

# **Poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) szerepe a bőr ultraibolya (UV) fény indukálta károsodásában**

**Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**Dr. Csete Béla**



**Pécsi Tudományegyetem**

**Általános Orvosi Kar**

**Pécs, 2009.**

**Poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) szerepe a bőr  
ultribolya (UV) fény indukálta károsodásában**

**Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**Dr. Csete Béla**

**Doktori iskola vezető: Dr. Sümegi Balázs, egyetemi tanár**

**Témavezető: Dr. Farkas Beatrix, egyetemi tanár**

**Dr. Battyáni Zita, egyetemi docens**

**Pécsi Tudományegyetem**

**Pécs, 2009.**

## 1. Bevezetés

Az életkor meghosszabbodása, valamint a természetes (napfény) és a mesterséges (pl. szolárium) UV-expozíció növekedése által kiváltott fénykárosodás világszerte a jó- és rosszindulatú bőrtumorok előfordulási gyakoriságának progresszív emelkedéséhez vezetett. A malignus bőrtumorok incidenciája az utóbbi 30 évben hazánkban is drámaian emelkedett, s ez a tendencia jelenleg is folytatódik. Míg az epidermális eredetű laphám carcinoma és a basocelluláris carcinoma patogenezisében a krónikus (élet során összeadódó) napfény expozíciónak, addig malignus melanoma esetében inkább az ismétlődő, rövid expozíciós idejű, intenzív napégéseknek lehet szerepe.

Fenti tényezők miatt a fényvédő készítmények iránti követelmények megnöttek. A teljes spektrumú védelem (UVA, UVB) alkalmazása feltétlenül indokolttá vált. A jelenleg meglévő, és a fényvédők használatát sok esetben akadályozó mellékhatások (fototoxikus, fotoallergiás reakció, színező hatás, nem megfelelő konzisztencia, stabilitási problémák) kiküszöbölése fontos feladat. A kutatás az eddigiektől merőben eltérő, új típusú fényvédő készítmények (pl.: a DNS-repair kapacitást támogató T4V (T4N5) liposzómális endonukleáz, az IL-12, PARP-gátlók) előállítására irányába folyik.

A bonyolult védelmi funkció érvényesüléséhez az alapvető celluláris folyamatokat (proliferáció, differenciálódás, túlélés, apoptózis) szabályozó, számos jelátviteli rendszer korrekt működése szükséges. Jelen munkában a nagyszámú jelátviteli folyamatból, melyek az UV-fény indukálta bőrelváltozások kialakulásában részt vesznek a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim aktivitás és annak szabályozásával összefüggő mechanizmusokat kívántam vizsgálni.

A PARP szerepet játszik a DNS károsodás indukálta jelátviteli rendszerben. Biológiai szerepe a következő lényeges funkcióban foglalható össze:

- DNS-repair és a genom integritás fenntartása
- különböző fehérjék expressziójának transzkripciós szintű szabályozása
- replikáció és a differenciálódás szabályozása
- fehérjelebontás szignáljaként szolgálhat az oxidatív károsodáson átesett sejtekben

A PARP szerepe oxidatív stresszben jól ismert. Számos patológiás folyamatban jelentős mennyiségű reaktív oxigén speciesz (ROS) képződik, ami lipid-peroxidációt,

proteinoxidációt, és egyesszálú DNS törést indukál. Az egyesláncú DNS törések aktiválják a nukleáris poli(ADP-ribóz) polimerázt amely a  $\text{NAD}^+$ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja. A túlzott mértékű PARP aktivitás a celluláris  $\text{NAD}^+$  és ATP depléciójához vezet, amelynek következménye a sejtek nekrozisa. A túlzott mértékű PARP enzimaktivitás gátlása csökkentheti az oxidatív stressz indukálta sejthalált.

A ROS okozta energia metabolizmus károsodás és sejthalál részben kivédhető PARP inhibitorokkal, feltehetően azért, mert a PARP-inhibitorok szignifikánsan csökkentik a ROS aktiválta  $\text{NAD}^+$  katabolizmus mértékét és csökkentik az ATP felhasználást a  $\text{NAD}^+$  reszintéziséhez.

Egy új molekula az (O-(2-hidroxi-3-piperidino-propil) piridin-3-karboxil sav amidoxim monohidroklorid) állt rendelkezésünkre, amelyről Prof. Sümegi Balázs és munkacsoportja ischaemia reperfúziós károsodásban végzett vizsgálatok alapján feltételezte, hogy PARP gátló hatással rendelkezik, és oxidatív stresszben citoprotektív. Mivel a PARP-regulátorok szerepével a bőrelváltozásokkal kapcsolatban nem állt információ rendelkezésünkre, ugyanakkor a bőr számos ponton érintett a PARP által szabályozott mechanizmusokban, első lépésként az új molekula hatásának vizsgálatát a bőrben molekuláris szinten kezdtük.

## **2. Az értekezés célkitűzései**

A munka célja a bőr akut és krónikus UV-fény károsodás kialakulásának megelőzésében szerepet játszó, illetve a már kialakult kóros állapotok helyreállításában részt vevő poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim szerepének és farmakológiai befolyásolhatóságának tanulmányozása volt.

A megvalósításhoz egyszerű, ugyanakkor jól reprodukálható modelleket próbáltunk használni, melyek mind sejtszinten, mind pedig a bőr, mint szerv szintjén biztosítják a fiziológias és patológias történések vizsgálhatóságát, és magukban foglalják a gyakorló klinikus számára az alkalmazás potenciális lehetőségét.

A fentiek alapján tanulmányozni kívántuk:

1. PARP-regulátor/inhibitor általi szabályzást a bőr akut és krónikus UV-irradiáció elleni védelmében
  - A poli-ADP-riboziláció jelentőségét a bőr UV-fény indukálta károsodásában
  - PARP aktivitást *in vitro* és *in vivo*
  - PARP-regulátor/inhibitor antieritematogén, DNS-, és immunoprotektív hatását
2. PARP-regulátor/inhibitor szerepét az UVA- és UVB-fény indukálta karcinogenezis elleni védelemben
3. **A célkitűzések megvalósítását célzó kísérletekben használt modellek és metodikák**

3.1. *PARP-regulátor (BGP-15M) a bőr akut és krónikus UV-fény károsodása elleni védelemben betöltött szerepének in vivo vizsgálata*

A lokálisan alkalmazott PARP-regulátor a bőr akut és krónikus UV-fény károsodása elleni védelemben betöltött szerepét szőrtelen (CRL:hr/hr BR Hr1) egérmodellen, egyszeri napfény expozíció, vagy mesterséges UVB-besugárzás, valamint krónikus UVA- és UVB-irradiáció alkalmazásával vizsgáltuk a BGP-15M krémmel, vagy vivőanyagával előkezelt teszterületeken.

3.2. *UV-sugárzás indukálta DNS-károsodás meghatározása*

A bőr UV-sugárzás indukálta DNS-károsodását az egyesláncú DNS törések meghatározásával, DNS-lánc szétcsavarodásán alapuló, fluoreszcenciás módszerrel végeztük.

A DNS-károsodás mértékét, szövettani metszetekben az apoptotikus keratinociták, a „sunburn” sejtek számának meghatározásával vizsgáltuk és „sunburn” sejt/mm epidermisz formájában fejeztük ki.

### 3.3. *PARP enzim auto-ADP ribozilációjának vizsgálata*

A poli(ADP-ribóz) polimeráz *in vivo* aktivitását az UV-expozíciónak kitett egerek bőrmintáiban a PARP auto-ADP ribozilációjának kvantitatív meghatározásával (Western-blot analízis) végeztük.

A szövetminták immunhisztokémiai analízisével vizsgáltuk a PARP enzim ADP-ribozilációjának mértékét és lokalizációját.

### 3.4. *UV-sugárzás indukálta immunszupresszió vizsgálata*

A PARP-regulátor a bőrben észlelhető UV-besugárzás által indukált immunszupresszióra kifejtett hatását az IL-10 és TNF $\alpha$  citokin szintézisének meghatározásával végeztük. Immunhisztokémiai analízissel.

### 3.5. *Klinikai tünetek vizsgálata*

Az UV-fény indukálta akut és krónikus fénykárosodás klinikai tüneteit vizuálisan és dermatoszkóppal vizsgáltuk.

### 3.6. *Fotokarcinogenezis vizsgálata*

A bőr krónikus UVA-, ill. UVB-expozíciója által kiváltott fotokarcinogenezist a tumorok jelentkezésének kinetikájával (klinikai vizsgálat), valamint hisztológiai (hematoxilin-eozin festés) és immunhisztokémiai (p53 mutáció kimutatása) analízissel tanulmányoztuk.

### 3.7. *Bőr kronológiai és UV-fény okozta öregedésének vizsgálata*

A bőr kronológiai és a krónikus UV-fény besugárzás hatására létrejött öregedését hisztológiai vizsgálattal tanulmányoztuk. Rutinszerűen a hematoxin-eozin festést használtuk (epidermális hipertófia, atrófia, stb.). A dermális rostkárosodást Orcein-Giemsza festéssel, a melanin pigmentáció meghatározását a Fontana-Masson féle argentaaffin reakcióval végeztük.

## 4. **Eredmények és következtetések**

### 4.1. *A PARP-regulátor BGP-15M DNS-protéktív hatása a bőrben*

Az UV-sugárzás által az egérbőrben indukált akut DNS-károsodás mértékét a képződött egyesláncú DNS-törések mennyiségének vizsgálatával azt találtuk, hogy az intenzív napfény expozíció a szövetmintákban az ép, nem károsodott DNS-arányát 30% alá csökkentette. Ugyanakkor a PARP-regulátor (15% BGP-15M krém) lokális alkalmazása kifejezett védelmet biztosított a napfény UV-tartományának DNS-károsító hatásával szemben.

Az UV-irradiáció által okozott DNS károsodás hisztológiai markereként nyilvántartott epidermális „sunburn” sejtek (apoptotikus keratinociták) kvantitatív meghatározása során, az UV-besugárzott (vivőanyaggal kezelt) bőrben a kontrollhoz képest hetvenötszörösére emelkedett „sunburn” sejtek száma. A „sunburn” sejt képződéssel szemben a PARP-regulátor használata DNS-protéktívnek bizonyult. A PARP-regulátorral előkezelt bőrmintákban az apoptotikus keratinociták száma közel azonos volt a kontroll bőrben észleltekkkel.

*Következtetés:* A PARP-regulátor lokális alkalmazása DNS-protéktívnek bizonyult. Az intenzív UV-fény expozíció által a bőrben kiváltott nagymértékű DNS-károsodás kivédhető volt.

#### 4.2 *PARP enzimaktivitás in vivo gátlása a bőr lokális BGP-15M kezelésével*

A magas dózisu UV-expozíció nagyfokú DNS-károsodást indukál, amely az egyesláncú DNS-törések képződése által a nukleáris PARP enzim kifejezett aktivációját idézi elő. A túlzott mértékű PARP aktivitás a celluláris NAD<sup>+</sup> és az ATP depléciójához, a sejt energiakészletének kimerüléséhez vezet, amelynek következménye a nekrozis. Az ismertetett mechanizmus bizonyítékául kísérletünkben a vivőanyaggal előkezelt, napfény expozíciónak kitett bőrmintákban hisztológiai vizsgálattal megfigyelt, kifejezett nekrotikus elváltozások szolgáltak.

Ismert, hogy a PARP gátlása részben megakadályozhatja ill. csökkentheti az oxidatív stressz indukálta sejthalált. Feltételeztük, hogy amennyiben a BGP-15M lokális alkalmazás mellett képes befolyásolni/kivédeni az oxidatív stressz okozta nekrozist, úgy PARP-gátló tulajdonsággal rendelkezik.

*Következtetés:* A BGP-15M krémmel előkezelt bőrből vett mintákban PARP enzim auto-ADP-ribozilációjának up-regulációját nem észleltük, ami arra utalt, hogy a szer lokális alkalmazása direkt, vagy indirekt módon gátolja az egyébként (vivőanyaggal kezelt mintákban) megfigyelt extrém magas PARP aktivitást.

#### 4.3 *A PARP ADP-ribozilációjának immunhisztokémiai vizsgálata*

A BGP-15M lokális alkalmazása esetén, az immunhisztokémiai reakcióval észlelt, az anti-poli(ADP-ribóz)-specifikus poliklonális antitesttel pozitív nukleáris festődést mutató epidermális sejtek számával jellemzett ADP-riboziláció mértékének csökkenése megfelelt a Western-blot módszerrel végzett kvantitatív mérés során a PARP-enzim auto-ADP-ribozilációjára kapott eredményeknek. A BGP-15M krémmel kezelt szövetmintákban a nukleáris festődés mértéke nem tért el a kontroll bőrben látottaktól.

*Következtetés:* A BGP-15M dózis függő módon gátolta a PARP enzim aktivitását. A bőrben a szer direkt PARP gátló szerepe érvényesült, amely az UV-expozíció által kiváltott egyesláncú DNS-törések által over-aktivált PARP auto-ADP-ribozilációjának csaknem a normál szintre történő down-regulációjában nyilvánult meg.



#### 4.4. *A PARP-regulátor (BGP-15M) hatása az UV-besugárzás által indukált bőr immunszupresszióra*

Az UV-fény ismert, negatív tulajdonságai között kiemelt jelentőségű a fotokarcinogenezis „előszobája”-ként nyilvántartott fotoimmunszupresszív hatás. A korszerű UV-tartományban fényvédő anyagokkal szemben elvárás, hogy a bőr, mint immunszerv funkciójának fiziológias működését biztosítsák, vagyis megakadályozzák a fotoimmunszupresszió/moduláció kialakulását. Az UVB-besugárzás után észlelhető immunszupresszió és gyulladás az epidermális sejtek által termelt citokinek (pl. IL-10, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-12, stb) és biológiailag aktív anyagok modulációja (up-, down-regulációja) révén manifesztálódik. Egérbőrben az IL-10 és TNF $\alpha$  citokineket az UVB-fény indukálta immunszupresszió markereként tartják számon. A PARP-regulátor (BGP-15M) fotoimmunprotektív hatásának meghatározását az IL-10 és TNF $\alpha$  citokinek immunhisztokémiai vizsgálatával végeztük. A vivőanyaggal előkezelt, UVB-besugárzott mintákban az epidermális sejtek anti-IL-10 poliklonális antitesttel kifejezett citoplazmatikus festődést mutattak az epidermisz teljes vastagságában. Ugyanakkor a PARP-regulátorral kezelt mintákban szórványosan csak egy-egy sejt festődött. A vivőanyaggal előkezelt, UVB-besugárzott bőrből készült metszeteken anti-TNF $\alpha$  poliklonális antitesttel intenzív citoplazmatikus és membránfestődést észleltünk. Az ödémásan kiszélesedett hámban részben a bazális rétegben perinukleárisan intenzív, a felső sejtsorokban pedig kevésbé kifejezett, diffúz, intracitoplazmális reakciót figyeltünk meg. A papilláris dermisz legfelső rétegében közvetlenül a hám alatt elhelyezkedő makrofágok is kifejezett festődést mutattak. A PARP-regulátorral ( $\geq 10\%$  BGP-15M tartalmú krémmel) előkezelt, UVB-expozícióban részesült bőr epidermiszében, hasonlóan az UVB-besugárzástól védett kontrollhoz, immunhisztokémiaileg detektálható TNF $\alpha$  szintézist nem észleltünk.

*Következtetés:* A PARP-regulátor (BGP-15M) lokális alkalmazása fotoimmunprotektív hatásának bizonyult az UVB-irradiáció indukálta bőr-immunszupresszióval szemben.

4.5. *A PARP-regulátor szerepe a bőr akut UVB-fény károsodás elleni védelmében (klinikai és hisztológiai vizsgálatok)*

A szőrtelen egerek bőrén különböző koncentrációjú (5, 10, 15 és 20%) BGP-15M tartalmú krémmel illetve vivőanyaggal előkezelt teszterületeken, 2 MED UVB-irradiáció után 24 órával jelentkezett klinikai tünetek (eritéma, ödéma, vezikula, bulla, erózió) alapján határoztuk meg a PARP-regulátor antieritematogén koncentrációját, mely 10% BGP-15M-nek felelt meg.

A bőrminták hisztológiai feldolgozása során a vivőanyaggal előkezelt, UVB-expozícióban részesített bőrben különböző mértékű, akut fénykárosodásra utaló eltérést észleltünk. Számos, eozinofil citoplazmával, piknotikus sejtmaggal rendelkező, vagy mag nélküli apoptotikus keratinocitát („sunburn” sejtet), a dermisz felső rétegében, részben perivaszkulárisan, részben a dermo-epidermális határ mentén ödémásan fellazult alapállományban neutrofil granulocitákat, a papilláris rétegben dilatált, duzzadt endotélű, vér alakos elemeivel kitöltött ereket lehetett látni. A  $\geq 10\%$  BGP-15M tartalmú krémmel előkezelt állatok csoportjaiban lényeges kóros hisztológiai eltérést nem találtunk. Amennyiben az UVB- károsodás mértékét az egységnyi epidermiszben jelen levő „sunburn” sejtek számával fejezzük ki, úgy a BGP-15M  $\geq 10\%$  koncentrációban alkalmazva több mint harmincszoros védelmet jelent, az egyszeri, eritematogén UVB-irradiáció (vivőanyaggal kezelt bőrben kifejtett) károsító hatásával szemben.

*Következtetés:* A lokálisan alkalmazott PARP-regulátor fotoprotektívnek bizonyult a bőr akut UVB-fénykárosodás elleni védelemben.

4.6. *PARP-regulátor antieritematogén hatásának összehasonlító vizsgálata ismert fényvédő faktorú (SPF) készítménnyel*

A BGP-15M tartalmú krém ( $\geq 10\%$  koncentrációban alkalmazva) antieritematogén hatását hasonlítottuk össze egy, a forgalomban levő, SPF (Sun Protection Factor) 30 jelzésű, az UVB és UVA tartományban védelmet biztosító (általunk ”AS”-sel jelölt) készítménnyel. Az „AS”, illetve BGP-15M krém előkezelésben részesült teszterületeken az UVB-expozíció

klinikai tüneteket nem okozott. Hisztológiai vizsgálattal az "AS"-sel jelölt, ill. BGP-15M krém kezelésben részesített bőrmintákban lényeges kóros eltérést nem találtunk

*Következtetés:* Az alkalmazott kísérleti körülmények között a  $\geq 10\%$  BGP-15M tartalmú krém fotoprotektív hatása megegyezett az „AS” jelzésű, 30-as fényvédő faktorú (SPF 30) készítményével.

#### 4.7. *PARP-regulátor hatása a szoláris UV-expozíció klinikai tüneteire és a hisztológiai elváltozásokra*

A vivőanyaggal előkezelt, intenzív UV-sugárzásnak kitett teszterületeken a bőr a napégés klinikai tüneteit mutatta. Hisztológiailag a klinikai tüneteknek megfelelően erodált, illetve ödémásan fellazult, csökkent magfestésű, nekrotikus hám felszínén nagy mennyiségű fibrin csapadék volt megfigyelhető. A dermisz legfelső részében elhelyezkedő neutrofil granulociták és magtörmelékek sötét, széles sávot képeztek. Ugyanakkor a  $\geq 10\%$  BGP-15M tartalmú krémmel végzett előkezelés az intenzív UV-sugárzás által indukált súlyos klinikai tüneteket kivédte.

*Következtetés:* A PARP-regulátor (BGP-15M krém  $\geq 10\%$ ) fotoprotektívnek bizonyult, meggátolta az intenzív UV-expozíció által indukált dermatitis solaris klinikai és hisztológiai tüneteinek megjelenését.

#### 4.8. *A BGP-15M krém protektív a krónikus UV-besugárzás indukálta fotokarcinogenezis klinikai, hisztológiai, immunhisztológiai és ultrastuktúrális tüneteivel szemben*

##### 4.8.1. *A BGP-15M krém fotoprotektív hatása krónikus UVB-fény károsodásban*

Krónikus UVB-besugárzásban részesített szőrtelen egerek teszterületein vizsgáltuk a PARP-regulátor hatását a krónikus fénykárosodás elleni védelemben. Kísérleteink eredményei alapján a PARP-regulátor lokális alkalmazása a krónikus UVB-expozíció (32 hét, UVB

összdózis:  $39 \text{ J/cm}^2$ ) fotokarcinogén hatását kivédte. A vivőanyaggal előkezelt teszterületeken a 18. héttől kezdve (UVB-dózis:  $22,5 \text{ J/cm}^2$ ) klinikailag 1-2 mm nagyságú, vörösbarna színű, félgömbszerűen kiemelkedő tumorok jelentkeztek, amelyek hisztológiai vizsgálattal carcinoma spinocellulare-nak bizonyultak. A 15% BGP-15M krémmel előkezelt egerek bőrmintáinak hisztológiai feldolgozása során a kontroll bőrhöz képest az epidermisz másfél-kétszeresére történő kiszélesedését lehetett megfigyelni, a dermiszben lényeges kóros eltérést nem észleltünk. A vivőanyaggal kezelt, UVB-irradiált csoport minden tagja a 23. hétre egy vagy több, klinikailag és hisztológiailag verifikálható, spinocellularis carcinomának illetve keratosis solarisnak megfelelő bőrelváltozással rendelkezett, ugyanakkor a 15% BGP-15M krémmel előkezelt egerek bőre enyhe fokú pigmentáción kívül más eltérést nem mutatott. A kísérlet befejezésekor a 32. héten a vivőanyaggal előkezelt, krónikus UVB-besugárzásban részesült állatok bőre a teszterületen jelentősen megvastagodott, sötétbarna-szürkés hiperpigmentációt és depigmentációt mutatott, felszíni egyenetlenség jeleivel, különösen a multiplex tumorok környezetében. A 15% BGP-15M krémmel előkezelt, és krónikus UVB-expozícióban (összdózis:  $39 \text{ J/cm}^2$ ) részesített egércsoportban, a teszterület bőrét összehasonlítva a kezeletlen kontroll állatokéval, illetve a környező, takarással védett bőrfelzínnel, barnás-vörös színű pigmentáción kívül egyéb klinikailag értékelhető eltérést nem találtunk. Nyolc hónap elteltével tumor képződésre utaló klinikai, vagy hisztológiai eltérést a BGP-15M krémmel előkezelt csoportban nem észleltünk. Az UVB-expozíciótól védett (BGP-15M, ill kontroll csoport) állatokon spontán tumor képződést nem lehetett megfigyelni. Irritatív, vagy allergiás reakciót a kísérlet során nem észleltünk.

A krónikus fénykárosodás a vivőanyaggal előkezelt mintákban a 26. héten a rugalmas rostok Orcein-Giemsza festéssel kimutatható károsodásában (nagy göcokban fragmentáció és összezsapzódás), a 32. héten a tumorok körül az elasztikus rostok megfogyatkozásában, és a kollagén rostok felszaporodásában nyilvánult meg. A 15% BGP-15M krémmel előkezelt, és UVB-irradiációban részesült egerek bőrmintáiban ugyanakkor megtartott, ill. enyhén megfogyatkozott rugalmas rosthálózatot figyelhettünk meg, amit a kronológiai öregedés hisztológiai jeleként értékeltünk. Amíg a vivőanyaggal előkezelt mintákban a krónikus UV-expozíció hatására a dermiszben a melanin a makrofágokban durva szemcsés formában, esetenként szabadon a kötőszöveti alapállományban is megtalálható volt, addig a PARP-

regulátorral előkezelt egerek bőrében a melanin pigment a bazális réteg egyes sejtjeiben gócosan jelent meg.

Immunhisztokémiai vizsgálattal a PARP-regulátorral előkezelt, krónikus UVB-besugárzásban részesített bőrmintákban a bazális keratinociták p53 antitesttel csak elvétve adtak immunhisztológiai reakciót. A vivőanyaggal előkezelt állatok bőrében a keratosis solarisnak megfelelő területeken foltos p53 festődést kaptunk. Az invazív tumorokban a sejtek nagy része intenzív p53 magpozitivitást adott. A precancerosus elváltozásokban megfigyelhető „patch”-jelleg a klonális expanzióra utalt.

*Következtetés:* Eredményeink alapján a PARP-regulátor a krónikus UVB-expozíció fotokarcinogén hatását kivédte.

#### *4.8.2. PARP-regulátor hatásának vizsgálata UVA-sugárzás indukálta fotokarcinogenezis klinikai tüneteire szőrtelen egérmódellem*

A PARP-regulátor BGP-15M potenciális fotoprotektív tulajdonságát a krónikus UVA-besugárzott, ill. 8-metoxipszoralennel fényérzékenyített és UVA-besugárzott szőrtelen egerek bőrében kialakuló változások követésével vizsgáltuk.

A klinikai tünetek súlyosságát valamint a tumorok jelentkezését vizsgáltuk. Az első tumort a 14. héten, a vivőanyag+8-MOP+UVA-kezelésben részesült állaton figyeltük meg. A 4. hónap végére a vivőanyaggal előkezelt, 8-MOP+UVA-irradiációban részesült állatokon különböző nagyságú szoliter tumorokat észleltünk. A PARP-regulátor lokális előkezelés fotoprotektívnek bizonyult mind a 8-MOP-pal fényérzékenyített, mind pedig az UVA-besugárzott (26 hét, összdózis: 65 J/cm<sup>2</sup>) állatok bőrében. A PARP-regulátor kivédte a vivőanyaggal előkezelt, hasonló módon UV-expozíciónak kitett állatokban klinikailag megfigyelt, és hisztológiailag igazolt tumorképződést.

A PARP-regulátorral előkezelt, UVA-besugárzott bőrmintákban hisztológiai vizsgálattal a hám enyhe kiszélesedését és megtartott hámstruktúrát találtunk. Ugyanakkor a vivőanyaggal előkezelt, UVA-besugárzott mintákban az epidermisz egyenetlenül

akantótikusnak és hiperkeratótikusnak, szegmentálisan parakeratotikusnak bizonyult a hematoxilin-eozinnal festett metszetekben. Az epidermisz alsó részein a szerkezet felbomlott, a magok polaritása megszűnt. Ezeken a területeken a sejtmagok általában anapláziát, hiperkrom kromatin szerkezetet mutattak, és nagyobb számban sejtoszlások is észlelhetők voltak. A bazális rétegben kifejezett sejtproliferációt láttunk. A dermo-epidermális határ mentén főként limfocitákból és hisztiocitákból álló lobosodást észleltünk.

A vivőanyaggal kezelt, UVA-besugárzott bőrmintákból készült hisztológiai metszeteken Orcein-Giemsza festéssel a rugalmas rostok fragmentálódását és összezsapzódását figyeltük meg a dermisz középső részében. A PARP-regulátorral előkezelt bőrben az elasztikus rostok száma minimális mértékben csökkent, a kollagén rostok száma változatlan volt a kezeletlen, azonos korú kontroll bőrhöz viszonyítva. Fontana-Masson festéssel kisebb mennyiségű melanin pigmentet tudtunk fokálisan kimutatni a bazális és szuprabazális keratinocitákban. A vivőanyaggal előkezelt, fényérzékenyített, UVA-besugárzott egérbőrben Fontana-Masson festéssel fokálisan nagy mennyiségű melanint lehetett kimutatni a bazális és szuprabazális keratinocitákban, az epidermisz alsóbb sejtsoraiban, és a dermális makrofágokban tömeges melanin pigmentet észleltünk. Ugyanakkor az UVA-fénnyel besugárzott bőrben kisebb mennyiségben lehetett melanin pigmentet a hámban és az irhában megfigyelni.

Immunhisztológiai vizsgálattal a 15% BGP-15M krémmel előkezelt, UVA-besugárzott, valamint az UV-expozícióban nem részesült bőrmintákban p53 festődést nem észleltünk. A vivőanyaggal előkezelt, UVA-besugárzott részesített állatok bőrében a bazális sejtréteg magjainak és a megbomlott szerkezetű hámrészletek tumorosan átalakult sejteinek p53 akkumulációját igazoltuk.

*Következtetések:* A PARP-regulátorral végzett kezelés protektívnek bizonyult a több mint féléves UVA-besugárzás fotokarcinogén hatásával szemben.

## 5. Megbeszélés

A környezeti stressz hatások közül napjainkban bőrgyógyászati szempontból az egyik legfontosabb a napfény ultraibolya tartományának károsító hatása. Ezen a károsító hatással szembeni védelem lehetőségét vizsgáltam. Szemben a hagyományos fizikai illetve kémiai hatáson alapuló fényvédelemmel érdeklődésem a biológiai fényvédelem ezen belül is a PARP-regulációs mechanizmusokra terelődött. Prof. Dr. Farkas Beatrix munkacsoportjának tagjaként lehetőségem nyílt a BGP-15 mint PARP-regulátor molekula bőrgyógyászati hasznosításának kipróbálására.

Munkacsoportunk szőrtelen egéren végzett vizsgálataival igazolta, hogy a BGP-15M lokális alkalmazása kivédi az UV-fény DNS-károsító, immunszuppresszív hatását, az akut és krónikus UV(A/B)-fény károsodás klinikai és hisztológiai tüneteinek manifesztációját. Protektívnek bizonyult a több mint féléves UVA-besugárzás és 8 hónapos UVB-expozíció fotokarcinogén hatásával szemben. Irritatív, allergiás, ill. fotoirritatív vagy fotoallergiás reakciót a szer hosszas használata mellett nem észleltünk. További előnye, hogy a BGP-15M a bőrben kumulálódik, amelyet az UV-expozíció tovább fokoz. Tulajdonságai alapján a fényvédők új csoportjába tartozik. Potenciális használatával elkerülhető a jelenleg forgalomban levő sok komponensű fényvédő készítmények alkotó elemei között fellépő interakció, allergizáló, vagy a bizonyos hullámhosszokon jelentkező fényérzékenyítő (fotokarcinogén) mellékhatás.

## 6. Az értekezés megvalósult főbb célkitűzései

*Elsőként hívtuk fel a figyelmet a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim a bőr akut és krónikus UV(A/B)-fény károsodásában, és annak legsúlyosabb formájában, a fotokarcinogenezisben betöltött szerepére.*

*Elsőként közöltük, hogy PARP-gátlása, ill. down-regulációja fotoprotektív hatású a bőr akut és krónikus UV-fény károsító hatásával szemben.*

Az új, nem toxikus PARP-gátlóról, az O-(2-hidroxi-3-piperidino-propil)piridin-3-karboxil sav amidoxim monohidroklorid sójáról, a BGP-15M molekuláról *elsőként bizonyítottuk*, hogy lokális alkalmazása esetén az UV-fény citotoxikus hatásaival szemben a bőrben

jelentős védelmet biztosít. A BGP-15M direkt gátolja a PARP-aktivitást, DNS-protéktív, fotoimmunprotéktív, véd az akut és krónikus UV(A/B)-fény károsodás klinikai és hisztológiai tüneteinek manifesztációjával szemben és gátolja a fotokarcinogenezist.

*Munkacsoportunk* egy új típusú (PARP-gátló) fényvédő molekulát *fejlesztett ki*, mely önmaga potenciálisan képes mindazon feltételeknek eleget tenni, amit jelenleg 10-15 különböző fizikai és kémiai fényvédő hatású molekula kombinációjával érnek el.



**Effect of Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) in  
ultraviolet light induced skin damage**

**Ph.D. Thesis by Bela Csete M.D.**

**Program leader: Professor Balázs Sümegi**

**University of Pécs, Medical School  
Department of Dermatology**

**2009.**

## 1. Introduction

The radiation striking the earth is approximately 10% ultraviolet (UV). The UV spectrum is divided for convenience into UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm), UVC (100-290 nm) and vacuum UV (10-100 nm). Shortest UVB, UVC and vacuum UV are screened by the ozone layer. The remained UVA and UVB light reaches the earth surface and can cause photodamage. Photodamage is the specific damage produced in tissue by single or repeated exposure to ultraviolet light. The UVB component, which is directly absorbed by cellular macromolecules (including DNA), causes DNA single strand breakages. In contrast, UVA is weakly absorbed by most biomolecules but generated reactive oxygen species (ROS) such as singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) - via interaction with cellular chromophores -, hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and superoxid anion. In humans, both acute and chronic exposure to sunlight are associated with various physiological and pathological states. The acute response leads to immediate effects such as erythema, sunburn, pigmentation, hyperplasia, immunosuppression. The chronic response leads to delayed effects such as cataract, skin aging, premalignancies (solar keratosis) and malignancies, including melanoma and non-melanoma (basal cell and squamous cell carcinomas) skin cancer. It is known that most of these effects depend upon the duration and frequency of exposure, the intensity of solar radiation and the reactivity of skin based on genetically determined constitutive skin color and skin phototype. Microscopically changes are also detectable. Epidermal changes include intracellular edema, vacuolization and swelling of melanocytes and the development of "sunburn cells".

Sunscreens are now recognized to be an important strategy in the prevention or minimization of premalignant and malignant skin lesions. We would like to test the photoprotective ability of BGP-15M a novel poly-ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitor against acute and chronic photodamage produced in skin by exposure to UV light.

The poly-ADP-ribose polymerase is a nuclear nick-sensor enzyme, becomes activated by recognizing DNA single-strand breaks. Upon activation, PARP cleaves NAD to nicotinamid and ADP-ribose. Excessive activation of PARP leads to depletion of NAD and ATP levels resulting in impaired cellular energy metabolism. „PARP-mediated

cellular suicide pathway” contributes to cell necrosis and tissue injury. ROS-induced impaired energy metabolism and cell death can partially be reverted by PARP inhibitors, because these latter significantly decrease the rate of NAD<sup>+</sup> catabolism and reduce ATP utilization for the resynthesis of NAD<sup>+</sup>. The fact that PARP inhibitors decrease the catabolism of cytoplasmatic NAD<sup>+</sup> and so possibly decrease ROS-induced mitochondrial NAD<sup>+</sup> loss suggest a connection between oxidative mitochondrial damage and PARP activation. Therefore it is possible that protection of cells from oxidative damage can be achieved by the potential of PARP inhibitors to reduce DNA injury and ROS production.

## **2. Scientific goals**

- I. Test the photoprotective ability of BGP-15M a novel PARP inhibitor against acute and chronic photodamage produced in skin by exposure to UV light.
- II. Test the anti-photocarcinogenic effect of BGP-15M against UV light induced tumor formation.

## **3. Material and methods**

### *3.1. Experimental animals*

Investigations were carried out on hairless VAF/plus (CRL:hr/hr BR) mice, 5 weeks of age, purchased from the Charles River Hungary Co..

### *3.2. UV irradiation*

UV irradiation carried out by the Waldmann UV 8001K light booth equipped with UV21 Philips lamps major peak at 313 nm (in UVB, 285-350 nm). The total irradiance

was measured by IL 700 spectroradiometer with cosine-corrected SEE 400 detector and WBS 320 filter.

### 3.3. *Test substances*

BGP-15M containing cream and lotion or vehicle in different concentration (5%, 10%, 15%) and Ambre Solaire cream (SPF 30) was applied at 2 mg/cm<sup>2</sup> to mouse skin prior to UV light exposure and removed immediately after it.

### 3.4. *Determination of minimal erythema dose (MED)*

Phototesting of mice skin: six unprotected skin surface areas (0.25 cm<sup>2</sup>) of animals were exposed by increasing dose (0.07 – 0.32 J/cm<sup>2</sup>) of UVB.

Clinical MED was determined 24 h after UVB exposure.

### 3.5. *Experimental condition to determination of antierythematogenic dose of BGP-15M*

Three groups of mice were used to study the antierythematogenic effect of BGP-15M-containing creams in a concentration of 5%, 10 % and 15%. Tests were carried out on uncovered skin areas (1 cm<sup>2</sup>, separated from each other by a 0.5 cm wide range of covered skin) of ventral-thoracic region of animals, in form of self-control examination. The proximal test areas were treated by BGP-15M-containing creams (2 mg/ cm<sup>2</sup> skin surface) immediately before erythematogenic UVB exposure (4.4 MED) carried out by sunlight. The concentration of BGP-15M was 5% in group I., 10% in group II., 15% in group III. of mice. The distal test areas exposed to sunlight (in the same time) without any pretreatment and used as positive controls. Animals without UV exposure served as negative controls. 20 hours following exposure to the sun the test areas were compared to each-other and the unexposed skin of control animal.

### 3.6. *Experimental conditions to comparison of BGP-15M-pretreated and Ambre Solaire cream (SPF 30)-pretreated sunexposed skin with that of sunexposed, untreated (positive control) and unexposed and untreated (negative control) ones*

Four groups of mice were used to compare the photoprotective effect of BGP-15M-containing lotion (20%) and cream (15%) with that of Ambre Solaire cream (SPF 30). Tests were carried out on uncovered abdominal skin areas (1 cm<sup>2</sup>, separated from each other by a 0.5 cm wide range of covered skin) of ventral-thoracic region of animals, in form of self-control examination. The proximal test areas were treated either by BGP-15M-containing cream or lotion (2 mg/ cm<sup>2</sup> skin surface) or Ambre Solaire cream (2 mg/ cm<sup>2</sup> skin surface) immediately before erythemalogenic UVB exposure (2.0 MED) carried out by sunlight. The distal test areas exposed to sunlight (in the same time) without any pretreatment and used as positive controls. As negative controls, non-irradiated, sunscreen-treated groups of animals were used. 20 hours following exposure to the sun the test areas were compared to each other and to the skin surfaces of the negative and positive control animals.

3.7. *Experimental conditions to determination of poly-ADP-ribose-polymerase (PARP) activity by ADP-ribosylation assay after UVB exposure in samples of BGP-15M-pretreated, untreated (positive control) and unexposed and untreated (negative control) skin*

Determination of PARP activity was carried out by ADP-ribosylation assay using an anti-ADP-ribose monoclonal antibody and Western blot analysis. The experiment were carried out by 2.0 MED UVB dose, an erythemalogenic exposure to the ventral-thoracic region of mice pretreated with 15% BGP-15-containing cream or without it an in the untreated control animals PARP activity was determined.

3.8. *Histology*

Tissue samples were fixed in 10% neutral-buffered formaldehyde and were embedded in paraffin. 3-4  $\mu$ m tissue sections were deparaffinized, rehydrated in graded alcohol and stained with hematoxylin and eosin.

### 3.9. *Immunostaining of tissue sections*

The slides were incubated either with poly-ADP-ribose-specific polyclonal serum (Biomol Res.) or polyclonal IL-10 (goat anti-mouse) serum (Sigma Co.), staining was carried out according to the streptavidin-biotin-peroxidase method using the Immunotech Universal Kit.

## 4. **Results**

### 4.1. *Phototesting of mice skin - determination of minimal erythema dose (MED)*

The minimal erythema dose of UVB was determined. Erythema started developing at a dose of 0.24 J/cm<sup>2</sup>.

### 4.2. *Effect of single erythematogenic UVB irradiation to the mice skin*

Using 2.0 MED UVB dose as erythematogenic exposure all the clinical signs of sunburn could be detected after a latency of 24 hours. The exposed skin area showed a red discoloration (erythema) with erosion. In the formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections acanthotic and exulcerated epidermis with an inflammatory infiltrate in the dermal connective tissue could be observed by histological examination.

### 4.3. *Determination of antierythematogenic effect of BGP-15M*

In test areas pretreated with equal or greater than 10% BGP-15M-containing creams erythema or other signs of sunburn could not be observed. The skin surface of these pretreated test areas were clinically same as the unexposed skin of control animals (negative control). In contrast to it, the distal, UV exposed test areas of the animals showed all the signs of sunburn inform of lilac, red discoloration with oedema.

### 4.4. *Histology*

Results of histological examination stained by Hematoxylin-Eosin showed exulcerated epidermis with inflammatory infiltrates in the dermal connective tissue of biopsy material taken from UV-exposed mouse skin without pretreatment of sunscreen.

In contrast to it in BGP-15M-pretreated (15%), UV-irradiated skin samples except a mild acanthosis, histologically normal mouse skin could be observed. In skin biopsy samples pretreated with 5% BGP-15M cream a mild acanthosis and an inflammatory reaction in the upper dermis without any ulceration could be detected.

*Conclusion:* Clinical observations and the result of histological investigation suggested that BGP-15M-containing cream in a concentration of 10 % functions as sunscreen.

4.5. *Comparison of BGP-15-pretreated and Ambre Solaire cream (SPF 30)-pretreated sunexposed skin with that of sunexposed, untreated (positive control) and unexposed and untreated (negative control) ones*

Test areas pretreated with 15% BGP-15M-containing cream or 20% BGP-15-containing lotto or Ambre Solaire cream (SPF 30) showed normal skin surface as it could be observed in animals used as negative control.

The skin areas with UV exposure without pretreatment of sunscreen were found erythematous clinically.

Comparison showed no difference between the photoprotective effect of Ambre Solaire cream with sun protection factor 30 and the used concentration of BGP-15M substances (cream and lotion).

*Conclusion:* It suggest that the 15% BGP-15M-containing cream and the 20% BGP-15M-containing lotto might have an SPF 30.

4.6. *Determination of poly-ADP-ribose-polymerase (PARP) activity by ADP-ribosylation assay after UVB exposure in samples of BGP-15M-pretreated, untreated (positive control) and unexposed and untreated (negative control) skin*

In skin samples without BGP-15M pretreatment and with an exposure of 2.0 MED UVB all the signs of sunburn could be detected clinically and histologically and elevated PARP activity was found in ADP-ribosylation assay. In contrast to it, in BGP-15M-pretreated skin samples no clinical signs of sunburn were observed with nearly the same PARP activity as in the unexposed control skin.

## **5. Conclusion**

Topically applied BGP-15M containing cream

- I. decrease the UV light-induced single-strand DNA breaks in skin
- II. decreased the UV light-induced overactivation of self-ADP ribosylation of PARP in the skin
- III. able to avoid the photoimmunosuppression
- IV. is photoprotective against acute UVB damage
- V. is as effective as a 30 SPF sunscreen
- VI. protect the skin against UV light induced chronic skin damages clinically, histologically, immunohistologically and ultramicroscopically
- VII. protect the chronic UVB and UVA light induced photocarcinogenesis



## Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények jegyzéke

Szabados E., Fischer G., Toth K., **Csete B.**, Nemeti B., Trombitás K., Habon T., Endrei D., Sumegi B.: Role of reactive oxygen species and poly-ADP-ribose polymerase in the development of AZT-induced cardiomyopathy in rat. *Free Radical Biology and Medicine* 1999. 26:309.

Farkas B., Sümegi B., **Csete B.**, Szekeres Gy.: Novel poly(ADP)-ribose polymerase inhibitor with photoprotective activity. *J Invest Dermatol* 1999. 113:438.

Farkas B., Sümegi B., Rablóczy Gy., **Csete B.**, Hodosi B., Magyarlaki M., Bernáth S., Literáti Nagy P.: Protecting utilities of PARP inhibitors. Chapter 13, CRC Press, Boca Raton, 2001.

Farkas B., Magyarlaki M., **Csete B.**, Németh J., Rablóczy Gy., Bernáth S., Literáti Nagy P., Sümegi B.: Reduction of acute photodamage in skin by topical application of a novel PARP inhibitor. *Biochem. Pharmacology* 2002. 63: 921-932.

B. Farkas, B. Sümegi, Gy. Rablóczy, **B. Csete**, B. Hodosi, M. Magyarlaki, S. Bernáth, P. Literáti Nagy: Protecting Effect of PARP Inhibition on Ultraviolet Light-Induced Skin Damage. Pp.: 257-271, In: Edit.: Jie Zhang: PARP as a therapeutic Target. CRC Press, London, New York, Washington. 2002.

Farkas B., Sümegi B., Rablóczy Gy., **Csete B.**, Hodosi B., Magyarlaki M., Bernáth S., Literáti Nagy P.: Protecting effect of PARP inhibition on UV light-induced skin damage *Pharmacol Toxicol* 2002. 257-276.

Farkas B., **Csete B.**, Magyarlaki M., Bernáth S., Sümegi B.: Topical Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) regulator and its prospects for use. *Ann. Dermatol. Vénéréol.* 2002. 129: 91.

**Csete B.**, Lengyel Zs., Kádár Zs., Battyáni Z.: Poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Polymerase-1 expression in cutaneous malignant melanomas as a new molekular marker of aggressive tumors. *Pathol Ocol Res* 2008. Aug. 28. ( Epub ahead of print)

## **Az értekezés alapjául szolgáló tudományos előadások jegyzéke**

**Csete Béla**, Szabados Eszter, Farkas Betarix, Sümegi Balázs: Role of PARP in the development of AZT induced tissue damage, Magyar Dermatológiai Társulat Vándorgyűlése, Lillafüred, 2001.

**Csete B.**, Magyarlaki M., Rablóczky Gy., Sümegi B., Farkas B.: Novel poly(adp-ribose)Polymerase (PARP) regulator in sun protection. I.EADV International Spring Symposium. Malta. 2003.

**Csete B.**, Magyarlaki M., Farkas B.: Effect of PARP-regulator chronic UVA damage. 42. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. Berlin. 2003.

**Csete B.**, Magyarlaki M., Farkas B.: PARP-regulacio szerepe a bőr krónikus UV-fény károsodásának kivédésében. Magyar-Német Dermatol.Társ. 5. Tudományos Ülése, Pécs. 2004.

## **Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni mindazoknak, akik e munka elvégzésében, Ph.D. értekezésem megírásában szakmai és baráti tanácsaikkal segítettek: **dr. Sümegi Balázs** professzor úrnak valamint a PTE ÁOK Biokémiai Intézet összes dolgozójának, akik kutatói pályámon elindítottak, **Dr. Farkas Beatrix** professzor asszonynak, aki amellet, hogy bevezetett a gyógyító hivatás szépségeibe, nem hagyta kialudni a lelkesedésemet a kutatás iránt sem. Külön köszönet illeti **Dr. Battyáni Zita** docens asszonyt, akinek hatására a dermatoonkológiára specializálódtam és akinek a lelkesítése nélkül ez a dolgozat nem jött volna létre. Köszönet **Dr. Magyarlaki Márta** adjunktusnőnek a szövettani és immunhisztológiai részben végzett felbecsülhetetlen munkáért, **Stein Anikónak** és **Kavas Máriának** a szőrtelen egerekkel végzett kísérleteimben nyújtott segítségükért, **Lovas Ivánnak**, akinek a kiváló fotókat köszönhetem és rendelkezésemre állt minden technikai jellegű és számítógépes probléma megoldásában. Hálámat és köszönetemet szeretném kifejezni édesanyámnak, édesapámnak és egész családomnak támogatásukért, megértésükért, türelmükért és szeretetükért.