid szintén gátolja a γ -irradiáció okozta egyszálú DNS-törések kapcsolódását. Ezt a BrdUrd-nak a sejtek DNS-ébe történő felvételének és inkorporációjának gátlása is kísérte, ami arra utal, hogy az aldehid gátolja a DNS-replikációt és reparációt. Korábban Saladino (1985) kimutatta, hogy a bronchiális sejtekben a FA gátolja mind a timidin, mind az uridin inkorporációját a nukleinsavba. A FA-t összehasonlítva más DNS-szintézis gátlókkal (pl. citozin arabinozid, Fornace, 1982), úgy tűnik, hogy az egyszálú törések akkumulációját okozó hatása a NER folyamán kevésbé erős. Valószínű, hogy a FA hatásának érvényesülésében egyes

mikrokörnyezeti tényezők, pl. a poliamin depléción, a nukleotid-felvétel és a szintézis gátlása, amelyek a reparációs DNS-szintézis késleltetését okozhatják, fontosak lehetnek (Snyder, 1988, Snyder, 1990). Ezeket az eseményeket továbbá az aktuális metabolikus/proliferatív állapot is befolyásolhatja. Ez magyarázhatja az olykor ellentmondásos kísérleti adatokat a FA-expozíció hatását illetően: egy részük nem lát semmilyen hatást (Merk, 1999), más részük éppen nagyobb mutációs frekvenciát ír le (Grafström, 1990).

Kísérleteinkben emellett egy jól ismert nem-radioaktív alamarBlueTM assay-vel (Ahmed, 1994, Kwack, 2000, O'Brien, 2000, Voyzik-Harbin, 1998) mértük a proliferációt is. 10 μ M FA-t alkalmazva nem láttunk szignifikáns hatást a FB vagy a KC proliferációjában. Ha azonban a FA-expozíciót UVC-irradiációval kombináltuk, a proliferáció mértéke szignifikánsan ($p < 0.05$) csökkent (10-25 %): FB-ban a besugárzás után 4 és 24 órával, KC-ban azonnal és 1 óra múlva már szignifikánsan alacsonyabbak voltak a sejtszámok. 2000-ben közölt eredményeink szerint (Emri, 2000) a NER gátlása az egyszálú DNS-hézagok akkumulációjával endonukleázok számára nagyobb támadási felületet adhat. Ez DNS-kettősszálú törések nagyobb előfordulási gyakoriságához vezethet, és kromoszómakárosodást indukálhat. Humán sejtekben a NER effektivitása olyan, hogy detektálható mennyiségű kromoszómakárosodás létrejöttéhez a fotoproduktumok nagyobb mennyisége szükséges. Mint ebben a korábbi munkánkban kimutattuk, az UVB egyszeres MED-jével in vivo történő irradiáció 1 % emelkedést idéz elő a MN-képződésben humán FB kultúrában. Minthogy az indukált DNS-léziók típusa és a reparációs események ugyanazok az UVC és az UVB után, a FA NER-re kifejtett hatásának kísérleti demonstrálásához a MN-indukciót UVC-irradiáció után mértük, illetve nagyobb dózisú UVC-t alkalmaztunk. Eredményeink szerint a FA-expozíció besugárzás előtt olyan koncentrációban (12.5 μ M), mely önmagában még nem emeli meg a MN-képződés gyakoriságát, 4 mJ/cm^2 UVC után viszont felerősítette a MN-előfordulást. Minthogy a genetikai információ és a génexpresszió a kromoszóma-átrendeződés során megváltozhat, és a kromoszóma-rendellenességek nagy száma karakterisztikus a tumorsejtekre, úgy tűnik, a krónikus FA expozíció hozzájárulhat az UV-indította bőrtumorok kifejlődéséhez.

Összefoglalva, eredményeink azt mutatják, hogy az a kis koncentrációjú FA, mely a környezetünkben előfordul, a bőrsejtekre genotoxikus, szignifikáns mennyiségű DNS-fehérje keresztkötést indukál. A FA UVC vagy UVB-irradiáció után alacsony koncentrációban is módosítani képes a NER időkinetikáját. Az az észlelésünk, hogy FA jelenlétében megnövekedett a genetikai instabilitás UV-irradiáció után, rámutat a FA DNS-reparációs folyamatokat gátló képességére, mely a fotokokarcinogén rizikót növeli.

6. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

a) Az UVA jelentősége

Azon kevesek között voltunk, akik elsőként mutattunk rá az UVA-sugárzás kromoszómakárosodást indukáló képességére normál humán bőrsejtekben. Eredményeink segítenek a bőr karcinogenezisével való gondolkodásunk alakításában, további kutatások tervezésében.

b) Fotokarcinogenezis

Az az eredményünk, mely a FA UV-karcinogenezist befolyásoló effektusát látszik alátámasztani, rámutat azon kutatások fontosságára, melyek nemcsak izoláltan vizsgálják kémiai anyagok karcinogén hatását, de figyelembe veszik a különböző környezeti tényezők lehetséges, akár szinergisztikus kölcsönhatását is a daganatfejlődésben.

c) Metodikai előnyök

Az alkalmazott assay-k egyszerűsége, gyorsasága alapot ad olyan további kutatások tervezésére, melyek környezeti tényezők és DNS-károsodás, a DNS-reparáció összefüggéseit, illetve az egyéni fogékonyság (szuszceptibilitás)/érzékenység szűrését (pl. fotokemoterápia beállítása előtt, familiárisan halmozódó bőrtumorok esetén) célozzák meg. A beállított áramlási citometriás módszer kromoszómakárosodás (genetikai instabilitás) és sejtciklus jellemzők parallel mérésére alkalmas.

Munkánk felhívja arra is a figyelmet, hogy célszerű újabb, párhuzamosan kivitelezhető módszer beállítása, melyek alkalmasak a közben felvetődött kérdések megválaszolására, rámutathatnak a sejtekben végbemenő események további, még fel nem tárt összefüggéseire.

A jelen kísérletsorozatban a DNS-károsodást elsősorban a fotokarcinogenezis szempontjából tanulmányoztuk. Minthogy azonban a DNS-léziók kulcsszerepű szignálként szerepelnek az UV-sugárzás indukálta legkülönbözőbb élettani folyamatokban is, mint a melanogenezis (pigmentzavarok), immunfolyamatok modulációja (immunszuppresszió, fototerápia), egyes fotoallergiás kórképek indukálása, az UV-irradiációt követő DNS-károsodás vizsgálata az alapkutatásban a dermatológia számos más területén is ígéretes és perspektivikus.

7. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

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

- 7.1.1. Comet-assay-vel tenyésztett humán bőrsejtekben (HaCaT) különbséget tudunk tenni az UVA- és az UVB-sugárzás okozta DNS-károsodás és reparáció között. Eredményeink az irodalommal egybehangzóak. Megállapítottuk továbbá, hogy az alkalikus comet-assay önmagában nem alkalmas a PUVA (8-MOP+UVA-fény) DNS-re kifejtett hatásának leírására.
- 7.1.2. Elsőként mutattunk rá arra neutrális comet-assay segítségével, hogy a PUVA által kiváltott DNS-károsodást követő reparáció során kettősszálú DNS-törések keletkeznek.
- 7.2.1. Az általunk továbbfejlesztett FCM módszer lehetővé tette a MN-indukció mérését és ezzel egyidőben a G0/G1 és G2/M fázisú sejtek elkülönítését is tenyésztett normál humán FB-ban és MC-ban. A kromoszómakárosodás mértéke párhuzamot mutatott a G2/M-fázisban megrekedt sejtek arányával.
- 7.2.2. Elsőként írtuk le, hogy az UVA-irradiáció dózis-dependens módon kromoszómakárosodást indukál humán FB-ban.
- 7.2.3. Megállapítottuk, hogy az UVB-irradiáció is okoz dózis-dependens módon kromoszómakárosodást humán MC-ban és FB-ban is, de ugyanazon dózisosokra a két sejtípusban különböző a károsodás mértéke.
- 7.3.1. Tenyésztett normál humán KC-ban és FB-ban comet-assay segítségével megállapítottuk, hogy 4 órás, illetve 8 órás nagyon alacsony koncentrációjú FA-expozíció szignifikáns és dózis-dependens DPC-képződést idéz elő.
- 7.3.2. Elsőként végeztünk comet-assay-vel összehasonlító vizsgálatot az UV-sugárzás okozta DNS-károsodás és reparációs kinetika tanulmányozására nézve tenyésztett normál humán KC-ban és FB-ban. A DNS-károsodás és reparáció a besugárzás hullámhosszától függött, és hasonló kinetikát mutatott FB-ban és KC-ban.
- 7.3.3. A FA hatásának további tanulmányozásakor azt találtuk, hogy a FA már alacsony dózisban gátolja az UVC- és az UVB-irradiációt követő NER-t a reparációs DNS-szintézis/ligáció lépésben. UVA-besugárzás után a FA nem befolyásolta a reparációt.

7.3.4. Megállapítottuk, hogy a reparáció késleltetése a kromoszómakárosodás megnövekedéséhez vezet. A FA olyan koncentrációban, mely nem indukált MN-t, szignifikáns emelkedést okoz az UVC-indukált kromoszómakárosodásban.

8. SUMMARY OF RESULTS

In the present work we studied the DNA-damaging effect of solar UV-radiation at different biological endpoints after exposure. Our results demonstrate the usefulness of the comet-assay and the MN-assay in this research field.

- 8.1.1. Using comet-assay we could differentiate between UVA- and UVB-irradiation induced DNA-damage and repair in cultured human KC (HaCaT). Our results are in agreement with literature data. Furthermore, we have found that the alkaline comet-assay is not able to show the effect of PUVA (8-MOP+UVA) on DNA.
- 8.1.2. We could demonstrate by means of neutral comet-assay the formation of DNA-double strand breaks during DNA-repair following PUVA-induced DNA-damage.
- 8.2.1. A flow cytometry method we modified and applied made it possible to measure MN-induction with differentiation between nuclei in G0/G1- and G2/M-phase at the same time in cultured normal human FB and KC. We observed positive correlation between MN-induction and proportion of G2/M-phase nuclei in the sample.
- 8.2.2. We were the first to report that UVA is able to induce chromosomal damage in a dose dependent manner in human FB.
- 8.2.3. We have found that UVB-irradiation also induces chromosomal damage in a dose dependent manner in human MC and FB, but the extent of the DNA-damage is different in the two cell types regarding the same radiation doses.
- 8.3.1. By means of comet-assay we have found that upon 4 h and 8 h of exposure to very low concentrations of FA significant DPC-formation is present in normal human FB and in normal human KC.
- 8.3.2. We were the first to describe DNA-damage and repair kinetics induced by UV-irradiation in cultured normal human KC in comparison with FB using comet-assay. The DNA-damage and repair following UV-irradiation were dependent on the wavelength of UV and the repair kinetics was similar in the two cell types.
- 8.3.2. We have found that FA at a low concentration level interfered with DNA-resynthesis/ligation step of NER following UVC- and UVB-irradiation. FA had no effect on the DNA-repair after UVA-irradiation.
- 8.3.4. We have found that the delay in DNA-repair resulted in an increase of chromosomal damage. FA at a concentration not inducing MN caused significant increase of UVC-induced chromosomal damage.

9. AZ ÉRTEKEZÉSBEN ELŐFORDULÓ HIVATKOZÁSOK

1. Agner T, Flyvholm M A, Menne T. (1999) Formaldehyde allergy: A follow-up study. *Am J Contact Dermat* 10: 12-17.
2. Ahmed S A, Gogal R M Jr., Walsh J E. (1994) A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170: 211-224.
3. Alapetite C, Wachter T, Sage E, Moustacchi E. (1996) Use of the alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblasts exposed to UVC, UVB, UVA and γ -rays. *Int J Radiat Biol* 69: 359-369.
4. Angelis KJ, Dusinska M, Collins AR. (1999) Single cell gel electrophoresis: Detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis* 20: 2133-22138.
5. Averbeck, D., Dardalhon, M., Magana-Schwencke, N., Meira, L.B., Meniel, V., Boiteux, S., Sage, E. (1992) New aspects of the repair and genotoxicity of psoralen photoinduced lesions in DNA. *J Photochem Photobiol B: Biol* 14:47-63.
6. Bänrud H, Moan J, Berg K. (1999) Early induction of binucleated cells by ultraviolet A (UVA) radiation: possible role of microfilaments. *Photochem Photobiol* 70: 199-205.
7. Barber R D, Donohue T J. (1998) Pathways for transcriptional activation of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase gene. *J Mol Biol* 280: 775-784.
8. Bauer FW, Boezeman JBM. (1983) Flow cytometric methods in human skin with respect to cell cycle kinetics. In: Wright NA, Camplejohn RS (eds). *Psoriasis: Cell Proliferation*, Churchill Livingstone, pp 104-116.
9. Bethea, D., Fullmer, B., Syed, S., Seltzer, G., Tiano, J., Rischko, C., Gillespie, L., Brown, D., and Gasparro F.P. (1999) Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *J Dermatol Science* 19:78-88.
10. Bielfeld V, Weichenthal M, Roser M, Breitbar E, Berger J, Seemanova E, Rüdiger HW. (1989) Ultraviolet-induced chromosomal instability in cultured fibroblasts of heterozygote carriers of xeroderma pigmentosum. *Cancer Genet Cytogenet* 43: 219-226.
11. Bologna JL, Sodi SA, Chakraborty AK, Fragnoli MC, Pawalek JM. (1994) Effects of ultraviolet irradiation on the cell cycle. *Pigment Cell Res* 7: 320-325.
12. Bradley MO. (1981) Double-strand breaks in DNA caused by repair of damage due to ultraviolet light. *J Supramol Structure Cellular Biochem* 16: 337-343.
13. Brash D E, Ponten J. (1998) Skin precancer. *Cancer Surv* 32: 69-113.
14. Bruls WAG, Slaper, H, van der Leun, JC, Berrens, L. (1984) Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness, in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem Photobiol* 40: 485-494.
15. Burns FJ, Sargent EV. (1981) The induction and repair of DNA breaks in rat epidermis irradiated with electrons. *Radiat Res* 1: 137-144.
16. Casteel S W, Vernon R J, Bailey Jr E M. (1987) Formaldehyde: toxicology and hazards. *Vet Hum Toxicol* 29: 31-33.
17. Cheung C, Smith CK, Hoog JO, Hotchkiss SA. (1999) Expression and localisation of human alcohol and aldehyde dehydrogenase enzymes in skin. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 100-107.
18. Collins A R, Dobson V L, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. (1997) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 375: 183-193.
19. Cornforth MN, Goodwin EH. (1991) Transmission of radiation-induced acentric chromosomal fragments to micronuclei in normal human fibroblasts. *Radiat Res* 126: 210-217.

20. Coven, T.R., Walters, I.B., Cardinale, I., and Krueger, J.G. (1999) PUVA-induced lymphocyte apoptosis: mechanism of action in psoriasis. *Photoderm Photoimm Photomed* 15:22-27.
21. Coven, T.R., Walters, I.B., Cardinale, I., and Krueger, J.G. (1999) PUVA-induced lymphocyte apoptosis: mechanism of action in psoriasis. *Photoderm Photoimm Photomed* 15:22-27.
22. Craft T R, Bermudez E, Skopek T R. (1987) Formaldehyde mutagenesis and formation of DNA-protein crosslinks in human lymphoblasts in vitro. *Mutat Res* 176: 147-155.
23. Davies R E, Forbes P D, Urbach F. (1990) Effects of chemicals on photobiologic reactions of skin. DNA damage and repair in human tissues. Edited by B. M. Sutherland and A. D. Woodhead, Plenum Press, New York 127-135.
24. De Gruijl FR, Sterenborg HJCM, Forbes PD, et al. (1993) Wavelength dependence of skin cancer induction by ultraviolet irradiation of albino hairless mice. *Cancer Res* 53: 53-60.
25. De Laat A, van Tilburg M, van der Leun JC, van Vloten WA, de Gruijl FR. (1996) Cell cycle kinetics following UVA irradiation in comparison to UVB and UVC irradiation. *Photochem Photobiol* 63: 492-497.
26. De Leeuw S M, Janssen S, Simons J W I M, Lohman P H M, Vermeer B J, Schothorst A A. (1994) The UV action spectra for the clone-forming ability of cultured human melanocytes and keratinocytes. *Photochem Photobiol* 59: 430-436.
27. De Robertis EDF, De Robertis EMF. (1987) The cell cycle. In: De Robertis EDF, De Robertis EMF (eds). *Cell and Molecular Biology*. Philadelphia: Lea&Febiger, pp 394-417.
28. Douki T, Court M, Sauvaigo S, Odin F, Cadet J. (2000) Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Biol Chem* 275: 11678-11685.
29. Dracopoli NC, Harnett P, Bale S, et al. (1989) Loss of alleles from the distal short arm of chromosome 1 occurs late in melanoma tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4614-4618.
30. Eisinger M, Marko O. (1982) Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2018-2022.
31. El-Mofty, A.M. (1948) A preliminary clinical report on the treatment of leukoderma with *Ammi majus* Linn. *J R Egypt M A* 31:651.
32. Emri G, Wenczl E, Van Erp P, Jans J, Roza L, Horkay I, Schothorst A A. (2000) Low doses of UVB or UVA induce chromosomal aberrations in cultured human skin cells. *J Invest Dermatol* 115: 435-440.
33. Enninga IC, Groenendijk RTL, Filon AR, van Zeeland AA, Simons JWIM. (1986) The wavelength dependence of UV-induced pyrimidine dimer formation, cell killing and mutation induction in human diploid skin fibroblasts. *Carcinogenesis* 7: 1829-1836.
34. Fornace A J, Lechner J F, Grafström R C, Harris C C. (1982) DNA repair in human bronchial epithelial cells. *Carcinogenesis* 3: 1373-1377.
35. Gasparro, F.P. (1988) *Psoralen DNA photobiology*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
36. Geard CR, Chen CY. (1990) Micronuclei and clonogenicity following low- and high-dose-rate γ -irradiation of normal human fibroblasts. *Radiat Res* 124: 56-61.
37. Gedik CM, Ewen SW, Collins AR. (1992) Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol* 62: 313-320.
38. Gilchrist BA, Eller M, Geller AC, Yaar M. (1999) The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 340: 1341-1348.

39. Goldsmith L A. (1996) Skin effects of air pollution. *Otolaryngol Head Neck Surg* 114: 217-219.
40. Grafström R C, Fornace A J Jr, Autrup H, Lechner J F, Harris C C. (1983) Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells. *Science* 220: 216-218.
41. Grafström R C. (1990) In vitro studies of aldehyde effects related to human respiratory carcinogenesis. *Mutat Res* 238: 175-184.
42. Halaban RS, Ghosh P, Duray JM, Kirkwood Lerner AB. (1986) Human melanocytes cultured from nevi and melanomas. *J Invest Dermatol* 87: 95-101.
43. Hall PA, McKee PH, Menage HD, Dover R, Lane DP. (1993) High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 8: 203-207.
44. Heck H, Casanova M. (1999) Pharmacodynamics of formaldehyde: applications of a model for the arrest of DNA replication by DNA-protein cross-links. *Toxicol Appl Pharmacol* 160: 86-100.
45. Hedberg J J, Hoog J O, Nilsson J A, Xi Z, Elfving A, Grafström R C. (2000) Expression of alcohol dehydrogenase 3 in tissue and cultured cells from human oral mucosa. *Am J Pathol* 157: 1745-1755.
46. Heddle JA, Hite M, Kirkhardt B, et al. (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the US Environmental Protection Agency Genetox Program. *Mutat Res* 123: 61-118.
47. Heim S, Mitelman F. (1995) Tumors of the skin. In: Heim S, Mitelman (eds). *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells*. New York: J. Wiley&Sons, pp 465-475.
48. Henriksen E K, Moan J, Kaalhus O, Brunborg G. (1996) Induction and repair of DNA damage in UV-irradiated human lymphocytes. Spectral differences and repair kinetics. *J Photochem Photobiol B: Biol* 32: 39-48.
49. Hoeijmakers JHJ. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374.
50. Homme M, Jacobi H, Juhl-Strauss U, Witte I (2000) Synergistic DNA damaging effects of 4-nitroquinoline-1-oxide and non-effective concentrations of methyl methanesulfonate in human fibroblasts. *Mutat Res* 461: 211-219.
51. Horkay I, Tamási P, Csongor J (1973) UV-light induced DNA damage and repair in lymphocytes in photodermatoses. *Acta Dermatovener* 53: 105-108.
52. Horkay I, Varga L, Altmann H, Kosa A. (1991) DNA repair and light sensitivity in dermatology. In: *Light in biology and medicine*, Volume 2, ed. R. H. Douglas et al., Plenum Press, New York, pp 327-336.
53. Horkay I, Varga L, Tamási P, Gundy S (1978) Repair of DNA damage in light sensitive human skin diseases. *Arch Derm Res* 263: 307-315.
54. Hunter T, Pines J. (1994) Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79: 573-582.
55. Huselton CA, Hill HZ. (1990) Melanin photosensitizes ultraviolet light (UVC) DNA damage in pigmented cells. *Environ Mol Mutagen* 16: 37-43.
56. IARC Monographs (1992): *Studies of Cancer in Humans*. 55: 194-195.
57. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51: 6304-6311.
58. Kaufmann WK, Kaufman DG. (1993) Cell cycle control, DNA repair and initiation of carcinogenesis. *FASEB J* 7: 1188-1191.
59. Kaufmann WK, Wilson SJ. (1994) G1 arrest and cell-cycle-dependent clastogenesis in UV-irradiated human fibroblasts. *Mutat Res* 314: 67-76.

60. Keyse S M, Tyrrell R M. (1987) Rapidly occurring DNA excision repair events determine the biological expression of u.v.-induced damage in human cells. *Carcinogenesis* 8: 1251-1256.
61. Kielbassa C, Epe B. (2000) DNA damage induced by ultraviolet and visible light and its wavelength dependence. *Methods Enzymol* 319: 436-445.
62. Kielbassa C, Roza L, Epe B. (1997) Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* 18: 811-816.
63. Kleinau O, Bohm F, Lanto B. (1997) Different DNA repair time courses in human lymphoid cells after UVA, UVA1, UVB and PUVA in vitro. *J Photochem Photobiol B: Biol* 41: 103-108.
64. Kraus AL. (1996) Analysis of rodent photocarcinogenicity models for hazard evaluation and risk assessment: industry viewpoint. *Photochem Photobiol* 63: 365-369.
65. Krepinsky AL, Rainbow AJ, Heddle JA. (1980) Studies on the ultraviolet light sensitivity of Bloom's syndrome fibroblasts. *Mutat Res* 69: 357-368.
66. Kripke ML, Cox PA, Alas LG, Yarosh DB (1992) Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7516-7520.
67. Kripke ML. (1990) Photoimmunology. *Photochem Photobiol* 52: 919-924.
68. Krutmann J, Ahrens C, Roza L, Arlett CF. (1996) The role of DNA-damage and repair in ultraviolet B radiation-induced immunomodulation: relevance for human photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol* 63: 394-396.
69. Kusewitt D, Budge CL, Nolla HA, Edwards BS, Ley RD. (1992) Cell cycle progression in denV-transfected murine fibroblasts exposed to ultraviolet radiation. *Mutat Res* 274: 163-176.
70. Kwack K, Lynch L G. (2000) A new non-radioactive method for IL-2 bioassay. *Mol Cells* 10: 575-578.
71. Lage C, de Padula M, de Alencar TA, da Fonseca Goncalves SR, da Silva Vidal L, Cabral-Neto J, Leitao AC. (2003) New insights on how nucleotide excision repair could remove DNA adducts induced by chemotherapeutic agents and psoralens plus UV-A (PUVA) in *Escherichia coli* cells. *Mutat Res* 544: 143-157.
72. Lehmann J, Pollet D, Peker S, Steinkraus V, Hoppe U. (1998) Kinetics of DNA strand breaks and protection by antioxidants in UVA- or UVB-irradiated HaCaT keratinocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 407: 97-108.
73. Leis JF, Livingstone DM. (1996) The tumor suppressor genes and their mechanisms of action. In: Bishop MJ, Weinberg RA (eds). *Scientific American, Introduction to Molecular Medicine*. New York: Scientific American, pp 11-141.
74. Leszczynski D, Fagerholm S, Leszczynski K. (1996) The effects of the broadband UVA radiation on myeloid leukemia cells: the possible role of protein kinase C in mediation of UVA-induced effects. *Photochem Photobiol* 64: 936-942.
75. Liu SC, Karasek M. (1987) Isolation and growth of adult human epidermal keratinocytes in cell culture. *J Invest Dermatol* 71: 157-162.
76. Loveday KS. (1996) Interrelationship of photocarcinogenicity, photomutagenicity and phototoxicity. *Photochem Photobiol* 63: 369-372.
77. Madronich S, de Gruijl FR. (1994) Stratospheric ozone depletion between 1979 and 1992: implications for biologically active ultraviolet-B radiation and non-melanoma skin cancer incidence. *Photochem Photobiol* 59: 541-546.
78. Magana-Schwencke N, Averbek D. (1991) Repair of exogenous (plasmid) DNA damaged by photoaddition of 8-methoxypsoralen in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 251: 123-131.

79. Maity A, Kao GD, Muschel RJ, McKenna WG. (1997) Potential molecular targets for manipulating the radiation response. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 37: 639-653.
80. Makinen M, Kalliokoski P, Kangas J. (1999) Assessment of total exposure to phenol-formaldehyde resin glue in plywood manufacturing. *Int Arch Occup Environ Health* 72: 309-314.
81. Matsui M, DeLeo VA. (1991) Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer. *Cancer Cells* 3: 8-13.
82. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. (2004) Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 195: 298-308.
83. McKelvey-Martin, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, de Méo MP, Collins A. (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mut Res* 288: 47-63.
84. Merk O, Speit G. (1998) Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 32: 260-268.
85. Merk O, Speit G. (1999) Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ Mol Mutagen* 33: 167-172.
86. Miller SA, Hamilton SL, Wester UG, Cyr WH. (1998) An analysis of UVA emissions from sunlamps and the potential importance for melanoma. *Photochem Photobiol* 68: 63-70.
87. Minamoto T, Mai M, Ronai Z. (1999) Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. *Carcinogenesis* 20: 519-527.
88. Mitchell DL. (1988) The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem Photobiol* 48: 51-57.
89. Mitchell, DL, Jen J, Cleaver JE. (1992) Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucleic Acids Res* 20: 225-229.
90. Mukhtar H, Elmetts CA. (1996) Photocarcinogenesis: mechanisms, models and human health implications. *Photochem Photobiol* 63: 356-357.
91. Mullenders LH, Hazekamp-van Dokkum AM, Kalle WH, Vrieling H, Zdzienicka MZ, van Zeeland AA. (1993) UV-induced photolesions, their repair and mutations. *Mutat Res* 299: 271-276.
92. Nakagawa A, Kobayashi N, Muramatsu T, Yamashima Y, Shirai T, Hashimoto M W, Ikegana M, Mori T. (1998) Three-dimensional visualisation of ultraviolet-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei. *J Invest Dermatol* 110: 143-148.
93. Nilsson J A, Zheng X, Sundqvist K, Liu Y, Atzori L, Elfving A, Arvidson K, Grafström R C. (1998) Toxicity of formaldehyde to human oral fibroblasts and epithelial cells: influences of culture conditions and role of thiol status. *J Dent Res* 77: 1896-1903.
94. Norval M. (1996) Chromophore for UV-induced immunosuppression: urocanic acid. *Photochem Photobiol* 63: 386-390.
95. Nüsse M, Marx K. (1997) Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes; advantages and disadvantages. *Mutat Res* 392: 109-115.
96. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267: 5421-5426.
97. Ortel, B., and Gange, R.W. (1990) An action spectrum for the elicitation of erythema in skin persistently sensitized by photobound 8-methoxypsoralen. *J Invest Dermatol* 94:781-785.
98. Otto A I, Riou L, Marionnet C, Mori T, Sarasin A, Magnaldo T. (1999) Differential behaviors toward ultraviolet A and B radiation of fibroblasts and keratinocytes from normal and DNA-repair-deficient patients. *Cancer Res* 59: 1212-1218.

99. Paglin S, Deloheri T, Erlandson R, Yahalom J. (1997) Radiation-induced micronuclei formation in human breast cancer cells: Dependence on serum and cell cycle distribution. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 678-684.
100. Parrish JA, Jaenicke KF, Anderson RR. (1982) Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem Photobiol* 36: 187-191.
101. Pathak MA. (1982) Sunscreens: Topical and systemic approaches to protection of human skin against harmful effects of solar radiation. *J Am Acad Dermatol* 7: 285-312.
102. Peak JG, Peak MJ. (1990) Ultraviolet light induces double-strand breaks in DNA of cultured human P3 cells as measured by neutral filter elution. *Photochem Photobiol* 52: 387-393.
103. Permana PA, Snapka RM. (1994) Aldehyde-induced protein-DNA crosslinks disrupt specific stages of SV40 DNA replication. *Carcinogenesis* 15: 1031-1036.
104. Pflaum M, Kielbassa C, Garmyn M, Epe B. (1998) Oxidative DNA damage induced by visible light in mammalian cells: extent, inhibition by antioxidants and genotoxic effects. *Mutation Res* 408: 137-146.
105. Pfuhrer, S., Wolf, H.U. (1996) Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environ-Mol-Mutagen* 27:196-201.
106. Pouget J P, Douki T, Richard M J, Cadet J. (2000) DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and comet assay. *Chem Res Toxicol* 13: 541-549.
107. Quinn AG, Sikkink S, Rees JL. (1994) Basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin show distinct patterns of chromosome loss. *Cancer Res* 54: 4756-4759.
108. Rastogi S C. (2000) Analytical control of preservative labelling on skin creams. *Contact Derm* 43: 339-343.
109. Rees J. (1994) Genetic alterations in non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol* 103: 747-750.
110. Rehman I, Quinn AG, Healy E, Rees JL. (1994) High frequency of loss of heterozygosity in actinic keratoses, a usually benign disease. *Lancet* 344: 788-789.
111. Robbins J D, Norred W P, Bathija A, Ulsamer A G. (1984) Bioavailability in rabbits of formaldehyde from durable-press textiles. *J Toxicol Environ Health* 14: 453-463.
112. Rosario R, Mark GJ, Parrish JA, Mihm MC. (1979) Histological changes produced in skin by equally erythemogenic doses of UV-A, UV-B, UV-C and UV-A with psoralens. *Br J Dermatol* 101: 299-308.
113. Roser M, Böhm A, Oldigs M, et al. (1989) Ultraviolet-induced formation of micronuclei and sister chromatid exchange in cultured fibroblasts of patients with cutaneous malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 41: 129-137.
114. Sage E, Lamolet B, Brulay E, Moustacchi E, Châteauneuf A, Drobetsky EA. (1996) Mutagenic specificity of solar UV light in nucleotide excision repair-deficient rodent cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 176-180.
115. Saladino A J, Willey J C, Lechner J F, Grafström R C, LaVeck M, Harris C C. (1985) Effects of formaldehyde, acetaldehyde, benzoyl peroxide, and hydrogen peroxide on cultured normal human bronchial epithelial cells. *Cancer Res* 45: 252-2526.
116. Schmidt-Rose T, Pollet D, Will K, Bergemann J, Wittern K P. (1999) Analysis of UV-B-induced DNA damage and its repair in heat-shocked skin cells. *J Photochem Photobiol B: Biol* 51: 144-152.
117. Schothorst, A. A., L. M. Evers, K. C. Noz, R. Filon and A. A. van Zeeland (1991) Pyrimidine dimer induction and repair in cultured human skin keratinocytes or melanocytes after irradiation with monochromatic ultraviolet radiation. *J. Invest. Dermatol.* 96: 916-920.

118. Schreiber GA, Beisker W, Bauchinger M, Nüsse M. (1992) Multiparametric flow cytometric analysis of radiation-induced micronuclei in mammalian cell cultures. *Cytometry* 13: 90-102.
119. Setlow RB, Grist E, Thompson Woodhead AD. (1993) Wavelength effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6666-6670.
120. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paulus RS. (1999) Cell cycle control, checkpoints, mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect* 107 (Suppl): 5-24.
121. Sharffetter KM, Wlaschek A, Hogg K, Bolsen K, Schothorst AA, Goerz G, Plewig G. (1991) UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch Dermatol Res* 283: 506-511.
122. Singh NP. (2000) Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res* 455: 111-127.
123. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.
124. Slamenova D, Gabelova A, Ruzekova L, Chalupa I, Horvathova E, Farkasova T, Bozsakyova E, Stetina R. (1997) Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations. *Mutat Res* 383: 243-252.
125. Smith ML, Jr. Fornace AJ. (1996) Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutat Res* 340: 109-124.
126. Snyder R D, Sunkara P S. (1990) Effect of polyamine depletion on DNA damage and repair following UV irradiation of HeLa cells. *Photochem Photobiol* 52: 525-532.
127. Snyder R D, Van Houten B. (1986) Genotoxicity of formaldehyde and an evaluation of its effects on the DNA repair process in human diploid fibroblasts. *Mutat Res* 165: 21-30.
128. Snyder R D. (1988) Consequences of the depletion of cellular deoxynucleoside triphosphate pools on the excision-repair process in cultured human fibroblasts. *Mutat Res* 200: 193-199.
129. Solomon E, Borrow J, Goddard AD. (1991) Chromosome aberration and cancer. *Science* 254: 1153-1160.
130. Stacey M, Thacker S, Taylor MR. (1989) Cultured skin keratinocytes from both normal individuals and basal cell naevus syndrome patients are more resistant to gamma rays and UV light compared with cultured skin fibroblasts. *Int Radiation Biol* 56: 45-58.
131. Stege H, Schopf E, Ruzicka T, Krutmann J. (1996) High-dose UVA1 for urticaria pigmentosa. *Lancet* 347: 64.
132. Sterenborg HJCM, van Weelden H, van der Leun JC. (1988) The dose response relationship for tumor genesis by UV radiation in the region 311-320 nm. *J Photochem Photobiol B Biology* 2: 179-194.
133. Stern, R.S., Laird, N. (1994) The carcinogenic risk of treatments for severe psoriasis. *Cancer* 73:2759-2764.
134. Suh H H, Bahadori T, Vallarino J, Spengler J D. (2000) Criteria air pollutants and toxic air pollutants. *Environ Health Perspect* 108: 625S-633S.
135. Traenkle HL. (1963) X-Ray-Induced Skin Cancer in Man, National Cancer Institute Monograph No 10, pp 423-432.
136. Trent JM, Leong SPL, Meyskens FL. (1989) Chromosome alterations in human malignant melanoma. In: Conti JC, et al. (eds). *Skin Tumors: Experimental and Clinical Aspects Carcinogenesis- a Comprehensive Survey, Vol II*. New York: Raven Press, pp 165-186.

137. Van der Leun JC, de Gruijl FR. (1993) Influences of ozone depletion on human health. In UVB radiation and ozone depletion, Tevini M (ed). Lewis Publishers, pp 95-123.
138. Van der Schans GP, Paterson MC, Cross WG. (1983) DNA strand break and rejoining in cultured human fibroblasts exposed to fast neutrons or gamma rays. *Int J Radiat Biol* 44: 75-85.
139. Van Houten, B., Gamper, H., Holbrook, S.R., Hearst, J.E., and Sancar, A. (1986) Action mechanism of ABC excision nuclease on a DNA substrate containing a psoralen crosslink at a defined position. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8077-8081.
140. Van Vloten WA, Hermans J, van Daal WJ. (1987) Radiation induced skin cancer and radiodermatitis of the head and neck. *Cancer* 56: 411-414.
141. Varga, Cs., Horváth, G., and Timbrell, V. (1999) On the mechanism of cogenotoxic action between ingested amphibole asbestos fibres and benzo(a)pyrene: II. Tissue specificity studies using comet assay. *Cancer Letters* 139: 173-176.
142. Vaughan T L, Stewart P A, Teschke K, Lynch C F, Swanson G M, Lyon J L, Berwick M. (2000) Occupational exposure to formaldehyde and wood dust and nasopharyngeal carcinoma. *Occup Environ Med* 57: 376-384.
143. Vilaplana J, Romaguera C. (2000) Contact dermatitis from tosylamide/formaldehyde resin with photosensitivity. *Contact Dermatitis* 42: 311-312.
144. Vink, AA, Yarosh DB, Kripke ML. (1996) Chromophore for UV-induced immunosuppression: DNA. *Photochem Photobiol* 63: 383-386.
145. Voitkun V, Zhitkovich A. (1999) Analysis of DNA-protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro. *Mutat Res* 424: 97-106.
146. Voyzik-Harbin S L, Brightman A O, Waisner B, Lamar C H, Badylak S F. (1998) Application and evaluation of the alamarBlue assay for cell growth and survival of fibroblasts. *In Vitro Cell Dev Biol Amin* 34: 239-246.
147. Walrath J, Fraumeni J F. (1983) Mortality patterns among embalmers. *Int J Cancer* 31: 407-411.
148. Weinstock MA. (1996) Controversies in the role of sunlight in the pathogenesis of cutaneous melanoma. *Photochem Photobiol* 63: 406-410.
149. Weller EM, Hain J, Jung T, Kinder R, Köfferlein M, Burkart W, Nüsse M. (1996) UV-B-induced cell cycle perturbations, micronucleus induction, and modulation by caffeine in human keratinocytes. *Int J Radiat Biol* 69: 371-384.
150. Wenczl, E., S. Pool, A. J. Timmerman, G. P. van der Schans, L. Roza and A. A. Schothorst (1997) Physiological doses of ultraviolet irradiation induce DNA strand breaks in cultured human melanocytes, as detected by means of an immunochemical assay. *Photochem. Photobiol* 66: 826-830.
151. Wessels JM, Nüsse M. (1995) Flow cytometric detection of micronuclei by combined staining of DNA and membranes. *Cytometry* 19: 201-208.
152. Wolff S (1968) Chromosome aberrations and cell cycle. *Radiat Res* 33: 609-619.
153. Yandell DW, Dryja TP, Little JB. (1986) Somatic mutations at a heterozygous autosomal locus in human cells occur more frequently by allele loss than by intragenic structural alterations. *Somatic Cell Mol Genet* 12: 255-263.
154. Yang Q, Hergenbahn M, Weniger A, Bartsch H. (1999) Cigarette smoke induces direct DNA damage in the human B-lymphoid cell line Raji. *Carcinogenesis* 20: 1769-1775.
155. Yang, X.Y., Gasparro, F.P., DeLeo, V.A., and Santella, R.M. (1989) 8-methoxypsoralen-DNA adducts in patients treated with 8-methoxypsoralen and ultraviolet A light. *J Invest Dermatol* 92:59-63.
156. Yasui M, Matsui S, Ihara M, Laxmi Y R S, Shibutani S, Matsuda T. (2001) Translesional synthesis on a DNA template containing N²-methyl-2'-deoxyguanosine

- catalysed by the Klenow fragment of Escherichia coli DNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* 29: 1994-2001.
157. Yoo, E.K., Rook, A.H., Elenitsas, R., Gasparro, F.P., and Vowels, B.R. (1996) Apoptosis induction by ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action. *J Invest Dermatol* 107:235-242.
 158. You Y-H, Lee D-H, Yoon J-H, Nakalima S, Yasui A, Pfeifer GP. (2001) Cyclobutane Pyrimidine Dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J Biol Chem* 276: 44688-44694.
 159. Yunis JJ. (1983) The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 221: 227-236.
 160. Yuspa SH, Dlugosz AA. (1991) Cutaneous carcinogenesis: natural and experimental. In: Goldsmith LA (ed). *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin*. Oxford: Oxford University Press, pp 1365-1402.
 161. Zhitkovich A, Costa M. (1992) A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo. *Carcinogenesis* 13: 1485-1489.
 162. Zsarebska, Z., Jarzabek-Chorzelska, M., Rzeska, G., Glinski, W., Pawinska, M., Chorzelski, T., and Jablonska, S. (1984) Detection of DNA-psoralen photoadducts in situ. *Photochem Photobiol* 39:307.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

- 9.1. **Emri G**, Remenyik E, Varga Cs, Hunyadi J, Horkay I: DNA-damage during photo(chemo)therapy studied by comet-assay. (1999) *Neoplasma* 46 (Suppl): 106-107. IF: 0.448
- 9.2. **Emri G**, Wenczl E, van Erp P, Jans J, Roza L, Horkay I, Schothorst AA: Low doses of UVB or UVA induce chromosomal aberrations in cultured human skin cells. (2000) *J Invest Dermatol* 115: 435-440. IF: 4.539, citáció: 7
- 9.3. **Emri G**, Schaefer D, Held B, Herbst C, Zieger W, Horkay I, Bayerl C: Low concentrations of formaldehyde induce DNA-damage and delay DNA-repair after UV-irradiation in human skin cells. (2004) *Exp Dermatol* 13: 305-315. IF:2.303

11. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁVAL KAPCSOLATOS POSZTEREK ÉS ELŐADÁSOK (IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK)

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

12. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- 12.1. Zahuczky G, Boross P, Bagossi P, **Emri G**, Copeland TD, Oroszlan S, Louis JM, Tózsér J: Cloning of the bovine leukemia virus proteinase in *Escherichia coli* and comparison of its specificity to that of human T-cell leukemia virus proteinase. (2000) *Biochim Biophys Acta* 1478: 1-8. IF: 1.399, citáció: 2
- 12.2. **Emri G**, Tornai I, Pósn E, Seszták T, Varga V, Horkay I: Porphyria cutanea tarda és hepatitis C vírus. (2001) *Orv Hetil* 142: 2635-2639.
- 12.3. Irinyi B, Szegedi A, **Emri G**, Bégány Á, Hunyadi J: Dermatitis herpetiformis Duhring Sumetrolim kezelése. (2001) *Bőrgyógy Ven Szle* 77: 23-26.
- 12.4. Varga V, Remenyik É, **Emri G**, Dankó K, Nagy A, Hunyadi J, Horkay I: Porphyria cutanea tarda, hepatitis C vírus infekció és polymyositis együttes előfordulása. (2001) *Bőrgyógy Ven Szle* 77: 119-121.
- 12.5. Nagy Z, Koszo F, Par A, **Emri G**, Horkay I, Horanyi M, Karadi O, Sarlos P, Morvay M, Varga V, Dobozy A, Mozsik G: Haemochromatosis (HFE) gene mutations and hepatitis C virus (HCV) infection as risk factors for porphyria cutanea tarda. (2002) *Gastroenterology* 122 (Suppl): M1477. (abstract) IF: 13.44
- 12.6. Nagy Z, Koszo F, Par A, **Emri G**, Horkay I, Horanyi M, Karadi O, Jr Rumi G, Morvay M, Varga V, Dobozy A, Mozsik G: Hemochromatosis (HFE) gene mutations and hepatitis C virus infection as risk factors for porphyria cutanea tarda in Hungarian patients. (2004) *Liver Int* 24: 16-20. IF: 2.403
- 12.7. Harangi M, Seres I, Varga Zs, **Emri G**, Szilvássy Z, Paragh Gy, Remenyik É: Atorvastatin effect on HDL-associated paraoxonase activity and oxidative DNA damage. *Eur J Clin Pharmacology* (közlésre benyújtva, EJCP 20003-0234)
- 12.8. Remenyik É, Varga Cs, **Emri G**, Hunyadi J, Horkay I: Comet-assay to study UV-induced DNA-damage. In: *Biologic effects of Light* 1998 Ed. MF Holick, EG Jung, Kluwer Acad. Publ., Boston, London, Dordrecht. (1999) pp 41-45. (könyvfejezet)

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Prof. Dr. Horkay Irénnek, aki gyakorlatvezetőmként felkeltette az érdeklődésemet a bőrgyógyászat, ezen belül is a fotodermatológia iránt, majd végzésem után lehetővé tette és biztatott tanulmányutakra való elutazásra, szakmailag és emberileg egyaránt azóta is mellettem áll és irányítja munkámat, akárcsak Dr. Remenyik Éva tanárnő, akinek vezetése alatt az itt leírt kísérletek egy része is folyt és akinek építő gondolataira mindig érdemes odafigyelni.

Köszönettel tartozom leideni témavezetőmnek, Dr. Albert Schothorstnak, aki megismertette velem a sejt- és fotobiológiai kutatás alapjait, mindig újabb és újabb kérdéseivel irányította munkámat és megalapozta az erről a területről való gondolkodásomat.

Köszönettel tartozom ugyancsak mannheimi témavezetőmnek, Dr. Christiane Bayerl-nek, aki a környezetszennyezés orvosi kérdéseinek kutatási vonalához kapcsolt és lehetőséget adott laboratóriumában való munkámhoz. Köszönetemet kell kifejeznem a laboratóriumban dolgozó asszisztensnőknek, Christel Herbst-nek, Erika Mengelnek, Karin Schremmel-nek építő javaslataikért, technikai segítségükért és barátságukért. Továbbá Dr. Björn Heldnek és Dr. Dirk Schaefernek a szakmai és baráti támogatásukért.

Köszönöm a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Bőr- és Nemikórtani Klinika igazgatójának, Prof. Dr. Hunyadi Jánosnak, hogy lehetővé tette számomra a klinika munkájába való bekapcsolódást és tanulmányutaimat, illetve köszönöm a klinika mindazon dolgozóinak segítségét, akik az elmúlt években szakmailag, emberileg elfogadtak és támogattak.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm szüleim támogatását, szeretetét, ami nélkül ez a munka nem születhetett volna meg.

A fotokemoterápia genotoxicitásának kísérletes vizsgálatához anyagi háttérrel a T 029625 számú OTKA támogatás biztosított.

A MN-képződés MC-ban és FB-ban végzett vizsgálatához a leideni egyetemre való kiutazásomat a S-JEP-07940-94 számú (EU szerződés száma ENV4-CT95-0174) TEMPUS támogatás (11 hónap) tette lehetővé, a kísérletes munka a “De Drie Lichten” Holland Alapítvány anyagi támogatásával valósulhatott meg.

A FA genotoxikus hatásainak vizsgálatához a Mannheim-ban való kint tartózkodás lehetőségét a 331 4 03 001 számú DAAD ösztöndíj teremtette meg (10 hónap), a kísérletekhez a 933003 számú környezetszennyezés orvosi vonatkozásai kutatástámogatás nyújtott fedezetet.

**14. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK
KÜLÖNLENYOMATAI ÉS KÉZIRATA**

I.

II.

III.