

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Géhl Zsuzsanna

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



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Géhl Zsuzsanna

Témavezető: Prof. Dr. Virág László



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

Tartalomjegyzék	Oldalszám
1. Bevezetés	9
1.1. Oxidatív stressz	9
1.1.1. Endogén oxidánsok	9
1.1.1.1. Reaktív oxigén származékok (ROS)	9
1.1.1.2. Reaktív nitrogén származékok (RNS)	10
1.1.2. Exogén oxidánsok	11
1.1.3. Antioxidáns rendszerek	11
1.1.4. Az oxidatív stressz biológiai hatása	13
1.1.4.1. Az oxidatív stressz DNS-re gyakorolt hatása	13
1.1.4.2. Az oxidatív stressz lipidekre gyakorolt hatása	14
1.1.4.3. Az oxidatív stressz fehérjékre gyakorolt hatása	14
1.1.5. Az oxidatív stressz kimutatása	14
1.2. A poli-ADP-ribóziláció és biológiai jelentősége	15
1.2.1. A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) szerkezete	15
1.2.2. A PARP felépítése és működése, és a poli(ADP-ribóz) (PAR) metabolizmusa	16
1.2.3. A PARP aktiváció sejtszintű hatása	19
1.3. Melanomák epidemiológiai és klinikai sajátosságai	21
1.3.1. Bőr melanoma (CM)	21
1.3.2. Uveális melanoma (UM)	22

1.3.3. A bőr és uveális melanomák biológiai sajátosságai	24
1.3.3.1. Az UM immunológiai vonatkozása	25
1.3.4. PARP szerepe a melanomák kialakulásában	26
1.3.5. PARP inhibitorok (PARPi) a daganatterápiában	27
1.4. Diabétesz mellitusz és a diabéteszes retinopátia	28
1.4.1. Diabétesz mellitusz epidemiológiája és klinikuma	28
1.4.2. Diabéteszes retinopátia (DRP)	29
1.4.2.1. DRP epidemiológiája	29
1.4.2.2. DRP klinikai tünetei, kezelése	30
1.4.3 Oxidatív stressz szerepe a diabétesz és DRP kialakulásában	31
1.4.4. AGE (advanced glycation endproducts) a diabéteszben	33
2. Célkitűzés	35
3. Anyagok és Módszerek	37
3.1. Bőrminták	37
3.2. Szemminták	37
3.3. PAR kimutatás hisztokémiai módszerekkel	38
3.4. A PAR festődés vizsgálata humán melanoma sejtvonalon	38
3.5. A vizsgálatba bevont diabéteszes betegpopuláció	39
3.6. Advanced Glycation End Products (AGE) meghatározás	39
3.7. Fehérje karboniláció meghatározás	40
3.8. Glutation meghatározás	40

3.9. Statisztikai módszerek	40
4. Eredmények	41
4.1. Melanoma sejtek PAR festődése	41
4.2. PAR képződés bőr melanomában	42
4.3. PAR expresszió uveális melanomában	46
4.4. Diabétesz indukálta oxidatív stresszmarkerek vizsgálata üvegtestben	48
5. Megbeszélés	51
5.1. PAR szerepe melanomákban	51
5.2. Oxidatív stressz DRP-ban	54
5.3. Főbb tudományos eredményeink	57
6. Összefoglalás	59
7. Summary	60
8. Irodalomjegyzék	61
9. Tárgyszavak	78
10. Köszönetnyilvánítás	79
11. Közlemények listája	80
12. Függelék (Közlemények másolatai)	

Rövidítések

A nehézkesen magyarra fordítható kifejezések a jegyzékben angolul szerepelnek

ABC	avidin- biotin peroxidáz komplex
AGE	advanced glycation endproducts
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMD	age-related macular degeneration (korfüggő macula elfajulás)
AR	aldóz redukáz
ARI	aldóz redukáz inhibitor
ATP	adenozin trifoszfát
BAP1	BRCA1 protein-1 deubikvitináz enzimet kódoló gén
BER	base excision repair (báziskivágásos javítás)
BRAF	protoonkogén (B-Raf nevű fehérjét tartalmaz)
cNOS	konstitutív nitrogén monoxid szintetáz
CTLA-4	citotoxikus T limfocita asszociált protein 4
DNS	dezoxiribonukleinsav
DNP	dinitrofenol
DRP	diabétesz eredetű retinopátia
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FADH ₂	redukált flavin adenin dinukleotid
GPx	glutátion peroxidáz
GSH	glutátion

HbA1c	glikált hemoglobin
HIF-1	hypoxia-inducible factor 1
HRR	homologous recombination repair
ICAM-1	intercelluláris adhézións molekula-1
IGF-1	insulin-like growth factor-1
iNOS	indukálható nitrogén monoxid szintetáz
IRMA	intraretinal microvascular abnormalities
LM	lentigo maligna melanoma
MAR	multiprotein replikációs komplex
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MDA	malondialdehyd
MGO	metilglioxál
MHC	major histocompatibility complex
MMR	mismatch repair
NAD ⁺	nikotinamid-adenin dinukleotid
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NER	nucleotide excision repair
NF-κB	nuclear factor kappa B
NLS	nuclear localisation signal
NMDA	N-metil-D aszpartát
NM	nodularis melanoma malignum

NO	nitrogén monoxid
NOS	nitrogén monoxid szintetáz
NRF2	nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
ONOO-	peroxinitrit
PAR	poli(ADP-ribóz)
PARG	poli(ADP-ribóz) glikohidroláz
PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz
PARP-/-	PARP1 deficiens (knock out)
PARP+/-	vad típusú PARP1 génekkel rendelkező
PARPi	PARP inhibitor
PARS	poli(ADP-ribóz) szintetáz
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PDR	proliferatív diabétesz eredetű retinopátia
PJ34	N-(-oxo-5,6-dihidro-fenantridi-nin-2-yl)-N, N-dimetilacetamid)
PKC	protein kináz C
RAAS	renin-angiotensin-aldosterone system
RAGE	receptor for advanced glycation endproducts
RNI	reaktív nitrogén intermediér
ROI	reaktív oxigén intermediér
ROS	reaktív oxigén származékok
RNS	reaktív nitrogén származékok

SD	szorbitol dehidrogenáz
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SPR	short patch repair
SSM	superficial spreading melanoma (felszínesen terjedő melanoma)
TBS	tris-buffered saline
TCA	triklórecetsav
TGF	Transforming growth factor
UV	ultraibolya (sugárzás)
VEGF	vascular endothelial growth factor

1. Bevezetés

1.1. Oxidatív stressz

Oxidatív stresszről akkor beszélünk, ha a szabadgyökök termelődése és lebontása közötti egyensúly felborul. A szabadgyökök olyan egy vagy több párosítatlan elektronnal rendelkező atomok vagy molekulák, melyek a felszínükön lévő szabad elektron(ok) miatt könnyen lépnek kémiai reakcióba más molekulával, arról elektront felvéve, vagy annak átadva. A szabadgyökök számos módon keletkezhetnek a szervezetben fiziológias körülmények között, de toxikus ágensek (pl. cigarettafüst, UV sugárzás, légköri szennyeződés) hatására is. Oxidatív stresszt nem csak a fokozott szabadgyök termelés, hanem a csökkent lebontásuk, az azokat végző ún. antioxidáns rendszerek meghibásodása is okozhatja.

1.1.1. Endogén oxidánsok

Az oxidatív stressz reaktív vegyületeit alapvetően két nagy csoportba osztjuk. Az egyik, az oxigén eredetű reaktív vegyületek a ROS (reaktív oxigén származékok) a másik a nitrogén eredetű reaktív nitrogén származékok, az RNS (reaktív nitrogén származékok) (Valko és mtsai 2006).

1.1.1.1. Reaktív oxigén származékok (ROS)

Normál sejtmétabolizmus során molekuláris oxigénből keletkeznek sorozatos redukcióval. Két alcsoportjuk van: egyik csoportba tartoznak a szabad gyökök (ilyenek a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) és a hidroxil gyök ($\cdot OH$), amelyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek, a másikba azok a molekulák, amelyek ugyan nem szabad gyökök, de reaktívak és reakcióik során szabad gyök képzésére képesek. Ilyenek a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a szinglet oxigén (1O_2) és a hipoklórossav ($HOCl$). A hipoklórossav erős oxidálószer, fehérvérsejtek által termelt antibakteriális hatású vegyület, de a szervezet számos molekulájával reakcióba lép (Schraufstatter és mtsai 1990, Cheeseman és mtsai 1993).

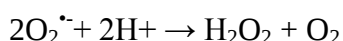
A legfontosabb ROS-ok:

a, Szuperoxid anion: $O_2^{\bullet -}$

Kialakulása: NADPH oxidáz vagy xantin oxidáz hatására, a mitokondrium elektron transzport folyamatában a molekuláris oxigén egy elektront vesz fel. A légzési láncban normál esetben 4 elektron redukálja az oxigén molekulát és víz keletkezik, de a lánc ép működése esetén is az elektronok kb 1-3 %-a megszökve a rendszerből szuperoxidot képez (Kovacic és mtsai 2005).

b, Hidrogén peroxid: H_2O_2

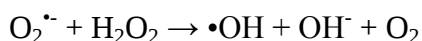
Kialakulása: Szuperoxidból szuperoxid-dizmutáz (SOD) vagy NADPH oxidáz vagy xantin oxidáz hatására keletkezik.



A H_2O_2 átmeneti fém jelenlétében, mint pl. Fe^{2+} vagy Cu^+ elhasadhat, és belőle Fenton reakció során hidroxilgyök alakul ki:



A hidrogén peroxid szuperoxiddal reagálva, az ún. Haber–Weiss reakcióban hidroxil gyököt képez (Kehrer 2000, Liochev és Fridovich 2002).



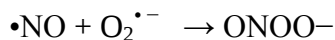
c, Hidroxil gyök: $\bullet OH$: a legreaktívabb gyök, H_2O_2 -ből alakul ki, a fentebb vázolt reakciókban.

Ezen túl számos egyéb ROS ismert (pl. hipoklórsav, peroxil, hydroperoxil) (Halliwell és Gutteridge 1990, Cheeseman és Slater 1993, Gutteridge és Halliwell 2000, Halliwell és Whiteman 2004).

1.1.1.2. Reaktív nitrogén származékok (RNS)

A reaktív nitrogén származékok a ROS analógiájára nitrozatív stresszt okoznak. A legismertebb RNS-ek a nitrogén-monoxid ($NO\bullet$), nitrogén-dioxid ($O_2^{\bullet -}$), és a nitrogén

monoxid és szuperoxid reakciójából keletkező peroxinitrit (ONOO-) (Beckman és Koppenol 1996).



A NO argininből keletkezik NO szintetázok (NOS) hatására. Maga a peroxinitrit ugyan nem szabadgyök, mégis nagyon reaktív vegyület. Egyik legjellemzőbb reakciója a fehérjék aromás oldalláncainak, a tirozinnak és a triptofánnak nitrálása. Az *in vivo* termelődő peroxinitrit elfogadott indikátora a nitrotirozin (Beckman és Koppenol 1996, Crow és Ischiropoulos 1996).

1.1.2. Exogén oxidánsok

Az oxidatív folyamatokat számos külső tényező indukálhatja, fokozhatja. Ilyenek a hiperoxia, cigaretta füst, ózon, ionizáló sugárzás. Az UV-A sugárzás az endogén fotoszenzitív anyagokat (porfirin, riboflavin stb.) triggerelve indítja be az oxidatív folyamatokat, hasonlóan hatnak a nehézfémek: vas, réz, ólom, higany, arzén, nikkel (Kovacs és mtsai 2012).

1.1.3. Antioxidáns rendszerek

A biológiai folyamatok során termelődő oxidatív ágensek hatását - a termelődés mellett - az eltakarító, antioxidáns rendszerek működése határozza meg. Ezen elsősorban a szervezet saját védelmi rendszerét értjük, melyet enzimek, és nem enzimikus antioxidánsok alkotnak.

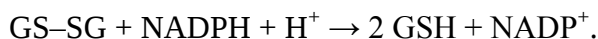
Az antioxidáns folyamatokban részt vevő legfontosabb enzimek: a szuperoxid dizmutáz (SOD), kataláz és peroxidázok (pl. glutation peroxidáz; (GPx)). Ismertek még a tioredoxin, peroxiredoxin, glutation transzferáz (Soloviev és mtsai 2003, Amacher 2006, Lipinski 2011).

A kataláz a hidrogén-peroxid metabolizmus fő szabályozója, segítségével a H₂O₂ oxigénné és vízzé hasad, vagyis neutralizálódik.

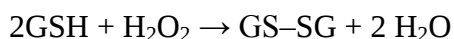
A szuperoxid dizmutáz (SOD) a szuperoxid aniont ($O_2^{\cdot-}$) hidrogén peroxiddá és molekuláris oxigénné alakítja (dizmutálja) (McCord és Fridovich 1969). Emlős sejtekben 3 formája van Cu-Zn-SOD (SOD1) a citoplazmában, Mn-SOD (SOD2) a mitokondriumban, és az extracelluláris EC-SOD. A szem szöveteiben bár kimutathatóak a különböző SOD izoenzimek, szintjük általában alacsonyabb, mint egyéb szervekben, így feltételezhető, hogy itt nem a SOD képezi az antioxidáns rendszer fő gerincét (Behndig és mtsai 1998).

Külön kell szólni a glutationról (GSH), ami fontos természetes antioxidáns, feladata a szervezetben keletkezett reaktív molekulák eltakarítása. Szinte mindenféle sejtben megtalálható, egyben a redox háztartás felborulásának fontos biomarkere.

A glutation az oxidált fehérje-cisztein diszulfidkötéseket redukálja, annak elektront adva át, ezáltal oxidált formába kerülve (glutation diszulfid: GSSG). Ahhoz, hogy ismét hatékony formába kerüljön, a glutation reduktáz NADPH-ról származó elektron felhasználásával redukálja vissza:



A redukált és oxidált formának az aránya az adott rendszer oxidatív stressz terhelésének mérésére gyakran alkalmazott módszer. A GSH antioxidáns hatását több módon fejt ki. Egyrészt a GPx aktiválásával a hidrogén-peroxidot és lipid peroxidokat detoxifikálja. Ennek során a GSH elektront ad a H_2O_2 -nak, azt H_2O és $O_2^{\cdot-}$ -vá redukálva. A membrán lipideknek protont adva fontos szerepe van azok oxidatív károsodás elleni védelmében. A glutation peroxidáz a lipid hidroperoxidokat redukálja a megfelelő alkoholformákba, és a szabad hidrogén-peroxidot vízzé redukálja.



A fenti enzimekben közös, hogy a redukáláshoz NADPH-ra van szükségük. Az intracelluláris NADPH a $NADP^+$ redukciójából képződik glükóz-6-foszfát dehidrogenáz által, ami így szintén antioxidáns enzimnek számít.

A nem enzimatisz antiozidánsok legismertebb tagjai a C, E vitamin, béta-karotinoidok, glutation, bioflavonoidok.

1.1.4. Az oxidatív stressz biológiai hatása

A szabadgyökök fontos szerepet játszanak a szervezetet támadó mikroorganizmusok eltávolításában, segítve az immunrendszer működését. A NADPH-oxidáz jellemzően az antibakteriális védekezésben fontos szerepet játszó polimorfonukleáris leukocitákban, monocitákban és makrofágokban található. A bennük termelődött szuperoxid a baktericid hatásért felelős. Intenzív ROS/RNS termelődés esetén azonban elsősorban toxikus hatásuk érvényesül, sejtdiszfunkciót, illetve sejthalált okozva. Ennek több útvonala lehetséges, mint lipidperoxidáció során sejtmembrán destrukció, mitokondrium károsodás során az ATP termelő folyamatok sérülése. A fehérjekárosító mechanizmus során sérülhetnek enzimek, receptorok, számos létfontosságú biokémiai folyamat résztvevő molekulái. A szabadgyökök károsíthatják ugyanakkor magát a DNS szerkezetét, gátolhatják a replikációt (Finkel és Holbrook 2000, Sies és mtsai 2017).

Számos betegség patofiziológiájában igazolták az oxidatív stressz szerepét. Ilyenek, az ateroszklerózis (Harrison és mtsai 2003), isémia/reperfúzió (Marczin és mtsai 2003), neurológiai és pulmonológiai kórképek. Külön kiemelendő a diabéteszben és a daganatokban betöltött szerepe, mely jelen dolgozatunk tárgyát is képezi.

1.1.4.1. Az oxidatív stressz DNS-re gyakorolt hatása

A szabadgyökök DNS-re gyakorolt hatása számos módon nyilvánulhat meg: kialakulhatnak egyes vagy kettes DNS törések, báziskárosodás, mutáció, deléción, transzlokáción, fehérjékkel való keresztkötések. Az oxidatív stressz hatására létrejött kóros metiláción is a DNS repair befolyásolhatja. A DNS transzkripciós faktort kötő konszenzus szekvenciái guanin-citozinban gazdag szekvenciák, melyek különösen érzékenyek oxidatív behatásra. A legismertebb DNS károsodás oxidatív stresszben a 8-hidroxi guanin képződés, ami egyben jól ismert biomarkere a karcinogenezisnek (Valavanidis és mtsai, 2009).

1.1.4.2. Az oxidatív stressz lipidekre gyakorolt hatása

A ROS lipid peroxidációt is indukálhat, elvéve egy elektront a többszörösen telítetlen zsírsavakról. A lipidgyökök és oxigén reakciójából peroxil gyök keletkezik. Ez láncreakciót indukálva a többszörösen telítetlen zsírsavakat lipid hidroperoxiddá alakítja. A lipid hidroperoxidok instabil vegyületek, gyakran esnek szét másodlagos termékekké, aldehidek alakulnak ki belőlük: pl. 4-hidroxinonenal, 4-oxononenal, akrolein és malondialdehid (MDA). Ezek közül a MDA az egyik legismertebb biológiai marker. A lipid peroxidáció termékei az izoprosztánok is, melyek az arachidonsav peroxidációjával keletkeznek. A lipidperoxidáció legfontosabb biológiai hatása a membránlipidek oxidációja által a sejtmembrán integritásának károsodása. Megbontva a lipidkettősréteget, az ehhez kötött enzimeket és receptorokat inaktíválhatja. A lipidperoxidáció során keletkezett MDA és egyéb reaktív aldehidek számos sejtfehérjét inaktíválnak keresztkötések létrehozásával (Gutteridge 1995).

1.1.4.3. Az oxidatív stressz fehérjékre gyakorolt hatása

A ROS másik fontos célcsoportja a fehérjék. A rajtuk fellelhető számos oldallánc közül a cisztein, metionin és tirozin az oxidáció preferált célpontjai. A karbonilok, melyek a fehérje oxidáció végtermékei, egyben jól ismert oxidatív stressz biomarkerek. A ROS hatására a fehérjék szerkezete felbomolhat, keresztkötések alakulhatnak ki, a proteolízis fokozódhat, s mindez a fehérjék funkcióvesztését eredményezi.

1.1.5. Az oxidatív stressz kimutatása

Miután a szabadgyökök igen reaktívak és rövid a féléletidejük, bár speciális módszerekkel lehetséges direkt vizsgálatuk is, rutinszerűen laborkörülmények között kimutatásuk nehézségbe ütközik. Ugyanakkor az oxidatív stressz eredményeként megváltozott szerkezetű fehérjék, DNS-ek, és lipidek stabilabbak, *in vitro* körülmények között ezek az oxidált metabolitok könnyen kimutathatóak. Az oxidatív stressz biológiai hatásának vizsgálatában fontos információt nyújthat az antioxidáns rendszer elemeinek kimutatása is (Zweier és mtsai 1987, Dalle-Donne és mtsai 2006).

1.2. A poli-ADP-ribóziláció és biológiai jelentősége

Számos, különösen gyulladásos, degeneratív és isémia-reperfúzió (I/R) alapuló betegségben jól ismert a reaktív oxigén és nitrogén tartalmú intermedierek (ROI/RNI) patogenetikai szerepe. A ROI/RNI okozta szövetkárosodási útvonal egy késői, így klinikai beavatkozásra is elegendő időt (széles terápiás ablakot) engedő lépése a poli-ADP-ribóz (PAR) metabolizmus fokozódása (Heller és mtsai 1995). A poli-ADP-ribóziláció a poli(ADP-ribóz) polimerázok (PARP) által katalizált, sokrétű biológiai funkcióval bíró poszttranszlációs fehérjemódosítási folyamat, melynek szerepet tulajdonítanak a sejthalál, a DNS hibajavítás, a replikáció, a transzkripció és differenciálódás szabályozásában. A poli-ADP-ribóz metabolizmust gátló beavatkozásokkal e betegségek állatmodelljeiben kiváló eredményt értek el. A ROI/RNI-PARP aktiváció útvonal a szem patológiájában is fontos szerepet játszik (Virág 2003). Nitrogén monoxid és a peroxinitrit termelődését valamint a poli-ADP-ribóziláció gátlásának hatékonyságát mutatták ki különféle szembetegség-modellekben (pl. a retina isémia-reperfúziós károsodásában, kísérletes autoimmun uveitisben, diabéteszes retinopátiában) (Hottiger és mtsai 2010, Virág 2013).

1.2.1. A PARP-1 szerkezete

A PARP-1 az eukariota sejtek magjában megtalálható enzim, a sejtmag egyik legnagyobb mennyiségben megtalálható fehérjéje. Mérete 116 kDa, felépítése nagyfokú konzerváltságot mutat a különböző eukariotákban. Három fő doménjéből az egyik, az N-terminális végen elhelyezkedő DNS kötő domén, ezt egy önmódosító domén köti össze a másik, C terminális végen elhelyezkedő katalitikus doménnel. Az automodifikációs domén az auto-poli-ribóziláció akceptor helyeként működik (Mazen és mtsai 1989, de Murcia és Menissier de Murcia 1994, de Murcia és mtsai 1983, 1986, 1994, Smith 2001) (1. ábra).



1.ábra. A PARP-1 doménszerkezetének vázlata

(NLS= nuclear localisation signal)

Sokáig a PARP-1 volt az egyetlen ismert PARP enzim. Kiderült azonban, hogy PARP-1 deficiens sejtekben is megfigyelhető PAR polimerképződés (Shieh és mtsai 1998).

Ma már a PARP enzimes család 17 tagja ismert, de ebből igazán csak 3 enzimet tartunk igazi PARP-nak, mert a többi enzim valójában mono ADP-riboszil transzferázként működik, vagy aktivitásuk kevésbé jellemzett (Ame és mtsai 2004, Virág és Szabó, 2002).

A sejtek PARP aktivitásának 95%-át a PARP-1 adja. A különböző PARP molekulák eltérnek domén szerkezetükben, sejten és szöveteken belüli elhelyezkedésükben, DNS-kötő képességükben.

1.2.2. A PARP-1 felépítése és működése, PAR metabolizmusa

A PARP-1 nagyon konzervatív magfehérje, ami folyamatosan expresszálódik. Az enzim 42-kDa –os DNS kötő N-terminális doménnel kapcsolódik az egyes vagy kettősszállú DNS törésekhez nagy affinitású cinkujjakkal, stimulálva az enzimaktivitást. Ha nincsenek DNS károsodások, az enzim alapaktivitása minimális. Ugyanakkor, ha élő sejteket stimulálunk DNS károsító hatásokkal, mint ionizáló sugárzás, alkiláló szerek, oxidánsok, azonnal fokozódik a PARP aktivitás.

Sokáig feltételezték, hogy a PARP csak DNS törés hatására aktiválódik. A ROS/RNS PARP aktiváló hatását ismerten DNS törések létrehozása által váltja ki. Hasonlóan DNS töréseket okozva aktiválják a PARP-ot az ionizáló sugárzás, alkiláló szerek. Ma már tudjuk, hogy bizonyos DNS struktúrák DNS károsodás hiányában is aktiválni tudják az enzimet. A PARP képes kötődni ugyanis bizonyos nem-B struktúrájú DNS-hez (kereszt, hajtű stb. alakú) is, és ez által aktiválódni (Lonskaya és mtsai 2005). Partner fehérjékkel

való kapcsolódás is aktiválódáshoz vezethet. Bizonyos fehérje módosító folyamatok, mint egyes protein kinázok által végzett foszforiláció is a PARP aktivitást fokozza, ugyanakkor a PARP-1 acetilációja is fokozhatja az enzim működését (Cohen-Armon és mtsai 2007).

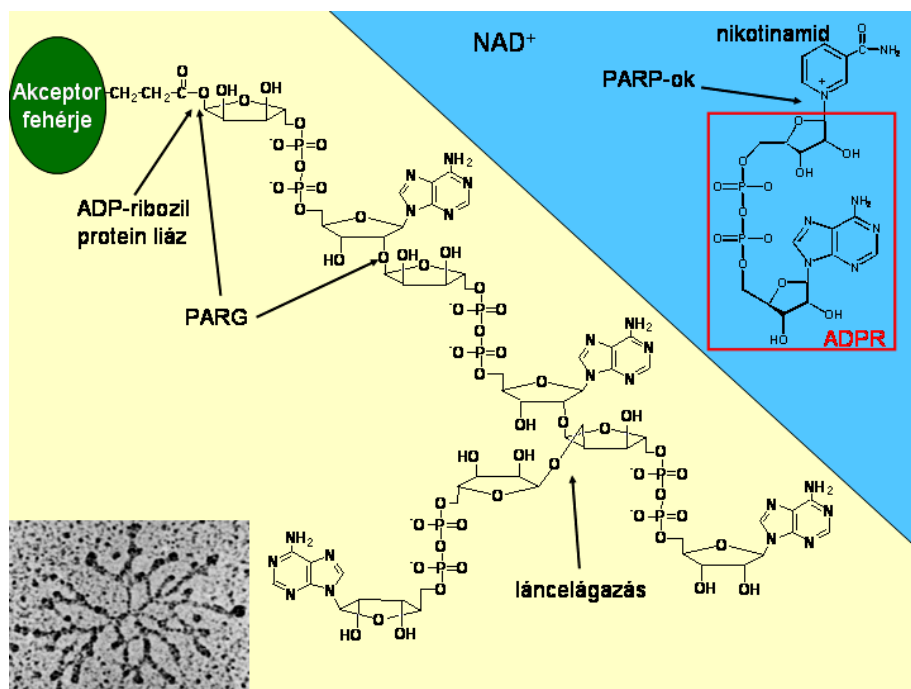
Az aktivált PARP-1 NAD⁺ (nikotinamid-adenin dinukleotid) molekulákból ADP-ribóz egységeket lehasítva, azokból egy nukleinsavszerű poli (ADP-ribóz) polimert képez. A PARP aktiváció megmutatkozhat auto-PAR-ilációban, mikor is a PARP-1 a szubsztrát, és a folyamat hatására a PARP-1 leválik a károsodott DNS-ről és gátolódik az enzimaktivitása. Hetero- vagy transz-PAR-ilációban egyéb szubsztrát a polimer akceptora.

A PARP target fehérjéihez kovalens kötéssel kapcsolódva változtatja meg annak fizikokémiai tulajdonságait. Ebben a posttranszlációs modifikációs folyamatban azonban a leggyakoribb akceptor fehérje, maga a PARP-1, vagyis auto-PAR-iláció történik. Megfigyelték azt is, hogy egyes szabad ADP láncok nem-kovalensen is kötődhetnek fehérjékhez, hosszabb láncok magasabb aktivitással.

Miután a PARP-1 nagy mennyiségben megtalálható a sejtmagban, DNS károsodás során azonnal nagy mennyiségben tud aktivizálódni. Ugyanakkor DNS károsodás hiányában sem haszontalanul termelődik, ilyenkor alternatív funkciói kerülnek előtérbe, mint kromatinfelépítés, replikáció, telomer fenntartás, NFκB koaktivátor, ez utóbbi nem is kívánja meg a DNS kötődést, sem az enzimaktivitást (Hassa és mtsai, 2001, Chang és Alvarez-Gonzalez, 2001).

A PAR szintézist PARP enzimek végzik, ezek a PARS: poli(ADP-ribóz) szintetáz és poli(ADP-ribóz) transzferáz néven is ismeretesek. A PARP enzimek a NAD⁺ molekulákból ADP-ribóz egységeket lehasítva, azokból egy nukleinsavszerű poli (ADP-ribóz) polimert képeznek fehérjék glutamát oldalláncjaihoz kapcsolva. A polimerek hossza néhánytól a néhány száz (kb. 200) monomerig terjed. A PAR a fehérjéknek negatív töltést kölcsönöz, megváltoztatva azok fiziko-kémiai tulajdonságát. A PARP-1 aktivitás szabályozása különböző mechanizmusokkal történik. A működését gátló folyamatok közül a legismertebb az auto-PAR-iláció (Kawaichi és mtsai, 1981). A purinok, melyek pl. isémia következtében felszaporodhatnak, szintén a poli-ADP-riboziláció endogén gátlójaként működnek (Virág és Szabó, 2001). A nikotinamid mint hasítási termék szintén gátló módon hat vissza. A protein kináz C foszforilálva a PARP

enzimet, annak gátlását okozza. (Tanaka és mtsai, 1987, Bauer és mtsai, 1992, 1994). A PAR polimerek lebontást a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) (Miwa és Sugimura, 1971, Miwa és mtsai, 1974). és ADP ribozil protein liáz végzi (Oka és mtsai, 1984). A polimer szintetizálása és lebontása egy összehangolt, dinamikus folyamat, a polimerek féléletideje kevesebb, mint néhány perc (2. ábra).



2. ábra. A poli(ADP-ribóz) szintézise és lebontása.

A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimek a NAD^+ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítják, és ez utóbbiból hosszú, elágazó (ADP-ribóz) $_n$ polimereket szintetizálnak megfelelő akceptorfehérjék glutamát oldalláncához kapcsolva. A polimer lebontását a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) végzi. Az ADP-ribózil protein liáz szerepe a fehérjéhez közvetlenül kapcsolódó, proximális ADP-ribóz eltávolítása.

A PARG csak kis mennyiségben található meg a sejtekben, ezért nehéz izolálni is. Mechanizmusa: poli(ADP-ribóz) polimerek terminális ADP-ribóz egységeit hidrolizálja exoglikozidáz aktivitása révén, endoglikozidázként pedig nagyobb oligo(ADP-ribóz) egységek eltávolítását végzi. K_m értéke alapján először endo-, majd exoglikozidázként működik, mivel a PARG K_m értéke a nagyobb ADP-ribóz polimerekhez sokkal alacsonyabb (Brochu és mtsai 1994, Davidovic és mtsai 2001, Hatekayama és mtsai 1986). Magas specifikus aktivitása van, kompenzálva a kis mennyiségét. PARG gátlásra in vivo gyakran tannin származékot használnak.

1.2.3. A PARP aktiváció sejtszintű hatása

A PARP hatásának vizsgálata laboratóriumi körülmények között, az enzim gátlásával történik. Korábbi vizsgálatokban a PARP gyógyszeres gátlásával próbálták következtetni annak hatására. Először nikotinamid, benzamid illetve 3-aminobenzamid használatával gátolták a PARP működését, később a PARP-1 knockout egerek megjelenése járt nagy jelentőséggel (de Murcia és mtsai 1997, Shieh 1998, Wang és mtsai 1995).

A PARP-1 egy multifunkcionális szabályzó enzimként számos biológiai folyamat szabályozásában vesz részt. A PARiláció, illetve a PARP-1 más fehérjékkel való interakciója számos sejtszintű folyamatot befolyásol, mint a genom organizáció, transzkripció, replikáció, DNS javítás. Ezen molekuláris szabályozó mechanizmusok révén szabályozza a proliferációt, differenciálódást, anyagcserét és a sejthalált.

A PARP-1 elsőként igazolt feladata a **genom integritásának fenntartása, a DNS hibajavításban betöltött szerepe** volt (Burkle 2001, De Vos és mtsai 2012, Durkacz és mtsai 1980, Kraus és Hottiger 2013, Schreiber és mtsai 1995, Szabó 2000, Ziegler és Oei 2001). A genom integritása a genomban található információk károsodás nélküli megőrzését és utódsejtekbe való továbbadását jelenti. A PARP gátlása során károsodik a bázis kivágásos hibajavítás (BER: base excision repair). A BER feladata a mutagén bázisok kivágása, cseréje.

A folyamatban glikoziláz enzimek ismerik fel a hibás bázisokat, hasítják a nukleotidok β -N glikozidos kötését. A keletkező rést a DNS polimeráz β foltozza be, a szálvégeket pedig a DNS ligáz illeszti. A BER-nek két fő útvonala ismert. Az egyik, amikor csak egy bázispárt helyettesít, ez a „short patch repair” a másik, a „long patch repair”, ahol több egymás utáni (10-15) nukleotid cseréje történik. Emlősökben elsősorban a short patch repair jellemző, és a long patch repair akkor aktiválódik, ha az előbbi elakad. PARP-1^{-/-} egereken mind a long patch repair és a short patch repair is csökken, és fokozódik a sejtek érzékenysége a DNS károsító UV sugárzásra, topoizomeráz I gátlókra, alkiláló szerekre (Dantzer és mtsai 2000).

A PARP-1 számos fontos fehérje **transzkripciós szabályozásában** vesz részt (de Murcia és mtsai 1986, Lindahl és mtsai 1995). Ilyenek az iNOS, intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1) és az MHC II hisztokompatibilitási antigének. E fehérjék

szabályozásában az NF κ B transzkripciós faktor kulcsszerepet játszik. A PARP-1 ebben a folyamatban az NF κ B koaktivátoraként vesz részt. A PARP-1 transzkripciós szabályozó működésében lényeges lehet a kromatin fellazítása is, ami a hisztonok poli-ADP-ribozilációja révén valósul meg. A negatív töltésű polimerek és a DNS közötti elektrosztatikus taszítás lazítja a kromatin szerkezetét, miáltal a gének elérhetővé válnak a transzkripciós apparátus számára, így segítve a DNS hibajavítást (Bergeron és mtsai 1997, Boulikas 1990, Nagele 1995, Oliver és mtsai 1999, Panzeter 1992, Tanuma és mtsai 1985).

A PARP szerepet játszik a sejtproliferációban és differenciálódásban. Erre utal, hogy proliferáló sejtek magjában a PARP metabolizmus fokozódik. (Tanuma és mtsai 1978, Kanai és mtsai 1981, Leduc és mtsai 1988, Bakondi és mtsai 2002). Szabályozza a replikációt. Részt vesz az MRC (multiprotein replikációs komplex) kialakulásában, az annak felépítésében résztvevő molekulákról (DNS polimeráz α , topoizomeráz I és II, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) derült ki, hogy poli-ADP ribozilálódik (Simbulan-Rosenthal és mtsai 1996, Dantzer és mtsai 1998). A PARP gátlása zavart okozhat a differenciálódás folyamatában, bár az ezirányú vizsgálatok eredményei modell specifikus eltéréseket mutatnak. Szerepet játszik még a telomeráz aktivitás szabályozásában, a telomer elongációt segítve.

1.3. Melanomák epidemiológiai és klinikai sajátosságai

1.3.1. Bőr melanoma (CM)

A bőr malignus melanomája a legmalignusabb bőrdaganat, mely a bőr festékes sejtjeiből, a melanocytákból alakul ki. A teljes testen megjelenő melanociták anyajegyek száma és a korábban előforduló epitheliális bőrtumor emeli a CM kialakulásának rizikóját (Lawson és mtsai 1994, Marghoob és mtsai 1996, Jackson és mtsai 2000, Bakos és mtsai 2002). Az esetek kb 30%-ában a már korábban meglévő anyajegyek malignizálódnak. Ezt a malignus transzformációt jelzi, ha az anyajegy viselkedni kezd, megváltozik színe, formája mérete, a pigmenteloszlás egyenetlenné válik.

Incidenciája földrajzi területenként igen eltérő lehet: 2011-ben Új-Zélandon 50/100 000, addig Európában 13/100 000 volt az arány, s ez fokozatos növekedést mutat. Kialakulásában rizikótényező a fokozott UV sugárzás, korábbi napégések, világos bőrszín, szőke vagy vörös hajszín, anyajegyek nagy száma, genetikai és hormonális tényezők (Hedges és Scriven, 2008).

Leggyakoribb (50-70%) a szuperficiálisan terjedő melanoma (SSM), mely - ahogy neve is mutatja - felszínesen terjed, és csak több hónap után kezd vertikálisan növekedni, ekkor kifeléyesedhet, vérezhet. Leggyakrabban 40-50 év körül, főként férfiak hátán alakul ki. Viszonylag gyakori forma a nodularis melanoma malignum (NM), melyre a vertikális terjedés a jellemző, és később, 50-60 év körül alakul ki. Szintén gyakoribb férfiakon, fej, nyak és mellkasi részeken alakul ki. Ritkább a lentigo maligna melanoma (LM), mely idős nöbetegek arcán, kéz hátán jellemző. Az acrolentiginosus melanoma főként a kéz vagy láb nagyujjának körme körül alakul ki, és rossz a prognózisa. Ismert még a nyálkahártya melanoma, illetve az amelanotikus melanoma is.

A prognózis leginkább attól függ, mely stádiumban került felfedezésre. A korai stádiumban diagnosztizált és sebészileg eltávolított melanomák esetében van a legnagyobb esély a teljes gyógyulásra, míg az el nem távolított illetve előrehaladott tumorok esetében rossz a prognózis (Garbe és mtsai 1995, Ahmed 1997). Ha nincs nyirokcsomó érintettség és távoli áttét, a prognózis jó, az 5 éves túlélés 95%, ami metasztázis esetén rövidülhet.

A klinikai-anatómiai klasszifikáció (Clark's klasszifikáció) a bőr melanómákat anatómiai elhelyezkedésük, szövettani morfológia alapján oszthatjuk csoportokba (I-V). A Clark féle stádium beosztás a Breslow-féle vastagságméréssel (I-IV) prognózis illetve kezelés meghatározáshoz használható.

Az AJCC (American Joint Committee on Cancer) osztályozó rendszer a ma elfogadott komplex osztályozó rendszer, mely a lokális elváltozások mellett magában foglalja a tumor szervezeten belüli kiterjedését is, mivel 3 fontos információt vesz figyelembe. Az első, a tumor kiterjedése, vagyis milyen mélyen nő bele a bőrbe, illetve van-e rajta kifeléelyesedés. A tumor vastagságát a Breslow módszer méri, a kifeléelyesedés pedig a melanoma bőrbe való betörését jelzi. Figyelembe veszi emellett a környező nyirokcsomók érintettség illetve távoli metasztázis jelenlétét is.

A CM kezelése elsősorban sebészi eltávolítás, mely kezdetben elég lehet a teljes gyógyuláshoz, akár a környező nyirokcsomók érintettsége esetén is. Távolabbi áttétek esetén kemoterápia, panaszt okozó áttétek esetén, különösen agyi metastasisoknál, besugárzás is szóba jön (Guerry és Schuchter 1992, Schadendorf 2002). Újabb lehetőség a biológiai szerek alkalmazása, mely az immunrendszer modulálásával fejti ki hatását, és gátolja mind a primer tumor mind pedig az áttétek növekedését (Kasper 2007).

1.3.2. Uveális melanoma (UM)

Az UM ritka megbetegedés, a malignus daganatok által okozott halálok 0,1%-áért felelős. Ugyanakkor ez a leggyakoribb primer intraoculáris rosszindulatú daganat a felnőtt korosztályban. Incidenciája 4,3-7,5/1000000 (Singh és mtsai 2004, Sato és mtsai 2008). Egyes skandináv országokban magasabb az incidencia: 7,5/1000000 évente, amit összefüggésbe hoznak a világos szivárványhártya színnel.

Az átlagos 5 éves túlélési arány 60 %, ami köszönhető a metasztázisok magas arányának. Metasztázissal az átlagos túlélés kb. 6 hónap, az egy éves túlélés esélye 15-20 %, és 10% a kétévesé, kezeléstől függetlenül.

Kialakulása átlagosan 55 év körülre tehető, de bármely életkorban előfordulhat, nagyon ritkán még gyerekekben is. Nemek közötti előfordulása egyenlő.

Kiindulási helye a szemben belül az uvea vagyis az érhártya. Az uvea bármely részéből kialakulhat de leggyakrabban, az esetek 85%-ban a chorioideából indul ki, és csak 9% corpus ciliare illetve 6% iris eredetű.

Az uveális melanomák kialakulásában egyre több etiológiai tényező válik ismertté.

Vizsgálatok alapján -szemben a bőrmelanómákkal- nem valószínű, hogy kialakulásában a környezeti UV sugárzás szerepet játszana (Singh és mtsai 2004).

Szövettanilag orsósejtes, epitheloid sejtes illetve kevertsejtes tumorokat különböztetünk meg. A legjobb prognózisú az orsó sejtes, míg a legrosszabb az epitheloid sejtes, ebben a sorrendben fokozódik a mitotikus aktivitás, a metasztatizáció és az extraokuláris terjedésre való hajlam. Prognózisát leginkább a metasztatizációs hajlama határozza meg, mely hematogén úton történik és az esetek felében fennáll az esélye.

Az áttétképződés helye leggyakrabban a máj (90%), ritkábban a tüdő (24%), csont (16%) illetve az agy és a gerincvelő. Máj érintettség esetén hónapokon belül halálhoz vezet. Kezelését nehezíti, hogy sugárérzékenysége gyenge, és a hagyományos kemoterápiával szemben is ellenálló. A rossz túlélési arányban nagy szerepe van annak a ténynek, hogy az áttétek is rezisztensek a hagyományos kemoterápiára. Ez a tény és a molekuláris biológiai kutatások eredménye arra sarkallja a kutatókat, hogy adjuváns és célzott terápiás lehetőségek kidolgozásával megnöveljék ezt a rossz prognózissal járó túlélési arányt. A daganat sokáig tünetmentesen növekszik, felismerése történhet véletlenül, szemfenék vizsgálat során, illetve ha növekszik, látótér kiesést okozhat.

A chorioidea melanoma klinikailag a szemfenéken dómszerű előemelkedésként jelenik meg, színe szürke, sötétbarna, de lehet amelanotikus is. Felszínén néha narancsszínű pigmentáció látszik. Ritkán diffúz, laposan terjedő. Gyakran kíséri másodlagos látóhártya leválás először csak a tumor felszínén, majd a környezetében is. Szövettani mintavétel céljából a daganat nehezen megközelíthető, ezért a diagnosztika alappillére - az alapos réslámpás vizsgálat mellett - az ultrahang vizsgálat. Ezekkel a daganat általában könnyen diagnosztizálható, mérete meghatározható, de szükség esetén finomtü-aspirációs biopszia végezhető. Ebből a mintából citológiai illetve genetikai vizsgálatot lehet végezni, és 3-as kromoszóma meghatározása is történhet prognosztikai célból. Az egyik legismertebb genetikai eltérés ugyanis a 3-as kromoszóma

monoszómia. Azok a tumorok, melyekből ez kimutatható, szignifikánsan nagyobb eséllyel metasztatizálnak (Prescher és mtsai 1996).

Kezelési lehetőségek a fokális lézer fotokoaguláció, sugárkezelés (plakk brachiterápia jód-125 vagy ruténium-106 izotóppal, protonterápia), illetve ha a tumor szemen belüli elhelyezkedése ezt lehetővé teszi, tumor rezekció is szóba jön. Sokszor azonban a tumor mérete konzervatív kezelést nem tesz lehetővé, és a műtéti megoldás a legtöbb esetben enukleáció, vagyis a daganatos szemgolyó műtéti eltávolítása. Hazánkban a késői diagnosztika miatt az enukleációk aránya 70% (Damjanovich 2013). A különböző kezelési módszerekkel elérhető sikeres tumoreltávolítás mellett a metasztázisok aránya egyenlő a különböző kezelési módszerek mellett. Ez alapján feltételezhető, hogy az áttétek a már korábban, még a tumor eltávolítása előtt kialakult mikrometasztázisokból jönnek létre (Shildkrot és Wilson 2009, Field és Harbour 2014).

1.3.3. A bőr és uveális melanomák biológiai sajátosságai

A melanomák a melanocyták malignus elfajulásából alakulnak ki. A melanocyták fejlődéstanilag közös gyökerűek, s bár sejtszintű működésük is hasonló a különböző szervekben, a bőr és uveális melanomák egymástól lényegesen eltérő klinikai lefolyást mutatnak. A kétféle tumornak eltérő a genetikai háttere, metasztatizálási módja és prognózisa. Éppen ezért a bőrmelanomák kialakulásával és terápiás lehetőségeivel szerzett tapasztalatok az UM esetében külön vizsgálatot, megerősítést igényelnek.

Szemben a bőrmelanomák incidenciájának drasztikus emelkedésével, az utóbbi évtizedekben az UM incidenciája változatlan. Fontos különbség, hogy a CM etiológiájában fontos tényezőnek számító UV sugárzás az UM esetén nem rizikótényező.

Míg a CM ban a BRAF mutáció szerepe alapján a BRAF inhibitorok (vemurafenib, dabrafenib) és MEK inhibitorok (trametinib, cobimetinib) hatékonynak mutatkoztak a metasztatizáló CM kezelésében, addig az UM esetében jelenleg sem ismert hatékony szisztémás kezelés, bár egyes MEK inhibitor (selumetinib) aktuálisan futó vizsgálatok eredményei szerint ígéretes kiegészítés lehet. Miután az UM hátterében is

kimutathatóak genetikai asszociációra utaló gének (pl GNAQ, GNA11), ezen a területen is ígéretes lehetőségnek mutatkozik a specifikus antitestek kifejlesztése (Oliva és mtsai 2016).

Míg a bőrmelanoma főként lymphatikus úton, és több szervbe (tüdő, máj, csont, agy) metasztatizál, addig az UM szinte mindig hematogén úton és a májba ad áttétet.

A metasztatizáló UM kezelése máig sok kívánnivalót hagy maga után. Sajnos napjainban még nem ismert olyan szer, ami megnövelné a túlélés esélyét, az onkológiában használt kemoterápiás szerek itt hatástalanok.

Ahhoz, hogy egyéb daganatokhoz hasonlóan sikeres kezelési lehetőségek jelenjenek meg, elengedhetetlen az UM biológiai viselkedésének molekuláris szintű vizsgálata, ismerete. Ugyanakkor más területen már sikerrel alkalmazott kezelés UM betegeken való vizsgálata is új lehetőségeket teremthet (Pandiani és mtsai 2017).

1.3.3.1. Az UM immunológiai vonatkozása

A CM és UM közötti különbség adódhat abból, hogy a szem immunprivilegizált szerv. Ez védi a szemet az erős gyulladásos reakcióktól azért, hogy megakadályozza a súlyos látásromlást okozó destruktív folyamatokat. Valószínű, hogy az UM daganatsejtjei azokat a tulajdonságokat utánozzák, melyek a normál sejteket is immunprivilegizálttá teszik, és e képességeit megtartja a szemet elhagyva, metasztatizálás során is. Az immunprivilegizált státusz tehát kedvez a daganat progressziójának. Szemben egyéb daganatokkal, az UM limfocitás infiltrációja rossz prognózist jelez, a gyulladás fokozza a tumorsejtek proliferációját és túlélését. A prognózis vizsgálatára a klinikumban is használt 3-as monoszómia is szoros összefüggést mutat a limfocitás infiltrációval. Érdekes megfigyelés, hogy a komorbiditás egyes autoimmun megbetegedésekkel növeli a túlélés idejét UM betegeknél, alátámasztva azt a tényt, hogy az autoimmunitás fontos szerepet játszik a metasztázis aktivitásának szabályozásában. Ezen immunpatológiai vonalból kiindulva feltételezhető, hogy az immunterápia, melyben akár a NK sejtek aktivitását fokozza, akár a makrofágok viselkedését befolyásolja, hatékony lehet (Oliva és mtsai 2016).

Az onkoterápiában ma már számos receptor és egyéb fehérje ellenes antitestet alkalmaznak sikeresen. A metasztatikus CM melanomák kezelésében is hatékony szer az ipilimumab, egy CTLA-4 receptor ellenes monoklonális antitest, melynek célja az immunrendszer aktiválása, a túlélést szignifikánsan megemeli. A szerrel UM betegek esetén kevés illetve ellentmondásos tapasztalatok állnak rendelkezésre. A másik gyógyszercsoport egy programozott sejthalál checkpoint fehérje, a protein 1 (PD-1) vagy CD279 ellenes antitest (nivolumab, pembrolizumab). A metasztatizáló CM melanoma mellett tüdő és veserákban is hatékonynak találták. Hatása kombinációban a CTLA-4 gátló antitesttel fokozódik.

Metasztatizáló UM-ban ezzel is csak csekély tapasztalat van, az eredmény nem egyértelmű. A Mayo Klinika nagy beteganyagon áttekintve a metasztatizáló UM kezelésében használatos szerekekkel elért kezelési eredményeket azt találta, hogy bár az ipilimumab, kináz inhibitorok (vemurafenib, temsirolimus, everolimus, selumetinib, vatalanib, sorafenib, sirolimus), és a bevacizumab jótékony hatással voltak a túlélésre, de ez a hatásuk nem volt szignifikáns (Moser és mtsai 2014).

1.3.4. PARP szerepe a melanomák kialakulásában

Abnormálisan emelkedett PARP-1 gén és fehérje expressziót többféle tumorban kimutattak már: Ewing szarkóma, malignus limfóma, bél és colorectalis tumorok, hepatocellularis karcinóma, endometrium hiperplázia, mell, hólyag, tüdő, pancreas és ovarium karcinoma.

Rodriguez és társai az PARP-1 szerepét a melanomasejtek metasztatizálásának folyamatában vizsgálták. A metasztatizálásban (angioinvázió és angiogenesis) a tumorsejtek az endothel sejtek integritásának felbomlása révén migrálnak az érfalon keresztül. A PARP-1 gátlásával a tumorspecifikus angiogenesis egyik markere, a vimentin csökkent expresszióját érték el. A PARP gátlás a metasztázis egyik legfontosabb folyamatába, az endothel-mesenchima átalakulásra hatva gátolja a metasztatizáló sejtek invázióját és megtapadását (Rodríguez és mtsai 2013).

Molloy-Simard és mtsai eltérő malignitású uveális melanoma sejtvonalakban (T97, T98, T108, T115) vizsgálták a PARP és PARG expressziót. A vizsgálatban a nagy malignitású sejtvonalban (T108, T115) magasabb volt a PARP-1 expresszió, szemben

az alacsony malignitású sejtvonalakkal. Ez alapján feltételezhetjük, hogy UM fejlődésében is szerepet játszik a PARP-1, és a PARG.

Ami meglepő volt, hogy a PARG génexpresszió gátlása a magas (T115) és alacsony (T97) malignitású sejtvonalban is szignifikáns tumorvolumen növekedést okozott, ugyanakkor a PARP-1 szupresszió megszüntette (T97) vagy majdnem teljesen megszüntette (T115) ezen sejtek in vivo tumorokozó képességét.

A PARP-al kapcsolatos ismeretek alapján adódik a feltételezés, ha a PARG-t gátoljuk, a PAR fokozódás, NAD depléciót, apoptosist segítenénk, de ez itt nem igazolódott, miután a sejtek jól szaporodtak, nem pusztultak el apoptózisban. Miután a PARP-1 automodifikációja az önmaga inaktiválásához vezet, elképzelhető, hogy a csökkent PARG expresszió fokozott PARP-1 auto-modifikációhoz és közvetett PARP-1 gátláshoz vezet, ezáltal csökkentve az apoptózis irányában módosuló sejtek arányát. Az UM -ban tehát a PARG tumorszupresszor funkcióval bírhat. A PARP-1 és PARG expresszió variációja hozzájárulhat a neoplastikus elfajuláshoz uveális melanómában, illetve fokozhatja radioterápiával szembeni rezisztenciáját. A PARP-1 expresszió vizsgálata így prognosztikus marker lehet UM esetében (Molloy-Simard és mtsai 2012).

1.3.5. PARP inhibitorok (PARPi) a daganatterápiában

Korábban a poli-ADP-ribóziláció DNS hibajavításban betöltött szerepe alapján a mutációk számának fokozódására és daganatképződésre számítottak PARP gátló kezelés kapcsán. Bár PARP-1 hiányos állatokban leírtak fokozott daganat előfordulást (Tsutsumi és mtsai 2001, Tong és mtsai 2003), hasonlóan még nem írtak le gátlószer kezelés esetében. Sőt, kísérletes bizonyítékok állnak rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy PARP gátlószeres csökkentik a tumor kialakulását és a metasztatizációs folyamatot is kedvezően befolyásolják.

A PARP-1 gyógyszeres gátlása a HRR (homologous recombination repair) deficienciával járó BRCA mutációval összefüggésbe hozható daganatokban mutatott hatékonyságot (Fathers és mtsai 2012). Hatását a PARP DNS károsodás során történő BER mechanizmusán keresztül fejti ki, miáltal a toxikus DNS károsodások a DNS

repair hiányában a tumorsejtek halálát okozza, míg a normál sejtekben a HRR ezeket a DNS hibákat kijavítaná (szintetikus letalítás paradigma).

A PARP inhibitorok hatását potenciózzák HRR deficiens tumorokban a platina alapú szerek, mint carboplatin, cisplatin, oxaliplatin. Erre az adhat magyarázatot, hogy a platina származékok a BER mellett egyéb javító mechanizmusokat is károsítanak, mint pl. nukleotid exciziós repair (NER). Emellett feltételezhető, hogy a PARPi vasodilatációt okoz, mely segíti az egyéb gyógyszerek tumorba való behatolását. Ma már a PARP gátlók a klinikai vizsgálatokban illetve gyakorlatban is jelen vannak. Ilyen tesztelt gyógyszerek az olaparib, niraparib, rucaparib, iniparib, veliparib (Curtin és Szabó 2013, Shah és mtsai 2013).

A PARP gátlók egy új, izgalmas csoportja az onkoterápiás repertoárnak. Jelenleg is számos klinikai vizsgálat folyik a PARP gátlók hatásának vizsgálatáról különböző daganatokban (clinicaltrials.gov). Ezek sikeréhez, illetve további klinikai vizsgálatok megalapozott tervezéséhez segíthet hozzá a PARP funkciójának sejtbiológiai ismerete (Chalmers 2009).

1.4. Diabétesz mellitusz és a diabéteszes retinopátia

1.4.1. A diabétesz mellitusz epidemiológiája és klinikuma

A Diabétesz mellitusz (DM) krónikus anyagcserebetegség, jellemzője az inzulin hiánya, vagy csökkent hatékonysága következtében kialakult hiperglikémia és glükóz intolerancia. A WHO szerint a diabétesz mellitusz az egyik vezető halálok, jelenleg 347 millió diabéteszes beteg él a földön, és számuk egyre növekszik. Globális prevalenciája 9% a 18 év fölötti lakosság körében (WHO 2014). A közhiedelemmel ellentétben, a diabétesz és az azzal járó egészségügyi, szociális és professzionális problémák nem csak a jómódú populációt érintik. Erre utal az a tény is, hogy a diabétesz eredetű halálozás 80%-a közepes bevételű, gazdaságú vagy szegény országokban fordul elő (WHO 2014).

A diabétesz mellitusznak több formája ismert. A két fő forma: az 1. típusú diabétesz (DM1), melyet régebben a fiatalkori vagy inzulinfüggő diabéteszként ismertünk, jellemzője a pancreas béta sejteinek autoimmun destrukciója, az inzulin

termelődésének a súlyos hiányával jár. A másik a 2. típusú diabétesz (DM2), melyet korábban felnőttkori, nem inzulinfüggő diabéteszként ismertünk, jellemzője, hogy itt termelődik insulin, ha nem is mindig elég, de a beteg túléléséhez nem szükséges külső inzulinadagolás, bár a betegség kezelése sokszor megkívánja ezt. Jellemzője a célsejtek inzulinrezisztenciája. A genetikai hajlam mellett az elhízás és fizikai inaktivitás etiológiai szerepe kiemelendő.

1.4.2. Diabéteszes retinopátia (DRP)

1.4.2.1. DRP epidemiológiája

A diabéteszes esetek 90-95%-a tartozik a DM2 csoportba, ugyanakkor a DM1 csoportban a szemészeti szövődmények jóval gyakoribb és súlyosabbak. Aggasztó tény ugyanakkor, hogy míg korábban a gyermekkorban csupán a DM1 volt ismert, napjainkban növekszik az aránya a gyermekkori DM2 kialakulásának is, mely összefüggésbe hozható a gyermekkori elhízással (Wang és mtsai 2017).

A szem a DM-ban egyik leggyakrabban érintett szerv. A fejlett országokban, a munkaképes korosztályban a szerzett vakság egyik leggyakoribb oka diabéteszes retinopathia (DRP). A 40 év feletti diabéteszeseknél világszerte 34,6% a DRP prevalenciája. A vaksággal fenyegető DRP prevalenciája 10,2% (American Academy of Ophthalmology).

Magyarországon a DRP aránya 2000-ig növekedett, majd azt követően enyhén csökkent. Jelenleg a vakság okai között az AMD és glaukóma után a 3. helyen áll 13,6%-al (Kiss és mtsai 2013). A diabétesz és ezzel együtt a DRP prevalenciája világszerte növekszik.

A DRP számos etiológiai tényezője közül kiemelendők a hypertonia, terhesség, elhízás, hyperlipidaemia, dohányzás, anaemia, a legfontosabb azonban a diabétesz fennállásának időtartama. A DM1 ben 5 éves fennállás után az esetek 25%-ban, 10 év után 60%-ban és 15 év után 80%-ban alakul ki DRP.

A megelőzésben és kezelésben a legfontosabb általunk is befolyásolható tényező a megfelelő glikémiás kontroll, vagyis a vércukor szint optimális szinten tartása. Különösen fontos ez akkor, ha már kialakult a DRP. Fontos a vércukorszint rendszeres

kontrollja, a HbA1c (glikált haemoglobin) megfelelő szinten tartása lassítja a DRP, illetve az egyéb gyakori szövődmények, mint nefropátia és neuropátia kialakulását illetve progresszióját DM1-ben. A megfelelően beállított szénhidrát anyagcsere mellett csökken a microvaszkuláris szövődmények, így a súlyos retinopátia kialakulása. Lassíthatja a DRP progresszióját a szérum lipidek és a vérnyomás megfelelő szinten tartása is. Ugyanakkor a tartósan fennálló rossz szénhidrát anyagcsere hirtelen rendezése egyeseknél növelheti a retinopátia progresszióját. Más vizsgálatokban DM2 betegeknél a szénhidrát anyagcsere drasztikus rendezése során a kardiovaszkuláris szövődmények magas arányát figyelték meg (Klein és mtsai 2015).

1.4.2.2. Diabéteszes retinopátia (DRP) klinikai tünetei, kezelése

A tartósan fennálló, és különösen a kezeletlen diabéteszes esetekben a betegek többségénél károsodik a szem a mikrocirkuláció zavara következtében. Az esetek 90 % -ában a látásromlás oka a látóhártya károsodása. A DRP klinikai tünetei, mint a mikroaneurizma, vérzések a mikrocirkuláció károsodásának kései szakaszában jelennek meg. Ezek a vaszkuláris elváltozások kapilláris nonperfúzióhoz vezetnek, melynek következtében intraretinális vérzések, vénás eltérések, IRMA (intraretinal microvascular abnormalities), kemény exsudátumok és „puha gócok” ún cotton-wool gócok alakulnak ki. Súlyos esetben elzáródnak az arteriolák és venulák és a papillán, retinán és szivárványhártyán és csarnokzugban kóros érproliferáció alakul ki. Az érpermeabilitás fokozódása retina megvastagodást, macula oedemát okoz. A látásromlás leggyakoribb oka a makula oedema, a makula kapillaris nonperfúzió, üvegtesti vérzés, látóhártya trakció, látóhártya leválás. Proliferatív szakban a vazogén faktorok (mint pl. VEGF) hatására patológiás érburjánzás (neovaszkularizáció) indul, a retina majd az üvegtesti határhártya felszínén. Ezek az erek nem normális szerkezetűek, törékenyek, így vérzésre hajlamosítanak, gyakran törnek az üvegtest felé (Klemen 1981).

A DRP-nak stádiumai fokozódó súlyosság szerint, a klinikai tünetek alapján: 1. nincs retinopátia 2. enyhe nem-proliferatív DRP 3. közepes nem-proliferatív DRP 4. súlyos nem-proliferatív DRP 5. Proliferatív DRP (PDR) (Dobree 1964, Moravski és mtsai 2000, Wilkinson és mtsai 2003).

A betegség szemészeti diagnosztikája réslámpás vizsgálattal történik, pupillatágításban. Az így talált elváltozások jellege alapján műszeres vizsgálatokat, mint optikai koherencia tomográfia, fluorescein angiográfia, ultrahang végzünk. Fontos hangsúlyozni, hogy a DRP kezelése önmagában a szemész által nem lehetséges, ehhez elengedhetetlen a diabetológusokkal történő együttműködés. Különös figyelmet igényel a beteggondozásban a vércukor, HbA1c, szérum lipidek, testsúly kontrollja, a vércukor és vérnyomás megfelelő beállítása. A vércukorszint és vérnyomás normál értéken tartása csökkenti a retinopátia kialakulását és progresszióját is (American Academy of Ophthalmology).

A DRP kezelése a klinikai tünetek alapján történik. Miután a DRP eredetű látásromlás egyik leggyakoribb oka a makula oedema, a kezelés egyik legfontosabb területe ennek az oedemának a csökkentése, mely történhet fokális argon lézerkezeléssel, illetve a centrumot érintő esetekben intraokuláris szteroid vagy anti-VEGF kezeléssel.

Amennyiben a DRP proliferatív stádiumba jut (PDR), panretinális lézer fotokoagulációs kezelést kell végezni, melynek célja a súlyosabb stádium kialakulásának megakadályozása, a proliferatív folyamatok regressziója. Ezt a hatást feltehetően a retina oxigén felhasználásának csökkentésével illetve a roncsolt sejtek által csökkent vazoaktív anyag mennyiség felszabadulásával éri el. Ez a fajta lézer kezelés, bár hatékony, de a retina agresszív diffúz lézeres roncsolását jelenti. Mellékhatásaként perifériás látótérszűkület, a sötét adaptáció zavara, üvegtesti vérzés alakulhat ki.

Ha a kóros erekből kiinduló üvegtesti vérzés spontán nem szívódik fel, illetve vitreoretinális trakció alakul ki látóhártya leválással vagy anélkül, műtéti beavatkozás, pars plana vitrectomia elvégzése szükséges. Érthető ezért, hogy minden olyan terápiás lehetőség, mely ennél kevésbé agresszíven, a retina anatómiai és funkcionális megtartása mellett gátolja a proliferatív folyamatokat, jelentős előrelépést jelentene. Bár újabb vizsgálatok az intravitreálisan adott anti-VEGF kezelést a proliferatív retinopátiában is hatékonynak tartják, a farmakológiai kezelés elterjedése ezen a területen még várat magára. Ehhez szükséges a DRP patogenezisének molekuláris szinten történő értelmezése, mely a jövőben új farmakológiai lehetőséget nyithat.

1.4.3. Oxidatív stressz szerepe a diabétesz és DRP kialakulásában

Ahogy sok más betegség esetében, a diabétesznél is ismert az oxidatív stressz toxikus hatása. Az DM 1-ben autoimmun folyamatok eredményeképpen a gyulladásos citokin felszabadulás ROS mediátorokon keresztül aktiválja a β -sejtek apoptosist. A DM 2-ben az oxidatív stressz szerepe egyelőre kevésbé meghatározott.

Számos, egymással kapcsolódó biokémiai folyamat ismert, mely tartós hiperglikémiában aktiválódhat. Ilyenek a polyol útvonal, VEGF, IGF-1 (insulin-like growth factor-1) fokozódás, hemodinamikai változások, AGE (advanced glycation endproducts) fokozott termelődése, oxidatív stressz és a RAAS (renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer) aktiválódása, szubklinikai gyulladás és leukosztázis (Bishop 2015, Hardy és mtsai 2015, Sassa és mtsai 2016).

A polyol útvonalban két enzim játszik központi szerepet: az aldóz reduktáz (AR) által először a glükóz szorbitollá redukálódik, majd a szorbitol dehidrogenáz (SD) által ez fruktózzá alakul. A redukcióhoz szükséges NADPH felhasználás a sejt redoxpotenciálját is megváltoztatja, csökken a sejtek redukált glutation tartalma, ezáltal az oxidatív stresszel szembeni védekezés.

Ha a polyol útvonal aktivációja fokozódik, az excesszív mennyiségben termelődő szorbitol nagy része nem alakul át fruktózzá, hanem felszaporodva a sejtben, ozmotikus egyensúlyzavaron keresztül sejtkárosodáshoz vezet.

A folyamat nemcsak a diabétesz, de a DRP kialakulásában is fontos szerepet játszik. Erre utal, hogy az AR megtalálható a retinában és szemlencsében is, a szem olyan részeiben, amely a diabétesz során patológiásan érintett lehet. Az aldóz reduktáz inhibitorok (ARI) klinikai jótékony hatása diabétesz eredetű szövődményekben ismert (Obrosova és mtsai 2005).

A PKC (protein kináz C) reverzibilis foszforilációt katalizáló kináz enzim. A hiperglikémia által fokozott ROS és diacilglicerol a PKC útvonal aktiválásához is vezet, ami számos faktor, mint VEGF, TGF, NF- κ B aktivitás fokozásán keresztül okoz érpermeabilitás fokozódást, neovaszkularizációt. Mindez a DRP progressziójához vezet. A hiperglikémiától a diabéteszig vezető folyamatban az oxidatív stressznek kiemelkedő szerepe van. A szénhidrátok lebontását végző anyagcsere folyamatokban, mint a citromsav ciklusban és glikolízisben NADH és FADH₂ termelődik, melyek elektrondonorokként szolgálnak az ATP termelés során. Ez alatt az oxigént szuperoxid

gyökké redukálják. Míg normálisan ezt a fiziológiásan termelődő szabadgyököket a szervezet antioxidáns rendszere eltakarítja, a glükóz vérszintjének emelkedése esetén ez az egyensúly felborul, oxidatív stressz jön létre (Behl és mtsai 2016, Giordano és mtsai 2015, Sharma és mtsai 2015, Shin és mtsai 2014). A hiperglikémia a nitrozatív stressz által is fokozza a DRP kialakulását, ami a NOS gátló aminoguanidinnel kísérletes körülmények között gátolható (Du és mtsai 2002).

1.4.4. AGE (advanced glycation endproducts)

Az AGE heterogén vegyületcsoport, fehérje vagy lipid eredetű molekulák, melyek a redukáló cukrok, mint pl a glükóz nem-enzimatis glikációja során alakul ki. Az AGE fontos faktora a diabétesz szövödményeinek –különösen a vaszkuláris szövödmények-kialakulásának.

Az AGE-k az embrionális kortól kezdve termelődnek igen lassú ütemben. Emelkedett vércukorszint mellett, a diabéteszes betegeknél a termelődésük felgyorsul.

Kialakulása során az excessív mennyiségben jelen levő glükóz molekulák és fehérjék szabad aminosóportjaival labilis Schiff bázis alakul ki, mely hosszabb idő alatt Amadori terméké alakul. Az Amadori termékéek további átalakulásával jönnek létre az AGE-k hetek, hónapok alatt. Az AGE illetve prekursorai kovalens keresztkötést képeznek a sejtmatríx, bazálmembránok, érfalkomponensek fehérjéivel, azok funkcióját megváltoztatva. Speciális sejtfelszíni receptorokhoz (pld. RAGEs receptor for advanced glycation endproducts) kapcsolódva proinflammatorikus és prooxidáns hatással bírnak, és a retinopathia kialakulásában is szerepet játszanak.

A különböző cukrok eltérő sebességgel alakulnak át AGE-vé. Míg a glükóz glikáló hatása lassú, addig a fruktózé gyors. Ez utóbbinak intermediér terméké a fruktóz-3-foszfát, amit a diabéteszes patkányok szemlencsájéből is kimutattak, míg a normál lencsében nem található meg, tehát a diabéteszes szemszövödmények kialakulásában feltételezhető szerepe.

Az AGE szinte minden diabéteszes komplikáció pathogenezisében szerepel. Kimutatták a retina ereinek falában, szintje korrelál a vér AGE szintjével illetve a retinopátia súlyosságával. Az oxidatív stresszben az Amadori reakció során kialakuló reaktív intermedierek szintén fontos szerepet kapnak. Ilyenek a 3-deoxiglikozon (3-DG) és a

metilglioxál (MGO). Ezek ugyan nem oxidatív folyamatok során termelődnek, de végső soron oxidatív stresszt válthatnak ki. Az oxidatív stressz hatására fokozódik a RAGE aktivációja is, fokozva annak destruktív hatását (Sensi és mtsai 1991, Shapiro és mtsai 1979).

Számos AGE működését gátló szerrel érték el a betegség progresszióját csökkentő eredményt. Az AGE termelődését gátló aminoguanidin hidroklorid megakadályozta a microaneurismák kialakulását, pericitavesztést. A B6 vitamin származék piridoxamin is AGE képződés inhibitora, csökkenti a kapillárisvesztést, és basalmembrán protein kialakulást. Ezekből adódik, hogy az AGE termelődését csökkentő anyagok alkalmazásának terápiás konzekvenziája lehet. Az AGE toxikus hatásának csökkentésére további lehetőség a keresztkötések felbontása. Egyik ilyen hatással bíró, in vivo is hatékony szer az ALT-711 (Alagebrium) (Thallas-Bonke és mtsai 2004).

2. Célkitűzések

Az oxidatív stressz szerepe a diabétesz kialakulásában jól ismert. Egyre több vizsgálat tisztázza a szervezet anyagcsere és daganatos megbetegedéseiben a PARP szerepét. Ugyanakkor kevés azon munkák száma, ahol a biomarkerek szerepét a szem megbetegedéseiben vizsgálja, főként a humán szövetekben és humán eredetű szemmintákban.

A humán szemgolyóból szövettani mintavétel csak kivételes esetekben lehetséges, a mindennapi gyógyító rutinban sem jellemző. A nagyméretű malignus uveális melanoma miatt eltávolított szemből illetve az eltávolított bőr malignus melanomák anyagából készült metszeteken akartuk igazolni, hogy sok más rosszindulatú daganathoz hasonlóan összefüggést mutat-e a PARP expresszió a tumor kialakulásával, esetleg annak szövettani alcsoportjaival.

A diabéteszes retinopátiában a ROS szerepe ismert. A rossz glikémiás kontroll, ami a PDR egyik fő etiológiai tényezője ROS termelődést okoz, mely oxidatív stressz kialakításával a diabétesz szemszövődményeinek egyik legfontosabb etiológiai tényezője. A súlyos proliferatív retinopátiában szenvedő betegeknél a szénhidrát anyagcsere megfelelő beállítása mellett sokszor szükség lehet műtéti beavatkozásra is. A vitrectomia során eltávolításra kerül a szem belsejét kitöltő üvegtest, mely a diabétesz anyagcsere termékeinek rezervoárja, a benne oldott anyagok jól tükrözik a retinában zajló biokémiai folyamatokat. Vizsgálatunk célja a proliferatív diabéteszes retinopátiában lokálisan megjelenő oxidatív stressz eltérő aspektusaiban szereplő oxidatív stressz markerek elemzése.

Ennek alapján munkánk célkitűzései a következők:

Célunk volt:

1. Melanoma sejtenyészeten igazolni a PAR jelenlétét.
2. Malignus bőrmelanomák esetén megvizsgálni a PAR daganatszövetben való megjelenését, annak összefüggését a melanomák szövettani alcsoportjaival, elemezni, hogy a bőrmelanomában észlelt PAR festődés mutat-e korrelációt a

betegség súlyosságával illetve a PAR festődés nemek szerinti eloszlását megvizsgálni.

3. A malignus uveális melanoma miatt eltávolított szemből készült metszeteken igazolni, hogy az uveális melanománál sok más rosszindulatú daganathoz hasonlóan összefüggést mutat-e a PAR tartalom a tumor kialakulásával.
4. A tumormentes szemszöveteken a PAR eloszlását vizsgálni a szem hátsó szegmentumában.
5. A PDR-ban a lokálisan megjelenő oxidatív stressz többféle folyamatában szereplő oxidatív stressz markerek: a patogenezisben fontos szerepet játszó AGE, a fehérje oxidációt jelző fehérje-karbonil és az antioxidáns védekező rendszert képviselő glutation szintjének elemzése.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Bőrminták

A bőrminták a Debreceni Egyetem Bőrklinikáján kezelt bőr melanómás betegek műtétielt eltávolított anyagából származnak. A formalin-fixált, majd paraffinba ágyazott, a szövettani archivumban tárolt mintákat retrospektív dolgoztuk fel. A paraffin blokkokból rutin szövettani metszeteket készítettünk, az immunhisztokémiai vizsgálatokat ezeken végeztük.

A vizsgálatban részt vett betegek életkora 10-92 év között, a műtétek 2002-2007 között történtek. A vizsgált minták Clark I-V stádiumú (Breslow 0,06-11,00 mm, T1a-4b) melanómák és bőr melanoma metasztázisok voltak. Szövettani besorolásuk alapján 17 felszínesen terjedő melanoma, 17 lentigo melanoma, 17 noduláris melanoma, és 15 bőr metasztázist vizsgáltunk. Kontrollként a melanocitás nevust és a nevus körüli ép bőrt használtuk.

3.2. Szemminták

Az uveális melanoma mintákat a Semmelweis Egyetem Szemészeti Klinikáján történt enukleáció során diagnosztikus célra elkészített formalin-fixált, paraffinba ágyazott anyagból származnak, az egyetem etikai szabályzatának figyelembevételével. A szövettani archivumban tárolt beágyazott mintákat retrospektív dolgoztuk fel. A paraffin blokkokból rutin szövettani metszeteket készítettünk, az immunhisztokémiai vizsgálatokat ezeken végeztük.

A műtétek 2005 és 2006 között történtek, a betegek életkora 39-81 év volt. 12 db paraffinba ágyazott blokkból készítettünk hagyományos technikával metszeteket. Szövettani besorolásuk alapján 5 orsó, 3 epitheloid és 4 kevert sejtes uveális melanomát vizsgáltunk.

3.3. PAR kimutatás hisztokémiai módszerekkel

A vizsgálatokban használt anti-PAR antitest (10H klón) az Alexis Biochemicalstól, (Lausanne, Svájc)-tól származik. Az immunfestési folyamathoz a Vector Elite ABC kitet (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) használtuk. Az anyagok a Sigma-Aldrich cég termékei voltak.

A PAR kimutatása, lokalizációja immunhisztokémiai módszerekkel történt. Deparaffinálás után az 5 µm-es metszeteket H₂O₂-val [3% (v/v) metanolban] kezeltük 20 percig az endogén peroxidáz aktivitás gátlása céljából. Majd 5 perc PBS-ben történő mosás után 5 percig kuktában 100°C-on melegítettük a metszeteket nátrium-citrát pufferben (0,01 M, pH 6,0) antigén feltárás céljából, majd a metszeteket desztillált vízben öblítettük, és 5 percig PBS-ben mostuk. Ezután a nem-specifikus reakciók kiküszöbölése céljából 1% (w/v) marha szérum albumin és 1 % (v/v) ló szérum keverékében inkubáltuk szobahőmérsékleten 20 percig. Ezután egy éjszakán keresztül blokkoló oldatban (1% BSA, ló serum) oldott anti-PAR monoklonáris antitesttel inkubáltuk 4°C-on, majd 3x10 perces PBS-el történő mosás után újabb inkubáció következett biotinált másodlagos egér IgG ellenes ló antitesttel (ezt a Vector kit tartalmazta és a blokkoló oldatban 1:600 hígításban alkalmaztuk) szobahőmérsékleten 45 percig. Ismét 3x10 perc PBS mosás után a metszeteket 2%-os avidin–biotin–peroxidáz komplex (ABC) reagenssel kezeltük 30 percig. Ismét 3x10 perc PBS mosás után Ni-DAB szubsztráttal (1,6 mM 3,3'-diaminobenzidin tetraklorid, 140 mM NaCl, 90 mM NiSO₄, 100 mM Na-acetát, 3 mM H₂O₂, pH 6,6) reagáltattuk a metszeteket 4 percig. Majd 0,1M-os, 7,2 pH-s TBS -ben való öblítés után 3 perces inkubálás következett 0,5%-os kobalt kloridban (0,1M-os, 7,2 pH-s TBS -ben oldva) színelőhívás céljából. Desztillált vizes öblítés után Chromotrop 2R (Chroma, Stuttgart, Németország) oldattal (500 mg/l Chromotrop 2R, 0,005% (v/v) ecetsav) háttérfestést végeztünk. Minden festési ciklusban volt egy negatív immunhisztokémia kontroll (izotípus kontroll antitest). A kezdeti vizsgálatokban a melanin tartalmú sejtek feltételezett zavaró hatása miatt a melanint eltávolítottuk a metszetekből, de úgy tűnt, a melanin nem interferál a PAR immunhisztokémiai kimutatásával, ezért ezt a lépést a végső procedúrából kihagytuk.

3.4. A PAR festődés vizsgálata humán melanoma sejtvonalon

A PAR festődés specificitásának vizsgálatához WM35 humán melanoma sejtvonalat használtunk. A sejteket az ATCC-től (Manassas, VA, USA) szereztük be és MCDB 153 médiumban (Sigma-Aldrich) tenyésztettük, melyet 10% FCS-sel, 20% Leibovitz médiummal (Life Technologies), 5 µl/ml marhahinzulinnal, 1,68mM kalcium kloriddal, penicillinnel (50 U/ml) és streptomycinnel (50 µg/ml) egészítettünk ki. A sejteket a

tenyésztőmédiumban kezeltük H_2O_2 –al 5 percig, 400 μM -os koncentrációban. A sejtek egy részét 30 percig 10 μM -os PJ34 PARP inhibitorral is előkezeltük. A sejteken a PAR immunfestést a 3.3. fejezetben leírt módon végeztük a deparaffinálási, antigénfeltárási lépések elhagyásával, metanol (100%, $-20^\circ C$, 5 perc) és paraformaldehid (4%-os oldat PBS-ben, pH 7,4, 10 perc szobahőn) fixálást követően.

3.5. A vizsgálatba bevont diabéteszes betegpopuláció

A vizsgálathoz proliferatív DRP miatt műtétre kerülő diabéteszes betegek üvegtesti mintáit használtuk fel. Az üvegtesti mintákat vitrectomia során nyertük: a műtét elején higítatlan mintát vettünk eppendorf csövekbe, ezeket $-80^\circ C$ -on tároltuk feldolgozásig. Megvizsgáltuk 10 diabéteszes beteg üvegtesti mintáját (6 férfi, 4 nő) átlagéletkor 54 év (34-69 év) és a kontroll csoport mintáit (8 beteg, 2 férfi, 6 nő), akiknél epiretinális membrán miatt történt vitrectomia. A kontroll betegek átlagéletkora 72 év volt (67-80 év). A diabétesz csoportban 7 beteg volt DM2 és 3 beteg volt DM1, akik egy kivétellel inzulin kezelést kaptak.

A betegség átlagosan 17,7 éve állt fenn (2-34 év), a műtét a PDR komplikációi (vérzés, látóhártya leválás, proliferációs kötegek) miatt történt. Miután a kontroll csoport átlagéletkora eltért a diabéteszes csoporttól, fontos hangsúlyozni, a beteg életkorának nincs hatása a PDR klinikai képére (Kumagai és mtsai 2007). Az is ismert, hogy a totális protein karbonil szint nem korrelál a korrall és a DR szemészeti tünetei függetlenek attól, hogy DM1 vagy DM2-ről van-e szó (Varma és mtsai 2004).

3.6. Advanced Glycation End Products (AGE) meghatározás

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

3.7. Fehérje karboniláció meghatározás

A ROS és RNS molekulák a fehérjék aminosav oldalláncait karbonillá (aldehid vagy keton) tudják oxidálni. A fehérje karbonil meghatározáshoz minden mintát desztillált

vízzel hígítottunk a 20 µg/200 µl koncentrációig. Ehhez 50 µl 80% os triklórecetsavat (TCA) adtunk, ezt centrifugáltuk, majd jégen inkubáltuk 5 percig.

Ezután 13000g-n 2 percig történő centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk, majd az üledéket újraülepítettük 500 µl jéghideg acetonban. Ezt -20°C –on inkubáltuk 5 percig, majd ismét centrifugáltuk 13000g-n 2 percig. Az aceton eltávolítása után az üledéket 20 µl desztillált vízben oldottuk, majd a fehérje karbonil kimutatásához az OxyBlot Protein Oxidation Kitet (Merck Millipore, Budapest, Magyarország) használtuk a gyári instrukciók alapján. A derivatizáció befejezése után, a kinyert dinitrofenol (DNP) terméket spektrofotometriával határoztuk meg 405 nm-en.

3.8. Glutation meghatározás

A mintákat 10 percig jéghideg 10%-os TCA oldatban precipitáltuk. Majd 5000 g, 4 °C-on történő centrifugálás után a felülúszót használtuk további vizsgálatokhoz.

A glutation esszét (GSH esszé) 96 lyukú lemezen végeztük. A mintához nátrium-foszfát puffert (1 M) és oftálaldehidet (0,5%) adtunk, és 30 perces szobahőmérsékleten történő inkubáció után 390/ 460 nm-en fluorescenciát mértünk. A felülúszót N-etilmaleimiddel keverve használtunk vakként minden mintához. A GSH-val standard görbét készítettünk. A fehérje koncentrációt BCA kolorimetriás módszerrel határoztuk meg.

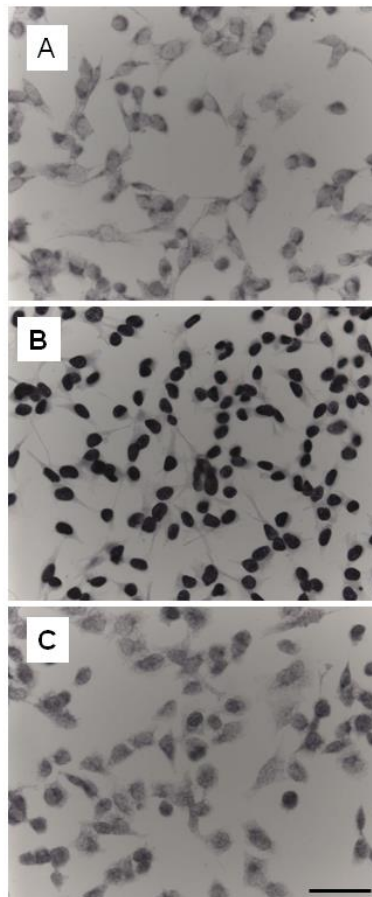
3.9. Statisztikai módszerek

A bőr és uvea melanoma metszeteken a magfestődést szemikvantitatív módszerrel mértük egy szubjektív skálán két egymástól független gyakorlott vizsgáló által. A skála pontjai: 0 (negatív), 1 (alacsony), 2 (közepes), 3 (erős), 4 (nagyon erős). Az immunfestett lemezeket a H&E festett párjukkal vetettük össze a melanocita eredetű festődés felmérése céljából. A két független vizsgáló által értékelt festődési értéket átlagoltuk, majd korreláltattuk a Breslow index-el, Clark stadiummal és AJCC score-al a Graphpad és SPSS17 softverek segítségével. A korrelációt Spearman féle korrelációs koefficienssel vizsgáltuk, a szignifikanciát $p < 0,05$ határoztuk meg. A diabéteszes és nem diabéteszes minták eredményeit Statistical11,0 szoftver segítségével végeztük. A számításokhoz a Mann-Whitney U Tesztet használtuk. A különbséget $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. Melanoma sejtek PAR festődése

Humán melanoma sejtenyészeten 10H (PAR ellenes) antitesttel demonstráltuk a PAR jelenlétét, a PAR festés specificitását. A H_2O_2 -al kezelt sejteken a H_2O_2 által provokált DNS sérülés miatt a következményes PAR termelésnek megfelelően kifejezett festődést találtunk (3 B), szemben a PARP inhibitor PJ34 előkezelt sejtekkel, ahol már csak minimálisan észleltünk festődést (3 C). A festődést a teljesen kezeletlen kontroll sejtvonalhoz (3 A) viszonyítva értékeltük.



3. ábra. PAR festődés melanoma sejtenyészeten

A 10H antitesttel történő specifikus PAR festés demonstrálása. Kezeletlen kontroll (A), és H_2O_2 -vel kezelt (5 perc, 400 μM) melanoma sejteket anti-PAR specifikus 10H antitesttel megfestve (B). A H_2O_2 -vel kezelt sejtcsoportban PARP inhibitor PJ34 (30

min, 10 μ M) előkezelés után nem volt PARP festődés a melanoma sejteken (C). Skála: 30 μ m

4.2. PAR képződés bőrmelanomában

A bőrmelanomáknál a PAR magi festődését figyeltük meg a tumorsejtekben.

Bár a festődés intenzitása meglehetősen eltérő volt (1. Táblázat és 4. ábra A, B, C), a festődés intenzíven korrelált a Breslow indexel, Clark stadiumbeosztással és az AJCC score-ral. (5. ábra).

A PAR festődés és Breslow index, Clark stádium és AJCC score közötti korreláció vizsgálatára a Spearman koefficienszt használtuk, ami rendre $r=0,4125$ ($p=0,0025$), $r=0,3257$ ($p=0,0197$) és $r=0,3657$ ($p=0,0083$) volt.

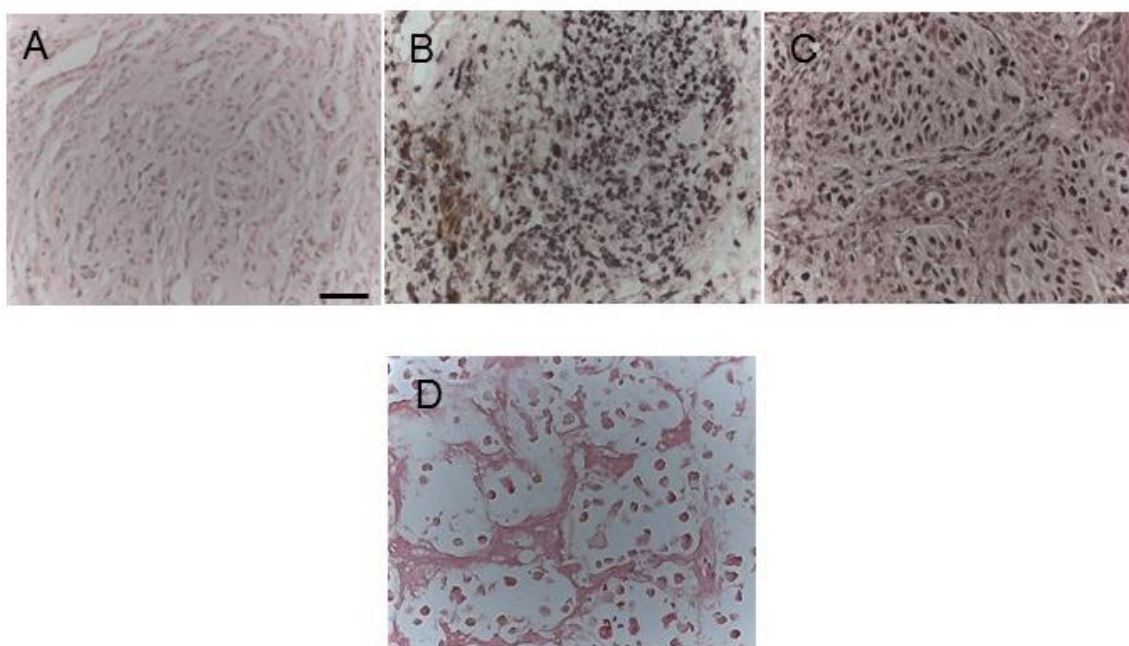
Érdekes megfigyelés, hogy ez a korreláció nőbetegeknél sokkal kifejezettebb volt. A Spearman korrelációs koefficiens és szignifikanciája nőbetegek esetében a fentiekhez hasonló sorrendben: $r=0,6678$ ($p=0,0004$), $r=0,5584$ ($p=0,0046$), $r=0,5486$ ($p=0,0055$), míg a férfi betegek esetében az értékek $r=0,3227$ ($p=0,1006$), $r=0,2283$ ($p=0,2520$) és $r=0,3575$ ($p=0,067$).

Életkor	Nem	Breslow	Clark	AJCC	Szövettan	PAR	Életkor	Nem	Breslow	Clark	AJCC	Szövettan	PAR
62	M	0,45	3	1	SSM	1	44	M	2,5	5	1,5	NM	1,5
33	M	0,24	3	1	SSM	1	53	M	4,5	4	2	NM	2
69	M	1,12	3	1	SSM	1,5	39	F	2	3	2	NM	2,5
44	F	0,48	3	4	SSM	1	68	F	6,5	4	4	NM	3
44	F	6	3	2	SSM	3	65	F	5,5	5	4	NM	3
38	F	0,12	2	1	SSM	2	42	F	2	4	2	NM	3
73	F	1,75	4	2	SSM	2	51	F	3	2,5	3	NM	2
63	F	1,1	3	2	SSM	3	51	F	2,5	4	3	NM	2
40	F	7	4	4	SSM	3	64	F	2,45	3	3	NM	3
69	F	2	4	2	SSM	2	75	F	11	5	4	NM	4
58	M	0,61	3	1	SSM	1	35	F	8,5	5	4	NM	2,5
44	M	0,88	3	1	SSM	2	55	M	0,65	3	1	NM	1,5
63	M	0,25	2	1	SSM	2	69	M	1,61	4	2	NM	3,5
51	M	0,65	3	1	SSM	3	40	M	4	4	3	NM	3
38	M	0,55	3	1	SSM	3	66	M	3,8	4	3	NM	4
50	M	0,31	2	1	SSM	1	56	M	1	3	1	NM	4
45	M	1,12	3	2	SSM	3,5	44	M	2,25	4	3	NM	4
67	M	0,12	2	1	LM	1	83	M				MET	4
71	M	0,06	2	1	LM	2	66	M				MET	3
79	F	0,42	3	1	LM	1	10	M				MET	2,5
66	F	0,2	1,5	1	LM	2	83	M				MET	3
81	F	0,07	2	1	LM	2	92	F				MET	3
80	F	0,18	2	1	LM	2	45	F				MET	2
85	F	0,3	2	1	LM	2,5	46	F				MET	2
73	F	0,22	3	1	LM	2	60	F				MET	4
65	F	0,28	2	1	LM	1	64	F				MET	3,5
45	F	0,2	1	1	LM	1	10	F				MET	2
69	M	0	1	1	LM	3	52	M				MET	3
82	M	0	1	1	LM	3	62	M				MET	4
70	M	0,85	3	1	LM	4	68	M				MET	3
77	M	1,4	3	2	LM	2	77	M				MET	3,5
75	M	0,3	2	1	LM	2	51	M				MET	2
71	M	0,43	2	1	LM	3							
68	M	0,56	3	1	LM	4							

M:férfi, F: nő

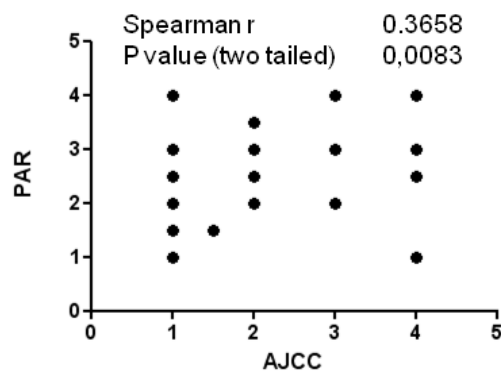
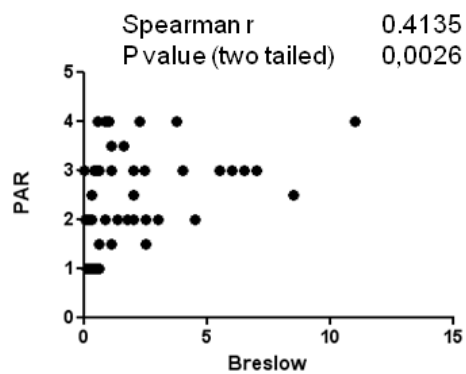
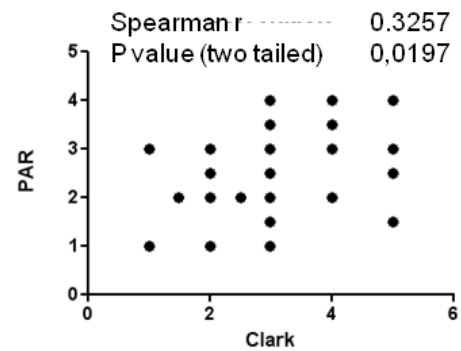
1. táblázat. PAR expresszió bőrmelanomás betegeknél

A bőrmelanomás eseteket a különböző szövettani osztályoknak megfelelően csoportosítottuk: (SSM: felszínesen terjedő melanoma, LM: lentigo maligna, NM: noduláris melanoma, MET: metasztázis). Életkor, nem, Clark stádium, Breslow index, AJCC score és a PAR festődés intenzitása került feltüntetésre.



4. ábra. PAR festődés a bőr melanoma mintákban

Az A, B, C paneleken reprezentatív PAR festődés látható SSM, lentigo melanoma, noduláris melanoma metszeteken. D: A negatív (izotípus) kontroll festődés (nodulási melanoma mintán készült. A mérővonal skála 40 μ m (A-D).

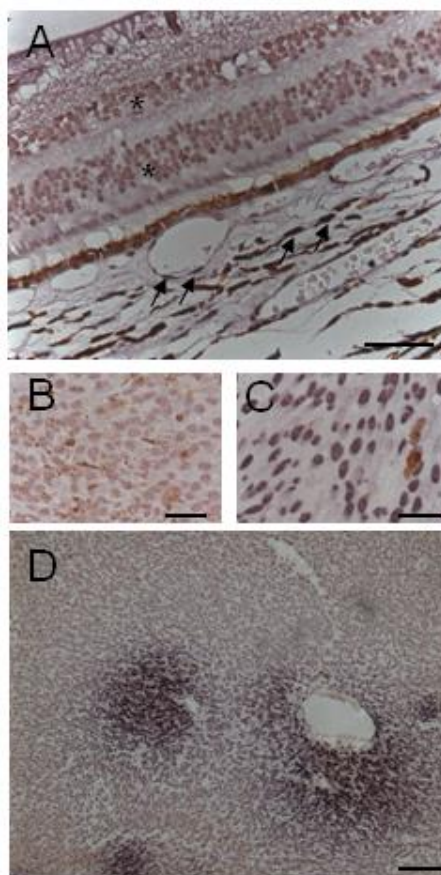


5. ábra. A PAR festődés statisztikai analízise bőr melanomákban.

A PAR festődés mértéke korrelált a Clark, Breslow és AJCC besorolás értékeivel. A korreláció számításához Spearman korrelációs koefficienst használtunk, mellyel statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk (p érték az ábrán).

4.3. PAR expresszió uveális melanómában

A szem tumormentes részein PAR magfestődést észleltünk a retina nukleáris rétegeiben (6. ábra) és az érhártya ereinek falában (6 A ábra). A daganatos szöveten belüli PAR festődés változó volt (6 B és 6 C ábra). Több esetben is megfigyelhető volt az intenzív erek körüli festődés a tumorszövetben (6 D ábra). Bár az egyes tumor típusok között nyilvánvalóan eltérő PAR festődést észleltünk, az esetek alacsony száma miatt egyértelmű korrelációt nem tudtunk megfigyelni a különböző szövettani típusok és a PAR immunpozitivitás között (2. táblázat).



6. ábra: A retina és uveális melanoma PAR festődése

*A PAR kimutatható volt a retina nukleális rétegeiben (A *), és kifejezett immunpozitivitás volt észlelhető a chorioidea erei körül (A, nyíl). Az uveális melanoma területén a PAR festődés intenzitása változó volt (B, C), de a perivascularis területek általában kifejezettebben festődtek, mint az egyéb tumorterületek. (D). Skála: A: 100 μ m, B, C: 15 μ m, D: 200 μ m*

Kor (év)	Szövettani forma	Extraocularis terjedés	PAR festődés intenzitása (1-4)
64	orsósejtes	nincs	1
81	orsósejtes	sclera infiltráció	3
39	orsósejtes	nincs	3
76	orsósejtes	nincs	4
46	orsósejtes	nincs	4
55	epitheloid sejtes	sclera infiltráció	2
71	epitheloid sejtes	opticus infiltráció	2
56	epitheloid sejtes	nincs	3
54	kevert sejtes	nincs	2
55	kevert sejtes	nincs	2
46	kevert sejtes	vortex véna infiltráció	3
53	kevert sejtes	sclera infiltráció	3

2. táblázat. PAR expresszió uveális melanómában

Az uveális melanomás betegeket szövettani típus (2. oszlop) illetve az alapján rendszereztük, hogy a daganat áttörte-e a szemgolyó falát (3. oszlop). A PAR festődés aktivitását 1-4 skálán jelöltük.

4.4. Diabétesz indukálta oxidatív stresszmarkerek vizsgálata az üvegtestben

a, Üvegtesti glikációs termékek

A diabéteszes betegek glikémiás kontrollja, vagyis a vércukorszint megfelelő beállítottsága visszatükröződik a vér (és szövetek) AGE szintjében. Az AGE-k a redukáló cukrok, mint a glükóz, és fehérjék (vagy lipidek) amino csoportjai között nem enzimatis reakcióban kialakuló stabil végtermékek. Az ebben a reakcióban keletkező Schiff bázis később kémiai átrendeződve stabil Amadori terméké alakulhat. A glikált fehérjék-mint pl. a glikált hemoglobin A1c- eltrjedten használt a mindennapi klinikai praxisban. Információt ad az elmúlt 6-8 hét szérumban glükóz szintjéről (Shapiro és mtsai 1979).

Kíváncsiak voltunk, vajon a diabéteszes betegek üvegtestjében megfigyelhető-e a fokozott glikáció. Vizsgálataink során a kontroll csoporttal összevetve emelkedett AGE szintet találtunk a DRP betegek üvegtestjében: 812,10 vs 491,69 ng/mg protein ($p=0,058$) (7 A ábra). Az eredmények arra utaltak, hogy az üvegtesti cukorszint, hasonlóan változik, mint a szérumban vagy más szövetben.

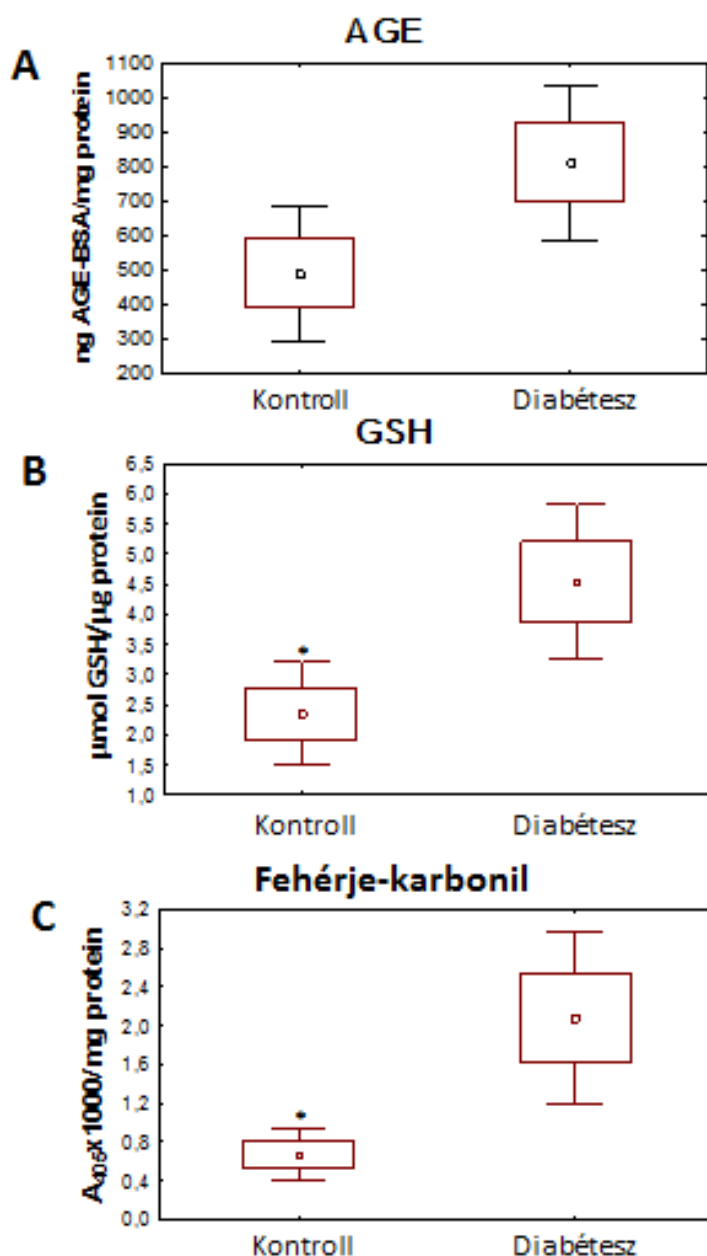
b, Oxidatív stressz az üvegtestben

Az oxidatív stressz a ROS és RNS keletkezése és eliminációja közötti egyensúly felborulásakor alakul ki. Ha a ROS/RNS eliminációja csökken az antioxidáns kapacitás elégtelen működése miatt, fehérje oxidáció és nitrálás, lipid és DNS károsodások jönnek létre (Coleman és mtsai 1989, Flynn és mtsai 1983, McCay és mtsai 1981). A számos ROS és RNS molekula által triggerelt oxidatív fehérjekárosodást jelzik az aminosav oldalláncokon (proline, lizin, arginin és treonin) megjelenő karbonil csoportok. A fehérje-karbonil számos oxidatív stresszállapot vizsgálatának fontos biomarkere, és több betegségben, így a diabéteszben is sejtdiszfunkciót okoz (Dalle-Donne és mtsai 2003, Frohnert és Bernlohr 2013, Teodoro és mtsai 2013, Turkcu et al 2016). Vizsgálatunkban meghatároztuk a DRP betegek üvegtesti fehérje-karbonil szintjét. A DRP betegek üvegtestjében szignifikánsan emelkedett szintet találtunk (2,08 vs 0,67 A₄₀₅/100 µg protein; $p=0,017$) a kontroll csoporthoz viszonyítva (7 B ábra).

Az eredmény rámutat, hogy az oxidatív stressz a diabéteszes folyamatokban szerepet játszik és a ROS/RNS molekulák a szem fehérjéivel reakcióba lépnek.

c, Antioxidáns kapacitás az üvegtestben

A ROS/RNS termelődése mellett az antioxidáns repertoár állapota és összetétele is kulcsszerepet játszik a szerv illetve szövet redox státuszában. Ezért elemeztük a DRP betegek üvegtestjének antioxidáns háztartását. Meghatároztuk az egyik legfontosabb endogén antioxidáns, a glutation (GSH) szintjét. A redukált glutation szintet is szignifikánsan magasabbnak találtuk a kontroll csoporthoz képest. (4,53 vs 2,34 $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ protein; $p=0,019$). ($p<0,05$) (7 C ábra).



7. ábra. Diabéteszes és kontroll betegektől gyűjtött üvegtesti minták.

AGE (advanced glycation endproducts (AGE) (A), redukált glutation (GSH) tartalom (B) és fehérje karboniláció (C) meghatározása. A csillagok a csoportok közötti szignifikáns különbséget jelölik (* $p < 0.05$, Mann-Whitney U-Teszt).

5. Megbeszélés

Az oxidatív stressz a legtöbb betegség pathogenezisében tetten érhető, és a nyomában aktiválódó DNS törést érzékelő és javító rendszer elemei, mint például a PARP-1 szintén sok kórfolyamathoz járul hozzá. A disszertáció alapját képező munkákban egyrészt a melanomák PAR státuszát és ennek a klinikai-szövettani stádiumbeosztással megfigyelhető összefüggéseit vizsgáltuk, másrészt a diabéteszes retinopátia folyamatában kerestük a redox diszreguláció üvegtestben jelen lévő jeleit.

5.1. PAR szerepe melanomákban

Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a poli(ADP-ribóz) mind a bőrmelanomákban, mind pedig az uveális melanomában képződik. Korábban a PARP-1 expresszióját mutatták ki humán melanomában és korrelációt állapítottak meg az expresszió intenzitása és a tumor klinikai stádiuma között (Staibano és mtsai 2005). Ugyanakkor a sejtek PAR tartalma jobban tükrözi a PAR metabolizmusát, mint a PARP-1 expresszió. Ezért eredményeink, melyek szerint a PAR tartalom korrelál a tumor Breslow indexével, Clark stádiumával és az AJCC score-al, terápiás jelentőséggel bírhat azoknál a betegeknél, ahol a kemoterápia mellett PARP gátló kezelés is szóba jön.

A kérdés az, hogy mi lehet az oka a melanoma sejtek PAR felhalmozódásának. A melanoma sejteknek osztódási rátája magasabb a környező normál sejteknél. Korábban Bakondi és mtsai kimutatták, hogy a mitotikus sejtek fokozott PARP aktivitással bírnak (Bakondi és mtsai 2002). Ez az eredmény segít megmagyarázni a melanoma sejtek PAR szintézisét is. Ugyanakkor a bőrmelanoma mintákban a melanoma sejtekben egyenletes PAR festődését találtuk, és miután nyilván nem egyszerre volt az összes sejt mitotikus fázisban, azt gondoljuk, hogy a PAR szintézis nem annyira mitózis függő ezekben a tumorokban. Az oxidatív stressz fokozódásának szerepe ismert bőrmelanomában (Sander és mtsai 2003) és uveális melanomákban (Blasi és mtsai 1999) egyaránt. A melanomákban jellemző oxidatív stressz DNS töréseken keresztül szintén vezethet PARP aktivációhoz.

Az uveális melanoma metszetekben intenzív PAR festődés volt jellemző a tumor ereinek sejtjeiben, illetve az erek körüli tumorszövetben. Ez utalhat arra, hogy a PAR szintézis a tumor oxigenizációval függ össze. A daganat saját ereinek kialakulása,

vérrellátása fontos a tumorszövet megfelelő oxigén és tápanyagellátásához. Az angiogenezishez szükséges a fokozott VEGF és HIF-1 expresszió. Ezek transzkripciója viszont a PARP-1 kontrollja alatt áll. (Obrosova és mtsai 2004, Martin-Oliva és mtsai 2006). Megfigyeltük, hogy a PAR festődés és a klinikai stádium közötti összefüggés jóval kifejezettebb volt a nőknél. Korábban már megfigyelték, hogy a nemek szerepe számos bőrbetegségben, így bőr melanomában is etiológiai és prognosztikus tényezőként szerepel (Dao és Kazin 2007). Ezentúl a PAR-ilációban is kimutatták a nemek szerepét stroke és endotoxin sokk állatmodelljein (Hagberg és mtsai 2004, McCullough 2005, Mabley és mtsai 2005). A nemek között különbséget okozhatja az ösztrogén védőhatása és a különböző nemhez kapcsolt sejthalál programok (Mabley és mtsai 2005, Szabó és mtsai 2006, Yuan és mtsai 2009).

Mivel a melanomában észlelt fokozott PAR termelődéshez vezető útvonalak és a PAR-iláció sejthalálban betöltött szerepe a melanomákban nem teljesen tisztázottak, az eredményeink jelentősége, és az abból levonható következtetések korlátozottak és még további vizsgálatokat igényelnek. Mivel a melanoma eltérő stádiumaiban egyénenként eltérő PAR festődést találtunk a bőrmelanómás esetekben, szükséges lehet a PARP gátló kezelésre való kiválasztásban a betegek gondos szelektálása.

Melanómával kapcsolatos eredményeink terápiás vonatkozásai

A PARP-1 gyógyszeres gátlása a HRR deficienciával járó BRCA mutációval összefüggésben hozható daganatokban hatékonynak mutatkozott. A PARP 1 gátlók alkalmazása kettőslánc törések kialakulásához vezethet, így a BRCA1, 2 által eleve DNS károsodásra ítélt tumor sejtekben súlyosan károsodik a hibajavítás, ami a tumorsejtek halálához vezet, míg a normál sejtekben a HRR a DNS hibákat kijavítaná. Ez a kettős defektus eredménye a szintetikus letalitás, vagyis szinergizmus két, külön nem letális történés között. A PARP gátlók enzim működés gátló hatása mellett feltételezik, hogy a PARP molekulát csapdába ejti a DNS törésnél, egy speciális, daganatsejtek számára toxikus komplexet képezve gátolja a DNS replikációt. Valószínűleg ez a funkció felelős a különböző PARP gátlószerek eltérő klinikai hatásáért.

PARPi az onkológiában

A PARP gátlók klinikumban is hasznosítható terápiás hatékonyságát számos betegcsoportban vizsgálják (Pacher és Szabó 2007, Rajesh és mtsai 2006, Soriano és mtsai 2001). Mivel a PARP-1 gátlása a BER gyengülésével jár, a PAR metabolizmus befolyásolása a daganatok esetében is terápás lehetőséggel bírhat (Tentori és mtsai 2003, 2005, Plummer és mtsai 2008, Fong és mtsai 2009, Sisay és Edessa 2017).

A PARP gátlók napjainkban az onkológiai gyakorlat elfogadott gyógyszereivé váltak. Az elsőként engedélyezett oliparib, a recidív, platinaérzékeny, előrehaladott serous epitheliális ovarium karcinómában engedélyezett gyógyszer, mellyel jelenleg is számos klinikai tanulmány folyik, különböző daganatos betegségekben. Az oliparib, rucaparib, és niraparib PARPi megjelenése nagy reményeket kelt a BRCA mutációval illetve a homológ rekombináció zavarával járó nőgyógyászati tumorok kezelésében, de vizsgálatok folynak további PARPi szerekkel (veliparib és niraparib) is. A különböző PARPi készítmények az ovarium mellett egyéb szervek daganataiban, mint tüdő, prostata, gyermekkori glioma, astrocytoma is hatékonyan mutatkozik.

Melanomák esetén is vizsgálták a PARP illetve a PARP gátlás hatását. Rodriguez és társai szerint a PARPi csökkenti a metasztatizálási hajlamot melanomában, amit részben a vimentin expresszió csökkentésével ér el. Melanomában PARPi –ral jelenleg is folynak tanulmányok: a niraparib hatását vizsgálják BAP1 DNS károsodással járó tumorokban. A BAP1 egy ubiquitin ligáz, melynek a sejtciklusban, sejthalálban és DNS kettőtörések javításában van fontos szerepe. A BAP 1 csiravonalbeli mutációja hajlamosít veleszületett daganatok kialakulására, ezen belül is fokozza a hajlamot uveális melanoma kialakulására. A PARPi így a szintetikus letalitás mechanizmusával e tumorokban hatékony tumorgátlást okozhat. Különösen figyelemre méltó ez annak ismeretében, hogy számos, a bőrmelanomáknál már hatékonyan mutatkozó gyógyszer az uveális melanomák esetében nem mutatott kedvező hatást. Melanomás betegeknél figyelték meg, hogy ha az MMR gének mutálódtak, a PARPi adásával a temozolomide érzékenység megőrizhető volt. Egyéb tanulmányok is folynak jelenleg PARPi szerekkel melanomákban, mint rucaparib, veliparib. A PARPi tehát többféle protoonkogén defektusával vezethet szintetikus letalitáshoz, lehetővé téve a daganatok kezelését. Míg több más daganat esetén már bizonyítottan hatékony, és engedélyezett gyógyszer

formában elérhető, melanómák esetén még vizsgálat tárgyát képezi, hogy az onkológiai kezelés részét képezhetik-e a PARP gátlók.

5.2. Oxidatív stressz DRP-ban

A DRP klinikai tünetei közül a retina ereinek súlyos elfajulása az egyik legfontosabb patológiai tényező. Diabétesszerűen az erek bazálmembránja megvastagodik, permeabilitás fokozódik, angiogén faktorok szabadulnak fel. A ROS és RNS termelődése ismert a diabéteszes szövetekben, így a retinában is. A ROS-nak szerepe van a diabétesz talaján kialakuló retina érújdonképződésben és a retinopátia kialakulásának egyik fő résztvevője. Az oxidatív stressz tehát kulcsszerepet játszik nemcsak a diabétesz hanem a diabétesz szövődmények, így a DRP kialakulásában is.

A retina - felépítésének köszönhetően - nagyon érzékeny az oxidatív stressz károsító hatásaira. Ennek hátterében állhat a neurális szövet nagy lipidtartalma, de a retina fokozott oxigén anyagcseréje is szerepet játszhat.

Az oxidatív stressznek a DRP progressziójában is fontos szerepe van. Feltételezhető, hogy a vércukorszint rendezése után is progrediáló retinopátia hátterében is az oxidatív stressz áll (Kowluru és mtsai 2003). A ROS a retina endothel sejtek apoptózis általi pusztulását okozza, ezáltal olyan gyulladásos folyamatot kiváltva, amely az érpermeabilitás és érproliferáció fokozásával oedema képződéshez, érújdonképződéshez és üvegtesti vérzéshez vezet. A macula pigmentepithel sejtjeiben található karotinoidok (pl. lutein, zeaxantin) károsodott antioxidáns funkciója is hozzájárul a pigmentepithel sejtek hyperglikémia eredetű, oxidatív mechanizmusú apoptotikus destrukciójához, ezáltal a diabéteszes makulopátia kialakulásához.

Az enzimikus és nem enzimikus folyamatok részben egymás mellett, részben szinergista folyamatként vesznek részt a DRP kialakulásában. Feltételezhető, hogy a megváltozott mitokondriális funkció oxidatív stresszt okozva súlyosbíthatja az AGE termelődést illetve szövetkárosítást. Az oxidatív stressz tehát mind a diabétesz mind a DRP kialakításában számos károsító patofiziológiai út közös folyamata lehet. Ezirányú

vizsgálatainknak az ad kiemelt jelentőséget, hogy a redoxháztartás felborulását a nehezen hozzáférhető üvegtesti mintákban is sikerült igazolnunk.

Oxidatív stresszmarkerek vizsgálata diabétesz eredetű retinopátiában

A diabéteszes betegeknél optimális szénhidrát anyagcsere beállítás mellett is előfordulhat a vércukor szint olyan ingadozása, mely hatására a vér és különböző szövetek fehérje glikációja fokozódhat (Saisho 2014). Számos vizsgálat igazolta, hogy diabéteszben AGE-k keletkeznek a szemben, közreműködve a diabétesz komplikációinak kialakulásában (Ma és mtsai 2014). Ez a folyamat legkifejezettebb a retinában, ahol az antioxidáns enzimek, transzkripció faktorok, mitokondriális fehérjék működése csökkenhet a glikációjuk által (Milne és Brownstein 2013, Ola és mtsai 2012). Ez a fehérje glikációs folyamat a diabéteszes szemben oxidatív stresszhez vezet (Kandarakis és mtsai 2014). Az üvegtesti térben talált emelkedett AGE szint utalhat a szemben belüli glükóz szint emelkedésére. Miután a szisztémás keringés és üvegtest közötti metabolikus equilibrium kialakulása lassú, ezért az üvegtestben mért magas AGE szint a hiperglikémia tartós fennállására utal betegeink esetében (Moseley és mtsai 1984).

Choudhuri és mtsai az üvegtesti AGE szintet magasabbnak találták PDR betegek üvegtestjében, mint a nem proliferatív DRP betegeknél, míg a szérumban AGE szintje mindkét csoportban magasabb volt a nem diabéteszes szemekhez viszonyítva (Choudhuri és mtsai 2013). A szöveti kiegyenelítődés lassú kialakulása mellett ez jelentheti az AGE szerepét a súlyosabb, proliferatív stádiumba való átmenet kialakításában, amit vizsgálataink mellett más szerzők tapasztalatai is alátámasztanak. A közelmúltban (cikkünk megjelenése után) nem proliferatív DRP betegek üvegtesti mintájából többféle AGE-t meghatározva egyes AGE, mint pentozidin, 3-deoxyglucosone szintjét magasabbnak mérték, míg más fehérjéhez kapcsolt illetve szabad AGE-k és α -dikarbonilok szintje nem tért el lényegesen a nem diabéteszes mintáktól (Fokkens és mtsai 2017). A retinában zajló oxidatív stressz mechanizmusának ismeretében következtethetünk arra, hogy az üvegtestben zajló fehérje glikáció szintén szerepet játszhat az üvegtesti oxidatív stresszben (Puertas és mtsai 1993).

A szöveti oxidatív stressz jellemzője az oxidatív fehérje, DNS és lipid módosítás (Videla és Fernandez 1988). A fehérjeoxidáció markereként megmértük az üvegtest fehérje-karbonil tartalmát. A diabéteszes betegek emelkedett üvegtesti fehérje-karbonil szintje alátámasztja azt a feltételezést, hogy az üvegtest is része a szem diabétesz eredetű oxidatív környezetének. Az üvegtest fehérjékben, különösen albuminban és II típusú kollagénben gazdag (Sebag 2008). Így a reaktív oxigén és nitrogén származékok nagy valószínűséggel találnak fehérje célpontot. Loukovaara és mtsai a fehérje-karbonil szintet szintén magasabbnak találta PDR betegek üvegtestjében, ugyanakkor nem volt magasabb a szintén diabéteszes, de csak az enyhébb, nem PDR-ban szenvedő betegek üvegtestjében, vagyis a fehérje-karbonil szint emelkedését egy súlyosabb oxidatív hatásnak tulajdonították (Loukovaara és mtsai 2014). Más fehérjeoxidációs termékekkel szemben a fehérje-karbonil nehezen indukálódik, ugyanakkor irreverzibilis oxidatív károsodást jelez, ami alátámasztja azt a feltételezést, hogy az oxidatív stressz nem csak a diabétesz, illetve a diabétesz eredetű retinopátia kialakulásában játszik szerepet, hanem a szövődmények progresszióját, súlyosságát is meghatározhatja. Mindez okot adhat a karboniláció gátlók jövőbeli klinikai alkalmazására is.



8. ábra. Grafikus ábra: Diabétesz eredetű oxidatív stressz szerepe a diabéteszes retinopátia kialakulásában.

Olyan környezetben, ahol az oxidatív stressz aktívan jelen van, gyakran megfigyelhető az antioxidáns rendszer alkotóinak csökkenése is az állandó igénybevétel

miatt (Hegedűs és Virág 2014). Ezért azt feltételeztük, hogy a diabéteszes betegek üvegtestjében az antioxidáns kapacitás is csökkenni fog. A redukált glutation az egyik fő antioxidáns enzim. Korábban több szerző is a PDR betegek üvegtesti mintájában a teljes antioxidáns kapacitás csökkenését írta le. A különböző oxidatív pufferek vizsgálatáról az egyes enzimek külön vizsgálata árnyaltabb képet mutathat, mivel a különböző enzimek eltérő irányítás alatt állhatnak illetve a retinopátia kialakulása során is annak stádiumától függő eltérést mutathatnak. Ezekkel az eredményekkel szemben mi azt találtuk, hogy a redukált glutation szintje magasabb volt, mint a kontroll szemekben. Ezt a megnövekedett terhelésre kialakult adaptív válasznak tekinthetjük, hasonlóan, mint ahogyan azt korábban PDR betegeknél megfigyelték az extracelluláris SOD esetében (Izuta és mtsai 2009). A glutamát cisztein ligáz, a glutation szintézis kulcsenzime a Nrf2 által szabályozott antioxidáns rendszer kontrollja alatt áll. Az Nrf2 a redox homeosztázis fő (mester) regulátora (Lu 2013). A tartósan fennálló oxidatív stressz hosszútávon indukálhatja az Nrf2-mediált GSH szintézis fokozódást. Vizsgálataink alapján a redox homeosztázis jelentős átrendeződése figyelhető meg a diabéteszes betegek üvegtestjében, mely magyarázatot adhat a DRP patomechanizmusának egyes lépéseire.

5.3. A főbb tudományos eredményeink:

1. A humán melanoma sejttenyészetben 10H (PAR ellenes) antitesttel igazolható a PAR jelenléte H_2O_2 kezelést követően, mely a PARPi kezelt sejtekben nem észlelhető.
2. Elsőként írtuk le, hogy a bőrmelanomák esetén PAR magfestődés figyelhető meg, melynek intenzitása korrelál a Breslow és Clark stádiumbeosztással, valamint az AJCC score értékével. Az összefüggés nőbetegek esetén kifejezettebb.
3. Elsőként vizsgáltuk uveális melanomában a PAR eloszlást. Uveális melanomában a daganatszövetben PAR magfestődést tapasztaltunk. A szövettani típusok közötti eltérés a kapott eredmények alapján felvetődik, de az alacsony esetszám miatt egyértelműen nem igazolható.

4. Ép szemterületeken a PAR magfestődés a retina nukleáris rétegeiben és az érhártya ereinek falában kimutatható.
5. Diabéteszes retinopátiás betegek üvegtesti mintáiban emelkedett szintű AGE mutatható ki, mely a fokozott glikációra utal.
6. A diabéteszes retinopátiás betegek üvegtesti mintáiban az oxidatív stressz mértékét jellemző fehérje-karbonil szintje szignifikánsan emelkedett.
7. Elsőként írtuk le, hogy a redukált glutation szint szignifikánsan emelkedett a diabéteszes retinopátiás betegek üvegtesti mintáiban, mely az endogén antioxidáns rendszer adaptív válasza lehet a fokozott oxidatív stresszre.

6. Összefoglalás

Az oxidatív stressz szerepe számos betegségben jól ismert. Az általa okozott DNS károsodás által indukált útvonalak egyike a PARP aktivációs útvonal. A PARP fiziológus szerepéről szerzett tapasztalatok alapján lehetővé vált a PARP által szabályozott folyamatok befolyásolásának klinikai alkalmazása. A PARP gátló gyógyszerek jelenleg az onkológiai terápiás repertoár részét képezik többféle tumor esetében. Munkánk során a melanómák, azon belül is a bőr melanoma illetve a leggyakoribb primer felnőttkori malignus szemdaganat, az uveális melanoma esetén vizsgáltuk a tumorok PAR expresszióját. A sejtek PAR tartalma a PARP-1 expresszióval is jobban tükrözi a szövetek PAR metabolizmusát. A bőrmelanómák esetében a PAR tartalom egyenes összefüggését találtuk a klinikai stádium súlyosságával, ami főként a nőknél volt kifejezett. Kifejezett PAR festődést találtunk uveális melanomáknál az erek mentén, mely összefüggésben állhat a daganat vaszkuláris rendszerének progresszív képződésével. Mindezek alapján feltételezhető, hogy előrehaladott melanómák esetén a PARP gátló kezelés ezen onkológiai betegcsoportban is szerepet kaphat.

Az oxidatív stressz hatására kialakuló redox egyensúlyzavar szerepet játszik a diabétesz eredetű retinopátia kialakításában. Ennek az átrendeződésnek a biomarkerei nemcsak a vérből, hanem a szem belsejéből vett üvegtesti mintából is kimutatható, ami jelzi a lokálisan zajló oxidatív folyamatok szerepét a retinopátia kialakításában. A PDR eredetű mintában szignifikánsan emelkedett mind a fehérje oxidációra utaló protein karbonil, mind a glikálási termékek szintje. Az oxidatív károsodás mellett vizsgáltuk az antioxidáns védelmet is. Ezt az egyik antioxidáns, a glutation szintjének mérésével végeztük, s ezt vizsgálatunkban szintén emelkedettnek mértük, amit a védelmi rendszer adaptív válaszának tekintettünk. Az oxidatív stressz szerepének tisztázása a diabétesz szövödményeiben lehetőséget teremthet ezen folyamatokat megcélzó gyógyszeres kezelések kidolgozásában.

7. Summary

The role of oxidative stress is well established in many diseases. One of the pathways induced by oxidative stress causes DNA damage and activation of PARP1. Results of experimental PARP research paved the way for clinical applications of PARP inhibitors which are currently part of the oncological therapeutic repertoire for several tumors. In our study, tumor PAR expression was investigated in melanomas, including skin melanoma and in the most common primary adult malignant ocular tumor, uveal melanoma. PAR level of cells reflects the PAR metabolism of the tissues more accurately, than PARP expression. In case of skin melanomas we found direct correlation of PAR level with the severity of the clinical stage. A pronounced PAR staining was found in uveal melanoma along the vessels, which may be related to the progressive formation of the tumor's vascular system.

Redox imbalance due to oxidative stress plays a role in the development of diabetic retinopathy. Biomarkers of this imbalance can be detected not only from the blood, but also from the vitreous sample, from the inside of the eye, indicating the role of locally occurring oxidative processes in the development of retinopathy. In the PDR-derived samples, both protein carbonyl and glycated product levels were significantly increased. In addition to oxidative damage, antioxidant protection was also investigated. This was done by measuring one levels of the key antioxidant glutathione, which we found to be elevated as an adaptive response of the defense system. Clarifying the role of oxidative stress in diabetic complications can provide an opportunity to develop drugs targeted at these processes.

8. Irodalomjegyzék

1. Ahmed I (1997). Malignant melanoma: prognostic indicators. *Mayo Clin Proc.* 72(4):356-61.
2. American Academy of Ophthalmology (AAO) (2016): Preferred Practice Pattern (PPP): Diabetic Retinopathy <https://www.aao.org/preferred-practice-pattern/diabetic-retinopathy-ppp-updated-2017>
3. Amacher DE (2006). Reactive intermediates and the pathogenesis of adverse drug reactions: the toxicology perspective. *Curr Drug Metab.* 7: 219-229.
4. Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G (2004). The PARP superfamily. *Bioessays.* 26(8):882-93.
5. Bakondi E, Bai P, Szabó E, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C and Virág L (2002). Detection of Poly(ADP-ribose) Polymerase Activation in Oxidatively Stressed Cells and Tissues Using Biotinylated NAD Substrate. *J Histochem Cytochem.* 50: 91-98.
6. Bakondi E, Bai P, Szabo E, Hunyadi J, Gergely P, Szabo C, Virag L (2002). Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate. *J Histochem. Cytochem.* 50: 91-98.
7. Bakondi E, Gonczi M, Szabo E, Bai P, Pacher P, Gergely P, Kovacs L, Hunyadi J, Szabo C, Csernoch L, Virag L (2003). Role of intracellular calcium mobilization and cell-density-dependent signaling in oxidative-stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 121:88-95.
8. Bakondi E, Bai P, Erdelyi K, Szabo C, Gergely P, Virag L (2004). Cytoprotective effect of gallotannin in oxidatively stressed HaCaT keratinocytes: the role of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Dermatol.* 13: 170-178.
9. Bakos L, Wagner M, Bakos RM, Leite CS, SperhacKE CL, Dzekaniak KS, Gleisner AL (2002). Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. *Int J Dermatol.* 41: 557-562.
10. Bauer PI, Farkas G, Buday L, Mikala G, Meszaros G, Kun E, Farago A (1992) Inhibition of DNA Binding by the Phosphorylation of Poly ADP-Ribose Polymerase Protein Catalysed by Protein Kinase C. *Biochem Biophys Res Commun.* 187: 730-736.

11. Bauer PI, Farkas G, Mihalik R, Kopper L, Kun E, Farago A (1994). Phosphorylation of poly(ADP-ribose)polymerase protein in human peripheral lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. *Biochim Biophys Acta* 1223:234-9.
12. Beckman JS, Koppenol WH (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1):C1424-37.
13. Behl T, Kaur I, Kotwani A (2016). Implication of oxidative stress in progression of diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol.* 61(2):187-196.
14. Behndig A, Svensson B, Marklund SL, Karlsson K (1998). Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39: 471-475.
15. Bergeron MJ, Leclerc S, Laniel MA, Poirier GG and Guerin SL (1997). Transcriptional Regulation of the Rat Poly(ADP-Ribose) Polymerase Gene by Sp1. *Eur J Biochem.* 250: 342-353.
16. Bishop PN (2015). The role of extracellular matrix in retinal vascular development and preretinal neovascularization. *Exp Eye Res.*133: 30–36.
17. Blasi MA, Maresca V, Roccella M, Roccella F, Sansolini T, Grammatico P, Balestrazzi E, Picardo M (1999). Antioxidant pattern in uveal melanocytes and melanoma cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40: 3012-3016.
18. Bouliskas T (1990). Poly(ADP-Ribosylated) Histones in Chromatin Replication. *J Biol Chem* 265: 14638-14647.
19. Brochu G, Duchaine C, Thibeault L, Lagueux J, Shah GM, Poirier GG (1994). Mode of Action of Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. *Biochim Biophys Acta.* 1219: 342-350.
20. Burkle A (2001). Physiology and Pathophysiology of Poly(ADP-Ribosyl)ation. *Bioessays.* 23: 795-806.
21. Cals-Grierson MM, Ormerod AD (2004). Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide* 10: 179-193.
22. Chalmers AJ (2009). The potential role and application of PARP inhibitors in cancer treatment. *Br Med Bull.* 89: 23-40.

23. Chang WJ, Alvarez-Gonzalez R (2001). The Sequence-Specific DNA Binding of NF-Kappa B Is Reversibly Regulated by the Automodification Reaction of Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1. *J Biol Chem.* 276: 47664-47670.
24. Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 49: 481-493.
25. Choudhuri S, Dutta D, Chowdhury IH, Mitra B, Sen A, Mandal LK, Mukhopadhyay S, Bhattacharya B (2013). Association of hyperglycemia mediated increased advanced glycation and erythrocyte antioxidant enzyme activity in different stages of diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 100(3):376-84.
26. Cohen-Armon M, Visochek L, Rozensal D, Kalal A, Geistrikh I, Klein R, Bendetz-Nezer S, Yao Z, Seger R (2007). DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol Cell.* 25 (2): 297–308.
27. Coleman JB, Gilfor D, Farber JL (1989). Dissociation of the accumulation of single- strand breaks in DNA from the killing of cultured hepatocytes by an oxidative stress. *Mol Pharmacol.* 36: 193–200.
28. Crow JP, Ischiropoulos H (1996). Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: in vivo marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 269: 185-194.
29. Curtin NJ, Szabo C (2013). Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond. *Mol Asp Med.* 34 (6), 1217–1256.
30. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 329: 23-38.
31. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 52(4): 601-623.
32. Damjanovich J (2013). Az uvea melanomák. *Szemészet – Ophthalmologia Hungarica.* 150 (2): 71-77.
33. Dantzer F, Nasheuer HP, Vonesch JL, De Murcia G, Menissier-De MJ (1998). Functional Association of Poly(ADP-Ribose) Polymerase With DNA Polymerase Alpha-Primase Complex: a Link Between DNA Strand Break Detection and DNA Replication. *Nucleic Acids Res.* 26: 1891-1898.

34. Dantzer F, de La Rubia G, Ménissier-De Murcia J, Hostomsky Z, de Murcia G, Schreiber V (2000). Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry*. 39(25):7559-69.
35. Dao H Jr, Kazin RA (2007). Gender differences in skin: a review of the literature. *Gend. Med.* 4: 308-328.
36. Davidovic L, Vodenicharov M, Affar EB, Poirier GG (2001). Importance of Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase in the Control of Poly(ADP-Ribose) Metabolism. *Exp Cell Res*. 268: 7-13.
37. de Murcia G, Jongstra-Bilen J, Ittel M.-E, Mandel P, Delain E (1983). Poly(ADP-ribose) polymerase auto-modification and interaction with DNA: electron microscopic visualization. *EMBO J.* 2: 543-548.
38. de Murcia G, Huletsky A, Lamarre D, Gaudreau A, Pouyet J, Daune M, Poirier GG (1986). Modulation of Chromatin Superstructure Induced by Poly(ADP-Ribose) Synthesis and Degradation. *J Biol Chem* 261: 7011-7017.
39. de Murcia G, Menissier de Murcia J (1994). Poly(ADP-Ribose) Polymerase: a Molecular Nick-Sensor. *Trends Biochem Sci.*19: 172-176.
40. de Murcia G, Schreiber V, Molinete M, Saulier B, Poch O, Masson M, Niedergang C, Menissier de Murcia J (1994). Structure and Function of Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Mol Cell Biochem.* 138: 15-24.
41. de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, De Murcia G (1997). Requirement of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Recovery From DNA Damage in Mice and in Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 7303-7307.
42. De Vos M, Schreiber, V, Dantzer F (2012). The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem Pharmacol.* 84 (12): 137–146.
43. Dobree JH (1964). Proliferative diabetic retinopathy: evolution of the retinal lesions. *Br J Ophthalmol.* 48: 637–649.
44. Du Y, Smith MA, Miller CM, Kern TS (2002): Diabetes-induced oxidative stress in the retina, and correction by aminoguanidine. *J Neurochem.* 80: 771-779.

45. Durkacz BW, Omidiji O, Gray DA, Shall S (1980). (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature*. 283: 593–596.
46. Erdelyi K, Bai P, Kovacs I, Szabo E, Mocsar G, Kakuk A, Szabo C, Gergely P, Virág L (2009). Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells. *FASEB J*. 23: 3553–3563.
47. Fathers C, Drayton RM, Solovieva S, Bryant HE (2012). Inhibition of poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) specifically kills BRCA2-deficient tumor cells. *Cell Cycle*. 11: 990–997.
48. Field MG, Harbour JW (2014). Recent developments in prognostic and predictive testing in uveal melanoma. *Curr Opin Ophthalmol*. 25:234–239.
49. Finkel T, Holbrook, NJ (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408: 239-247.
50. Flynn TP, Allen DW, Johnson GJ, White JG (1983). Oxidant damage of the lipids and proteins of the erythrocyte membranes in unstable hemoglobin disease. Evidence for the role of lipid peroxidation. *J Clin Invest*. 71: 1215–1223.
51. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor MJ, Ashworth A, Carmichael J, Kaye SB, Schellens JH, de Bono JS (2009). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*. 361: 123-134.
52. Fokkens BT, Mulder DJ, Schalkwijk CG, Scheijen JL, Smit AJ, Los LI (2017). Vitreous advanced glycation endproducts and α -dicarbonyls in retinal detachment patients with type 2 diabetes mellitus and non-diabetic controls. *PLoS One*. 12(3): e0173379.
53. Frohnert BI, Bernlohr DA (2013). Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Adv Nutr*. 4: 157–163.
54. Garbe C, Buttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, Peters A, Rassner G, Stadler R, Stroebe W (1995). Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer*. 75: 2484-2491.

55. Giordano CR, Roberts R, Krentz KA, Bissig D, Talreja D, Kumar A, Terlecky SR, Berkowitz BA (2015). Catalase therapy corrects oxidative stress-induced pathophysiology in incipient diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 56: 3095–3102.
56. Guerry DT, Schuchter LM (1992). Disseminated melanoma—is there a new standard therapy? *N Engl J Med.* 327: 560-561.
57. Gutteridge JM (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 41: 1819-1828.
58. Gutteridge JM, Halliwell B (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 899: 136-147.
59. Hagberg H, Wilson MA, Matsushita H, Zhu C, Lange M, Gustavsson M, Poitras MF, Dawson TM, Dawson VL, Northington F, Johnston MV (2004). PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury. *J Neurochem.* 90: 1068- 1075.
60. Halliwell B, Gutteridge JM (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85.
61. Halliwell B, Whiteman M (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142: 231-255.
62. Hardy P, Beauchamp M, Sennlaub F, Gobeil Jr F, Tremblay L, Mwaikambo B, Lachapelle P, Chemtob S (2005). New insights into the retinal circulation: Inflammatory lipidmediators in ischemic retinopathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 72 (5): 301–325.
63. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 91: 7A-11A.
64. Hassa PO, Covic M, Hasan S, Imhof R and Hottiger MO (2001). The Enzymatic and DNA Binding Activity of PARP-1 Are Not Required for NF-Kappa B Coactivator Function. *J Biol Chem.* 276: 45588-45597.
65. Hatekayama K, Nemoto Y, Ueda Y and Hayashi O (1986). Purification and Characterization of Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. Different Modes of Action on Large and Small Poly(ADP-Ribose). *J Biol Chem.* 261: 14902-14911.

66. Hedges T, Scriven A (2008). Sun safety: what are the health messages? *J R Soc Promot Health*. 128: 164-169.
67. Hegedus C, Virag L (2014). Inputs and outputs of poly(ADP-ribosyl)ation: relevance to oxidative stress. *Redox Biol*. 2C: 978–982.
68. Heller B, Wang Z Q, Wagner EF, Radons J, Burkle A, Fehsel K, Burkart V, Kolb H (1995). Inactivation of the Poly(ADP-Ribose) Polymerase Gene Affects Oxygen Radical and Nitric Oxide Toxicity in Islet Cells. *J Biol Chem*. 270: 11176-11180.
69. Hottiger MO, Hassa PO, Luscher B, Schuler H, Koch-Nolte F (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci*. 35: 208-219.
70. Izuta H, Chikaraishi Y, Adachi T, Shimazawa M, Sugiyama T, Ikeda T, Hara H (2009). Extracellular SOD and VEGF are increased in vitreous bodies from proliferative diabetic retinopathy patients (2009). *Mol Vis*. 15: 2663–2672.
71. Jackson A, Wilkinson C, Hood K, Pill R (2000). Does experience predict knowledge and behavior with respect to cutaneous melanoma, moles, and sun exposure? Possible outcome measures. *Behav Med*. 26: 74-79.
72. Kanai Y, Tanuma S and Sugimura T (1981). Immunofluorescent Staining of Poly(ADP-Ribose) in Situ in HeLa Cell Chromosomes in the M Phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78: 2801-2804.
73. Kandarakis SA, Piperi C, Topouzis F, Papavassiliou AG (2014). Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases. *Prog Retin Eye Res*. 42:85-102.
74. Kasper B, D'Hondt V, Vereecken P, Awada A (2007). Novel treatment strategies for malignant melanoma: a new beginning? *Crit Rev Oncol Hematol*. 62: 16-22.
75. Katagiri M, Shoji J, Inada N, Kato S, Kitano S, Uchigata Y.(2017). Evaluation of vitreous levels of advanced glycation end products and angiogenic factors as biomarkers for severity of diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol*. March 15.
76. Kawaichi M, Ueda K and Hayaishi O (1981). Multiple Autopoly(ADP-Ribosyl)Aion of Rat Liver Poly(ADP-Ribose) Synthetase. Mode of Modification and Properties of Automodified Synthetase. *J Biol Chem*. 256: 9483-9489.

77. Kehrér JP (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 149: 43-50.
78. Kiss H, Németh J (2013). A vakság okai Magyarországon *Szemészet – Ophthalmologia Hungarica*. 150 (3): 103-110.
79. Klein BE, Myers CE, Howard KP , Klein R (2015). Serum Lipids and Proliferative Diabetic Retinopathy and Macular Edema in Persons With Long-term Type 1 Diabetes Mellitus: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *JAMA Ophthalmol*. 133(5):503-10.
80. Klemen UM (1981). Electronmicroscopic and chemical investigations of the pathological changes of the vitreous body. *Doc Ophthalmol*. 51: 113–143.
81. Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ (2005). Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Curr Med Chem*. 12: 2601-2623.
82. Kovacs K, Erdelyi K, Hegedus C, Lakatos P, Regdon Z, Bai P, Hasko G, Szabo E, Virag L (2012). Poly(ADP-ribosyl)ation is a survival mechanism in cigarette smoke-induced and hydrogen peroxide-mediated cell death. *Free Radic Biol Med*. 53:1680-1688.
83. Kowluru RA (2003). Effect of reinstitution of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrative stress in diabetic rats. *Diabetes*. 52: 818–823.
84. Kraus WL, Hottiger WL (2013). PARP-1 and gene regulation: Progress and puzzles. *Mol Asp Med*. 34 (6): 1109–1123.
85. Kumagai A, Nakayashiki N, Aoki Y (2007). Analysis of age-related carbonylation of human vitreous humor proteins as a tool for forensic diagnosis. *Leg Med*. 9: 175–180.
86. Lawson DD, Moore DH 2nd, Schneider JS, Sagebiel RW (1994). Nevus counting as a risk factor for melanoma: comparison of self-count with count by physician. *J Am Acad Dermatol*. 31: 438- 444.
87. Leduc Y, Lawrence JJ, De Murcia G and Poirier GG (1988). Cell Cycle Regulation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in FR3T3 Cells. *Biochim Biophys Acta*. 968: 275-282.

88. Loukovaara S, Koivunen P, Inglés M, Escobar J, Vento M, Andersson S (2014). Elevated protein carbonyl and HIF-1 α levels in eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* 92(4): 323-327.
89. Lindahl T, Satoh M S, Poirier GG and Klungland A (1995). Post-Translational Modification of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Induced by DNA Strand Breaks. *Trends Biochem Sci.* 20: 405-411.
90. Liochev SI, Fridovich I (2002). The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep.* 7: 55-57; author reply 59-60.
91. Lipinski B. (2011). Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 809696.
92. Lonskaya I, Potaman VN, Shlyakhtenko LS, Oussatcheva EA, Lyubchenko YL, Soldatenkov VA (2005). Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *J Biol Chem.* 280 (17): 17076–17083.
93. Lu SC (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1830: 3143–3153.
94. Ma K, Xu Y, Wang C, Li N, Li K, Zhang Y, Li X, Yang Q, Zhang H, Zhu X, Bai H, Ben J, Ding Q, Li K, Jiang Q, Xu Y, Chen Q (2014). A cross talk between class A scavenger receptor and receptor for advanced glycation end-products contributes to diabetic retinopathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 307: E1153–E1165.
95. Mabley JG, Horváth EM, Murthy KG, Zsengellér Z, Vaslin A, Benko R, Kollai M, Szabó C (2005). Gender differences in the endotoxin-induced inflammatory and vascular responses: potential role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 315: 812-820.
96. Marczin N, Bundy RE, Hoare GS, Yacoub M (2003). Redox regulation following cardiac ischemia and reperfusion. *Coron Artery Dis.* 14: 123-133.
97. Marghoob AA, Slade J, Kopf AW, Salopek TG, Rigel DS, Bart RS (1996). Risk of developing multiple primary cutaneous melanomas in patients with the classic atypical-mole syndrome: a case-control study. *Br J Dermatol.* 135: 704-711.
98. Martin-Oliva D, Aguilar-Quesada R, O'Valle F, Munoz-Gamez JA, Martinez-Romero R, Garcia Del Moral R, Ruiz de Almodovar JM, Villuendas R, Piris MA, Oliver FJ (2006). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase modulates

- tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 66: 5744-5756.
99. McCay PB, Gibson DD, Hornbrook KR (1981). Glutathione-dependent inhibition of lipid peroxidation by a soluble, heat-labile factor not glutathione peroxidase. *Fed. Proc.* 40: 199–205.
 100. McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244: 6049-6055.
 101. McCullough LD, Zeng Z, Blizzard KK, Debchoudhury I, Hurn PD (2005). Ischemic nitric oxide and poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cerebral ischemia: male toxicity, female protection. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25: 502-512.
 102. Milne R, Brownstein S (2013). Advanced glycation endproducts and diabetic retinopathy. *Amino Acids.* 44: 1397–1407.
 103. Miwa M, Sugimura T (1971). Splitting of the Ribose-Ribose Linkage of Poly(Adenosine Diphosphate Ribose) by a Calf Thymus Extract. *J Biol Chem* .246: 6362-6364.
 104. Miwa M, Tanaka M, Matsushima T, Sugimura T (1974). Purification and Properties of Glycohydrolase From Calf Thymus Splitting Ribose-Ribose Linkages of Poly(Adenosine Diphosphate Ribose). *J Biol Chem* 249: 3475-3482.
 105. Molloy-Simard V, St-Laurent JF, Vigneault F, Gaudreault M, Dargis N, Guérin MC, Leclerc S, Morcos M, Black D, Molgat Y, Bergeron D, de Launoit Y, Boudreau F, Desnoyers S, Guérin S (2012). Altered Expression of the Poly(ADP-Ribosyl)ation Enzymes in Uveal Melanoma and Regulation of PARG Gene Expression by the Transcription Factor ERM. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53(10):6219-31.
 106. Moseley H, Foulds WS, Allan D, Kyle PM (1984). Routes of clearance of radioactive water from the rabbit vitreous. *Br J Ophthalmol.* 68:145–151.
 107. Moser JC, Pulido JS, Dronca RS, McWilliams RR, Markovic SN, Mansfield AS (2015). The Mayo Clinic experience with the use of kinase inhibitors, ipilimumab, bevacizumab, and local therapies in the treatment of metastatic uveal melanoma *Melanoma Res.* 25:59–63.

108. Moravski CJ, Kelly DJ, Cooper ME, Gilbert RE, Bertram JF, Shahinfar S, Skinner SL, Wilkinson-Berka JL (2000). Retinal neovascularization is prevented by blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 36:1099–1104.
109. Nagele A (1995). Poly(ADP-Ribosyl)ation As a Fail-Safe, Transcription-Independent, Suicide Mechanism in Acutely DNA-Damaged Cells: a Hypothesis. *Radiat Environ Biophys*. 34: 251-254.
110. NEI (National Eye Institute) (2015). Facts about diabetic eye disease.
111. Obrosova IG, Pacher P, Szabó C, Zsengeller Z, Hirooka H, Stevens MJ, Yorek MA (2005): Aldose reductase inhibition counteracts oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in tissue sites for diabetes complications. *Diabetes*. 54: 234-242.
112. Obrosova IG, Minchenko AG, Frank RN, Seigel GM, Zsengeller Z, Pacher P, Stevens MJ, Szabo C (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors counteract diabetes- and hypoxia-induced retinal vascular endothelial growth factor overexpression. *Int J Mol Med*. 14: 55-64.
113. Oka J, Ueda K, Hayaishi O, Komura H and Nakanishi K (1984) ADP-Ribosyl Protein Lyase. Purification, Properties and Identification of the Product. *J Biol Chem* 259: 986-995.
114. Ola MS, Nawaz MI, Siddiquei MM, Al-Amro S, AbuEl-Asrar AM (2012). Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications*. 26: 56–64.
115. Oliva M, Rullan AJ, Piulats JM (2016). Uveal melanoma as a target for immune-therapy. *Ann Transl Med*. 4(9):172.
116. Oliver FJ, Menissier-De MJ, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de La Rubia G, Stoclet JC, De Murcia G (1999). Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J*. 18:4446-4454.
117. Pacher P, Szabó Cs (2007). Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev*. 25: 235-260.

118. Pandiani C, Béranger GE, Leclerc J, Ballotti R, Bertolotto C (2017). Focus on cutaneous and uveal melanoma specificities. *Genes Dev.* 31(8):724-743.
119. Panzeter PL, Realini CA, Althaus FR (1992). Noncovalent interactions of poly(adenosine diphosphate ribose) with histones. 31 (5): 1379–1385.
120. Plummer R, Jones C, Middleton M, Wilson R, Evans J, Olsen A, Curtin N, Boddy A, McHugh P, Newell D, Harris A, Johnson P, Steinfeldt H, Dewji R, Wang D, Robson L, Calvert H (2008). Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 14: 7917-7923.
121. Prescher G, Bornfeld N, Hirche H, Horsthemke B, Jöckel KH, Becher R. (1996). Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet.* 4;347(9010):1222-5.
122. Puertas FJ, Diaz-Llopis M, Chipont E, Roma J, Raya A, Romero FJ (1993). Glutathione system of human retina: enzymatic conjugation of lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med.*14: 549–551.
123. Rajesh M, Mukhopadhyay P, Godlewski G, Bátakai S, Haskó G, Liaudet L, Pacher P (2006). Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition decreases angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 350: 1056-1062.
124. Rehman K, Akash MSH (2017). Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked? *J Cell Biochem.* 118(11):3577-3585.
125. Rodríguez MI, Peralta-Leal A, O'Valle F, Rodríguez-Vargas JM, Gonzalez-Flores A, Majuelos-Melguizo J, López L, Serrano S, de Herreros AG, Rodríguez-Manzaneque JC, Fernández R, Del Moral RG, de Almodóvar JM, Oliver FJ (2013). PARP-1 Regulates Metastatic Melanoma through Modulation of Vimentin-induced Malignant Transformation. *PLoS Genet.* 9(6):e1003531.
126. Sander CS, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ (2003). Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 148: 913-922.

127. Sato T, Han F, Yamamoto A (2008). The biology and management of uveal melanoma. *Curr Oncol Rep.* 10: 431-438.
128. Saisho Y (2014). Glycemic variability and oxidative stress: a link between diabetes and cardiovascular disease ? *Int J Mol Sci.*15: 18381–18406.
129. Sassa Y, Yoshida S, Ishikawa K, Asato R, Ishibashi T, Kono T (2016). The kinetics of VEGF and MCP-1 in the second vitrectomy cases with proliferative diabetic retinopathy. *Eye.* 30(5):746-753.
130. Schadendorf D (2002). Is there a standard for the palliative treatment of melanoma? *Onkologie.* 25: 74-76.
131. Schraufstatter IU, Browne K, Harris A, Hyslop PA, Jackson JH, Quehenberger O, Cochrane CG (1990). Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *The J Clin Invest.* 85: 554-562.
132. Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Gowans B, Grunwald D, De Murcia G, de Murcia J M (1995). A Dominant-Negative Mutant of Human Poly(ADP-Ribose) Polymerase Affects Cell Recovery, Apoptosis, and Sister Chromatid Exchange Following DNA Damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4753-4757.
133. Sebag J (2008). To see the invisible: the quest of imaging vitreous. *Dev Ophthalmol.* 42: 5–28.
134. Sensi M, Pricci F, Andreani D, DiMario U (1991). Advanced nonenzymatic glycation endproducts (AGE): their relevance to aging and the pathogenesis of late diabetic complications. *Diabetes Res.*16: 1–9.
135. Shah GM, Robu M, Nupur K, Purohit NK, Rajawat J, Tentori L, Graziani G (2013). PARP inhibitors in cancer therapy: magic bullets but moving targets. *Front Oncol.* 14;3:279
136. Shapiro R, McManus M, Garrick L, McDonald MJ, Bunn H (1979). Nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin at multiple sites. *Metabolism.* 28: 427–430.
137. Sharma S, Saxena S, Srivastav K, Shukla RK, Mishra N, Meyer CH, Kruzliak P, Khanna VK. (2015). Nitric oxide and oxidative stress is associated with severity of diabetic retinopathy and retinal structural alterations. *Clin Exp Ophthalmol.* 43: 429–436.

138. Shieh WM, Amé JC, Wilson MV, Wang ZQ, Koh DW, Jacobson MK, Jacobson EL (1998). Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem.* 13;273(46):30069-72.
139. Shin ES, Huang Q, Gurel Z, Sorenson C.M, Sheibani N (2014). High glucose alters retinal astrocytes phenotype through increased production of inflammatory cytokines and oxidative stress. *PLoS One.* 9: 103148
140. Shildkrot Y, Wilson MW (2009). Update on posterior uveal melanoma: treatment of the eye and emerging strategies in the prognosis and treatment of metastatic disease. *Curr Opin Ophthalmol.* 20(6):504-10.
141. Sies H, Berndt C, Jones DP (2017) Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 86:715-748.
142. Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Hilz H, Hickey R, Malkas L, Applegren N, Wu Y, Bers G and Smulson ME (1996). The Expression of Poly(ADP-Ribose) Polymerase During Differentiation-Linked DNA Replication Reveals That It Is a Component of the Multiprotein DNA Replication Complex. *Biochemistry.* 35: 11622-11633.
143. Singh AD, Rennie IG, Seregard S, Giblin M, McKenzie J (2004). Sunlight exposure and pathogenesis of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol.* 49: 419-428.
144. Sisay M, Edessa D (2017). PARP inhibitors as potential therapeutic agents for various cancers: focus on niraparib and its first global approval for maintenance therapy of gynecologic cancers. *Gynecol Oncol Res Pract.* 4:18.
145. Smith S (2001). The World According to PARP. *Trends Biochem Sci.* 26: 174-179.
146. Soloviev AI, Tishkin SM, Parshikov AV, Ivanova IV, Goncharov EV, Gurney AM (2003). Mechanisms of endothelial dysfunction after ionized radiation: selective impairment of the nitric oxide component of endothelium-dependent vasodilation. *Br J Pharmacol.* 138: 837-844.
147. Soriano FG, Virág L, Szabó C (2001). Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Mol Med.* 79: 437-448.

148. Staibano S., Pepe S., Lo Muzio L., Somma P., Mascolo M., Argenziano G., Scalvenzi M., Salvatore G., Fabbrocini G., Molea G., Bianco A.R., Carlomagno C. and De Rosa G. (2005). Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1 expression in malignant melanomas from photoexposed areas of the head and neck region. *Hum. Pathol.* 36, 724-731.
149. Szabó C (ed) (2000.) Cell death: the role of PARP. CRC Press, Boca Raton, FL.
150. Szabo C, Pacher P, Swanson RA (2006). Novel modulators of poly(ADP-ribose) polymerase. *Trends Pharmacol Sci.* 27: 626-630.
151. Tanaka Y, Koide SS, Yoshihara K, Kamiya T (1987). Poly (ADP-Ribose) Synthetase Is Phosphorylated by Protein Kinase C in Vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 148: 709-717.
152. Tanuma S, Yagi T and Johnson GS (1985). Endogenous ADP Ribosylation of High Mobility Group Proteins 1 and 2 and Histone H1 Following DNA Damage in Intact Cells. *Arch Biochem Biophys.* 237: 38-42.
153. Tanuma SI, Enomoto T and Yamada MA (1978). Changes in the Level of Poly ADP-Ribosylation During a Cell Cycle. *Exp Cell Res.* 117: 421-430.
154. Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, D'Amati G, Vergati M, Portarena I, Xu W, Kalish V, Zupi G, Zhang J, Graziani G (2003). Systemic administration of GPI 15427, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, increases the antitumor activity of temozolomide against intracranial melanoma, glioma, lymphoma. *Clin Cancer Res.* 9: 5370-5379.
155. Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, Muzi A, Vergati M, Forini O, Lacal PM, Ruffini F, Gold B, Li W, Zhang J, Graziani G (2005). Poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor as chemosensitiser of malignant melanoma for temozolomide. *Eur J Cancer.* 41: 2948- 2957.
156. Teodoro JS, Gomes AP, Varela AT, Duarte FV, Rolo AP, Palmeira CM (2013). Uncovering the beginning of diabetes: the cellular redox status and oxidative stress as starting players in hyperglycemic damage. *Mol Cell Biochem.* 376: 103–110.

157. Thallas-Bonke V, Lindschau C, Rizkalla B, Bach LA, Boner G, Meier M, Haller H, Cooper ME, Forbes JM (2004). Attenuation of extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy by the advanced glycation end product cross-link breaker ALT-711 via a protein kinase C- α -dependent pathway. *Diabetes*. 53(11):2921-30.
158. Tong WM, Ohgaki H, Huang H, Granier C, Kleihues P, Wang ZQ (2003). Null mutation of DNA strand break-binding molecule poly(ADP-ribose) polymerase causes medulloblastomas in p53(-/-) mice. *Am J Pathol*. 162(1):343-352.
159. Tsutsumi M, Masutani M, Nozaki T, Kusuoka O, Tsujiuchi T, Nakagama H, Suzuki H, Konishi Y, Sugimura T (2001). Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. *Carcinogenesis*. 22(1):1-3.
160. Turkcu UO, Yuksel N, Novruzlu S, Yalinbas D, Bilgihan A, Bilgihan K (2016). Protein oxidation levels after different corneal collagen cross-linking methods. *Cornea*. 35: 388–391.
161. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 27(2):120-39
162. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, and Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 160: 1-40.
163. Varma R, Torres M, Pena F, Klein R, Azen SP (2004). Prevalence of diabetic re- tinopathy in adult Latinos: The Los Angeles Latino eye study. *Ophthalmology*. 111: 1298–1306.
164. Videla LA, Fernandez V (1988). Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch Biol Med Exp*. 21: 85–92.

165. Virág L, Szabó C (2001). Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. *FASEB J.* 15(1):99-107.
166. Virág L, Szabó C (2002). The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev.* 54 (3): 375–429.
167. Virág L (2013). 50Years of poly(ADP-ribosyl)ation. *Mol Aspects Med.* 34(6):1043-1045.
168. Wang SY, Andrews CA, Herman WH, Gardner TW, Stein JD (2017). Incidence and Risk Factors for Developing Diabetic Retinopathy among Youths with Type 1 or Type 2 Diabetes throughout the United States. *Ophthalmology.* 124:424-430.
169. Wilkinson CP, Ferris FL 3rd, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, Dills D, Kampik A, Pararajasegaram R, Verdaguer JT; Global Diabetic Retinopathy Project Group (2003). Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology.* 110(9):1677-1682.
170. World Health Organization (WHO) (2014). Global status report on noncommunicable diseases. <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>.
171. World Health Organization (WHO) (2014). Global health estimates: Deaths by cause, age, sex and country. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/
172. World Health Organization (WHO) (2016). Causes Of blindness and visual impairment. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/en/>.
173. Yuan M, Siegel C, Zeng Z, Li J, Liu F, McCullough LD (2009). Sex differences in the response to activation of the poly (ADPribose) polymerase pathway after experimental stroke. *Exp Neurol.* 217: 210-218.
174. Ziegler M, Oei SL (2001). A Cellular Survival Switch: Poly(ADP-Ribosyl)Aktion Stimulates DNA Repair and Silences Transcription. *Bioessays.* 23: 543-548.

9 . Tárgyszavak

poli(ADP-ribóz), poli(ADP-ribóz) polimeráz, melanoma, uveális melanoma, oxidatív stressz, diabétesz, diabéteszes retinopátia, AGE, fehérje-karbonil, glutation.

Subject words

poly (ADP-ribose), poly(ADP-ribose) polymerase, melanoma, uveal melanoma, oxidative stress, diabetes, diabetic retinopathy, AGE, protein carbonyl, glutathione.

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, dr. Virág László professzor Úrnak a hosszú éveken át tartó türelmét és támogatását, valamint azt, hogy képes volt a kémiai kutatásokban szerzett óriási tapasztalatát a szemészet klinikumában is alkalmazni, az ötleteket megvalósítani. Hasonlóan köszönöm a Debreceni Egyetem Orvosi Kémiai Intézet dolgozóinak együttműködését, különösen dr. Bakondi Edina, dr. Hegedűs Csaba, dr. Kovács Katalin és dr. Bai Péter aktív részvételét a labor vizsgálatok kivitelezésében, és az eredmények értékelésében. Köszönöm dr. Szabó Évának és dr. Emri Gabriellának a bőrmelanomák vonatkozásában végzett aktív közreműködését. A vizsgálatokban nyújtott gyakorlati segítségért Herbály Mihályné Erzsike asszisztensnőnek, a PhD ügyintézésben való közreműködéséért Neiszné Kovács Évának és a doktori iskola dolgozóinak mondok köszönetet.

Köszönöm kollegáimnak, a SE Szemészeti Klinika dolgozóinak a biztatást és együttműködést a kutatások szervezésében. Köszönöm dr. Resch Miklós kollegám segítségét, aki mind az anyaggyűjtésben mind az eredmények feldolgozásában sokat segített és támogatott az évek során. Dr. Tóth Jeannette szemész és pathológus kolleganőmnek a szövettani vizsgálatok értékelésében nyújtott segítségét köszönöm.

Köszönöm dr. Nagy Zoltán Zsolt professzor úrnak, a Szemészeti Klinika igazgatójának, illetve a klinika korábbi igazgatóinak: dr. Süveges Ildikó professzor asszonynak és dr. Németh János professzor úrnak, hogy munkámhoz a klinikai háttérrel biztosították.

Köszönöm családomnak: férjemnek és lányaimnak a végtelen türelmet és támogatást abban, hogy ez a dolgozat elkészüljön, ami megértésük nélkül nem sikerült volna.



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,588

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

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

Debrecen, 2018.02.06.



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