

## Záróbeszámoló

OTKA K75864

A "nitrogen monoxide-peroxinitrit-PARP útvonal" szerepe  
a krónikus sebek pathogenezisében

Témavezető: Dr. Szabó Éva, DEOEC Bőrgyógyászati Klinika

Pályázatunk átfogó célkitűzése a poli-ADP-ribozilációnak (PARiláció) és ezen belül különösen a oxidatív/nitrozatív stressz által stimulált PARilációnak a bőr élettani és kóros működéseinek szabályozásában betöltött szerepének vizsgálata. A dermatopathológián belül különösen a sebgyógyulási folyamatok álltak a pályázat fókuszában. Eredményeinket alprojektek szerint csoportosítva ismertetjük, melyek egy-egy megszületett vagy közlés alatt/előtt álló munkát fednek le. A már publikált vagy közlésre elfogadott munkákat kisebb, a közlésre előkészítés alatt lévőket nagyobb terjedelemben, ábrákkal illusztrálva mutatjuk be.

### 1. PARiláció normal bőrben és melanomákban

Vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozóan, hogy a PAR polimer előfordul-e normál humán bőrben. A PAR kimutatását immunhisztokémiai módszerekkel végeztük. PAR-t ki tudunk mutatni a normál bőr számos sejtjében, így a keratinocitákban, szebocitákban, haj folliculus sejtekben, endotheliális sejtekben, szubkután zsírsejtekben.

Vizsgáltuk a polimer jelenlétét a legagresszívabb bőrtumorban, melanomában. A melanoma sejtek PAR pozitívak voltak és a pozitivitás intenzitása korrelációt mutatott a tumor inváziós mélységével.

*Közlemény: 1 db közlésre elfogadott cikk:*

Géhl Zs, 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. HISTOLOGY AND  
HISTOPATHOLOGY &: p. &. (2012)  
IF: 2.502

### 2. PARiláció CHS-ben

Vizsgálatokat végeztünk CHS (kontakt hiperszenzitivitás) egérmodelljében a PARP gátló PJ34 hatásának vizsgálatára. A gyulladásgátló hatást részletesen jellemeztük: kemokin expresszió, metalloproteináz expresszió, sejt infiltráció. E munkánk folytatásaként knockout egértörzsek alkalmazásával kimutattuk, hogy a PARP-1 és nem a PARP-2 enzim játszik fontos szerepet a CHS reakcióban megfigyelhető gyulladásban

*Közlemények: 2 db cikk az első számú kísérletes dermatológiai lapban (J. Invest. Dermatol.)*

Bai P, Hegedűs C, Szabó É, Gyüre L, Bakondi E, Brunyánszky A, Gergely S, Szabó C, Virág L: Poly(ADP-ribose) polymerase mediates inflammation in a mouse model of contact hypersensitivity, J. Invest Dermatol., 129 (1): 234-8., 2009  
IF: 5.543

Brunyánszki A, Hegedus C, Szántó M, Erdélyi K, Kovács K, Schreiber V, Gergely S, Kiss B, Szabó E, Virág L, Bai P.: Genetic ablation of PARP-1 protects against oxazolone-induced

contact hypersensitivity by modulating oxidative stress., J. Invest Dermatol. 130(11):2629-37., 2010  
IF: 5.745

### **3. PARiláció egér sebgyógyulási modellben**

Egereken excíziós sebzési modellt állítottunk be, és vizsgáltuk a lokálisan alkalmazott PARP gátlószer PJ34 hatását. Meglepő módon a szer hatására a seb némileg gyorsabban gyógyult (1. ábra). Ugyanezt tapasztaltuk a PARP-1 hiányos állatokon is (1. ábra). A sebmintákból qPCR analízissel gyulladáshoz köthető mediátorokat határoztunk meg, melyekből néhányat az 1. ábrán mutatunk be. A sebekből szövettani vizsgálatokat is végeztünk PAR polimer és iNOS kimutatására. In vitro „scratch assayben” az NO donor vegyületek fokozták a keratinocyták proliferációját, míg a PARP gátlószer nem, sőt némileg lassították is a „sebzett” terület repopulációját.

Microarray vizsgálatot is végeztünk friss sebszélből származó kontroll, valamint sebzés után egy nap elteltével vett bőrminták génexpressziós profiljának összehasonlítására (6-6 db párhuzamos minta). Eredményeink alapján elmondható, hogy 326 gén expressziós szintjében történt változás, ezek közül 96 gén expressziója csökkent, míg 230 gén esetében az génkifejeződés fokozódását tapasztaltuk. Elvégeztük a kapott eredmények network analízisét is, mely alapján az előbbieken leírt expressziós különbségek közül 42 gén kapcsolatos valamilyen módon gyulladáshoz vezető folyamatokhoz, míg 20 gén hozható összefüggésbe a szöveti differenciációban szerepet játszó jelátviteli útvonalakkal.

*Közlemények: 1db várható közlemény (2012-es benyújtással)*

Tarek Hamoly, Csaba Hegedűs, Petra Lakatos, Katalin Kovács, Edina Bakondi, László Virág and Éva Szabó: PARP-1 regulates wound healing in mice. (előkészületben)

### **4. Oxidatív stresszmarkerek akut és krónikus human sebekben**

Összesen 37 beteg és kontroll személy mintáit vizsgáltuk, akik 18-86 év közöttiek voltak (18 nő és 19 férfi). A betegek közül 16 betegnek volt vénás eredetű ulcusa, 3 betegnek diabeteses ulcusa, 11 betegnek akut II. fokú égési sérülése (akut seb). Kontrollként 7 egészséges páciens mintáit használtuk fel. Sebfoltyadékot, szérumot gyűjtöttünk, illetve szövetszövetmintát a seb széli részéből azokban az esetekben, melyekben felmerült spinocelluláris carcinoma gyanúja, és a differenciál diagnózis miatt a mintavételre szükség volt. A szövetszövetminták kontrolljaként normál bőrt használtunk. A sebfoltyadékokban és a szérumokban nagyszámú oxidatív stressz-markert és gyulladáshoz köthető mediátort határoztunk meg. A szövetszövetmintákban poli(ADP-ribózt) és nitro-tirozint detektáltunk. A betegek klinikai adatait is feldolgoztuk: életkor, anamnézisben szereplő kóros tünetek, társbetegségek, ulcus kiterjedtsége, fennállásának ideje. A klinikai adatok és a laboratóriumi mérések között korrelációt kerestünk.

#### Eredmények

*Sebfoltyadékból és szérumból történt mérések:*

A következő paramétereket határoztuk meg: gyökfogó kapacitás három különböző módon (ABTS módszerrel, Amplex red assayben, Cuprac assayben), glutation (GSH), nitro-tirozin, LDH aktivitás (szövetszövetesítés), TBARS (lipid peroxidáció), protein karbonil (fehérje

oxidáció) VEGF, IL-8, TNF $\alpha$  (2. és 3. ábra). A citokinek/kemokinek szintje a szérumban mérés határ alatti, de a sebfolyadékokban mérhető volt. Az összes paramétert korreláltattuk egymással, a seb méretével és fennállási idejével. A korrelációt mutató paramétereket a 4. és 5. ábrán mutatjuk be.

*Szöveti vizsgálatok:*

- Tizenhat vénás eredetű ulcusból származó mintát vizsgáltunk meg. Intenzív nitro-tirozin festődést kaptunk az infiltráció területén a gyulladásos sejtekben, ami peroxinitrit jelenlétére utal (6. ábra)
- PARP-1 expressziót detektáltunk főleg a sebek széli részénél (6. ábra)
- A PARP aktivitást jelző PAR polimer detektálására végzett immunhisztokémiai vizsgálatok intenzív festődést mutattak a sebalapon és a sebszéleknél (6. ábra).

*Közlemények:*

Szabó Éva: Orvosi méz alkalmazása postthrombotikus szindróma talaján kialakult ulcus kezelésében, Sebkezelés, sebgyógyulás, a Magyar sebkezelő társaság folyóirata, 13 (1): 18-21, 2010

Várható közlemény (2012-es benyújtással)

Petra Lakatos, Katalin Kovács, Edina Bakondi, Csaba Hegedűs, Agnieszka Robaszkiewicz, Tarek Hamoly, Ingrid Oit, László Virág and Éva Szabó: Oxidative stress parameters in wound fluid and sera from patients suffering from chronic leg ulcer.

Eredményeinket konferenciákon is előadtuk (2009: ESDR Meeting, 2009: MDT Nagygyűlés).

#### **4. Egyéb vizsgálatok**

Kollaborációban vizsgáltuk a poli-ADP-ribosiláció szerepét a sejthalálban különös tekintettel a polimer katabolizmusát végző PARP enzim szerepére. Megállapítottuk, hogy a PARP csendesítése a PARP csendesítéshez hasonló módon befolyásolja az oxidatív stressz által kiváltott sejthalált: enyhe stresszben érzékenyít az apoptózissal szemben, erős oxidatív stresszben pedig véd az onkózissal szemben ld.

Vizsgáltuk a PARP-1 szerepét primer, humán keratinocyták UVB által kiváltott sejthaláljának szabályozásában. A potens és specifikus PARP gátlószer nem befolyásolták jelentősen a DNS hibajavítást és a sejthalált, míg a gyenge és nem specifikus inhibitor 3-aminobenzamid erős védőhatást fejtett ki, nyilvánvalóan PARP gátlástól független mechanizmussal.

*Közlemények: 1 megjelent + 1 benyújtott közlemény*

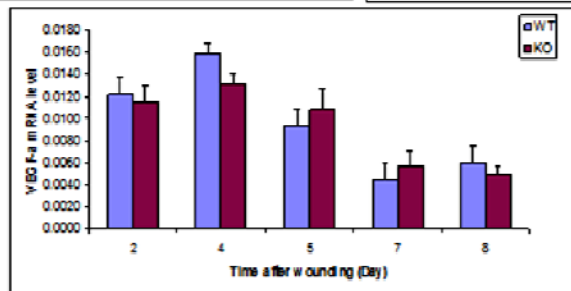
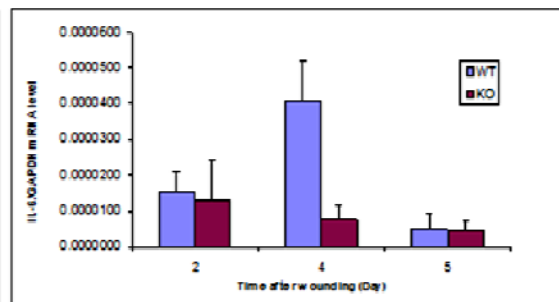
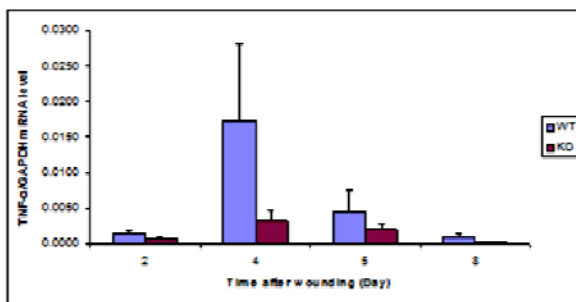
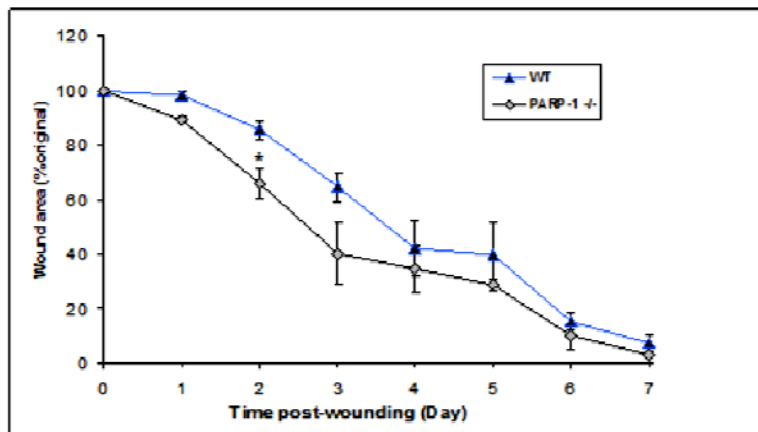
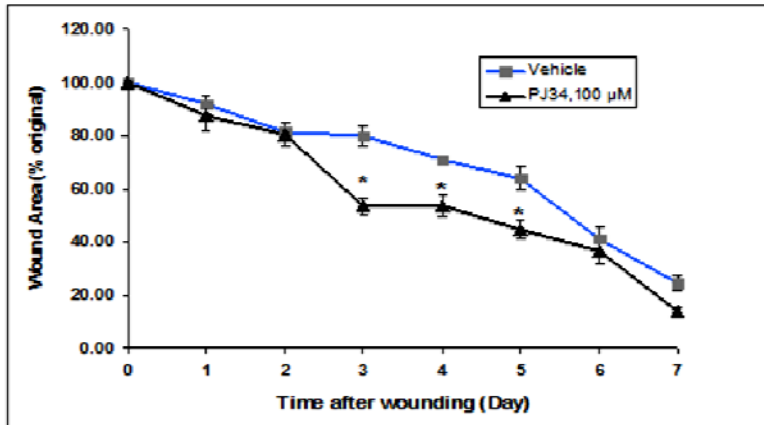
Erdélyi K, Bai P, Kovács I, Szabó E, Mocsár G, Kakuk A, Szabó C, Gergely P, Virág L.: Dual role of poly(ADP-ribos) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells., FASEB J. ;23(10):3553-63, 2009

Lakatos P, Szabó É, Hegedűs C, Gergely P, Bai P and László Virág L: Poly(ADP-ribosyl)ation regulates UVB-induced cell death in primary human keratinocytes. (közlésre beküldve)

## ÁBRÁK

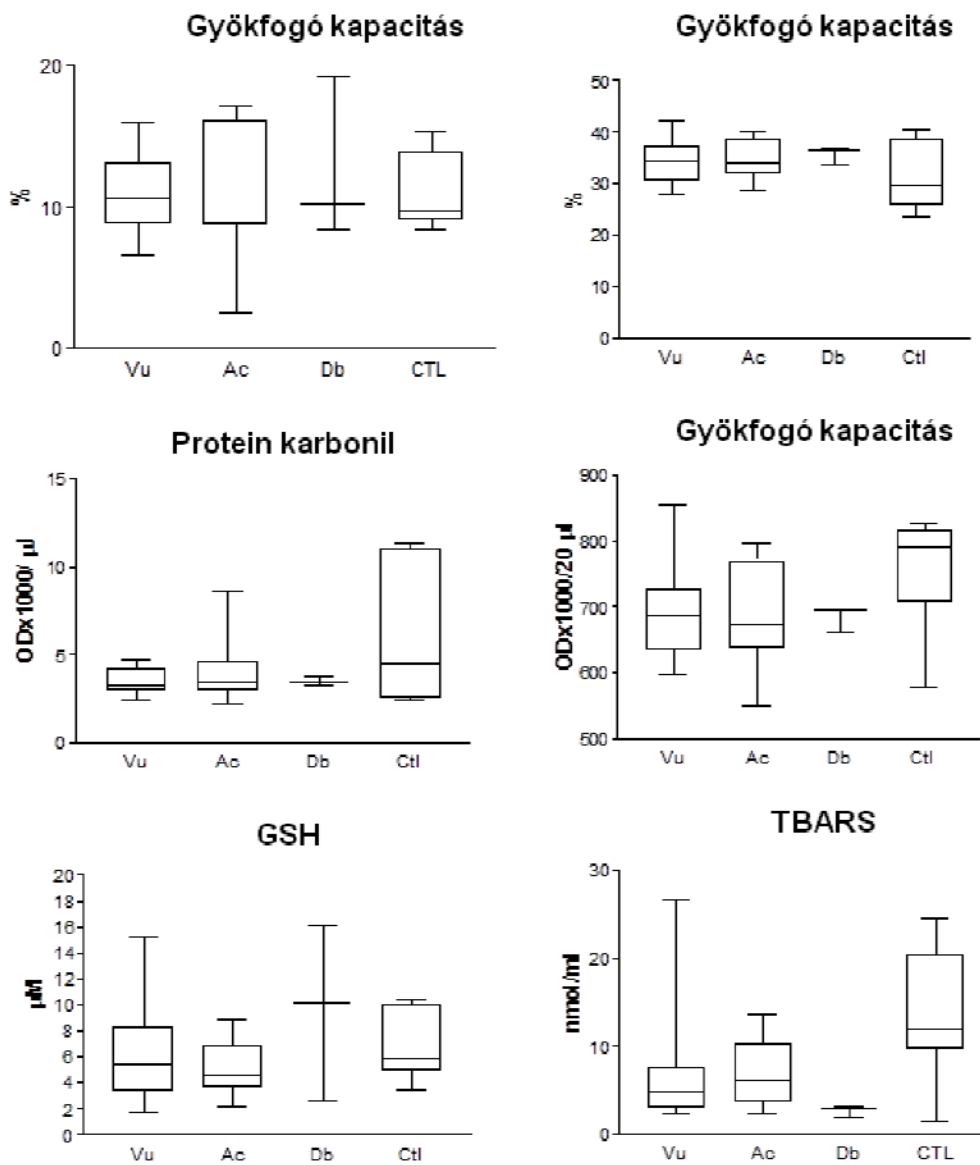
### 1. ábra PARiláció vizsgálata egér excíziós sebzési modellben

Megvizsgáltuk a lokálisan alkalmazott PARP gátló hatású PJ34 (felső panel) és a PARP-1 knockout fenotípus (második panel) hatását a sebgyógyulásra. Meglepő módon mindkét esetben gyorsult sebgyógyulást tapasztaltunk. A gyulladásos citokinek (TNF $\alpha$ , IL6) szintje csökkent a K.O. állatokban, míg más mediátorok (pl. VEGF) szintje nem mutatott különbséget (alsó hasábdiaagrammok).



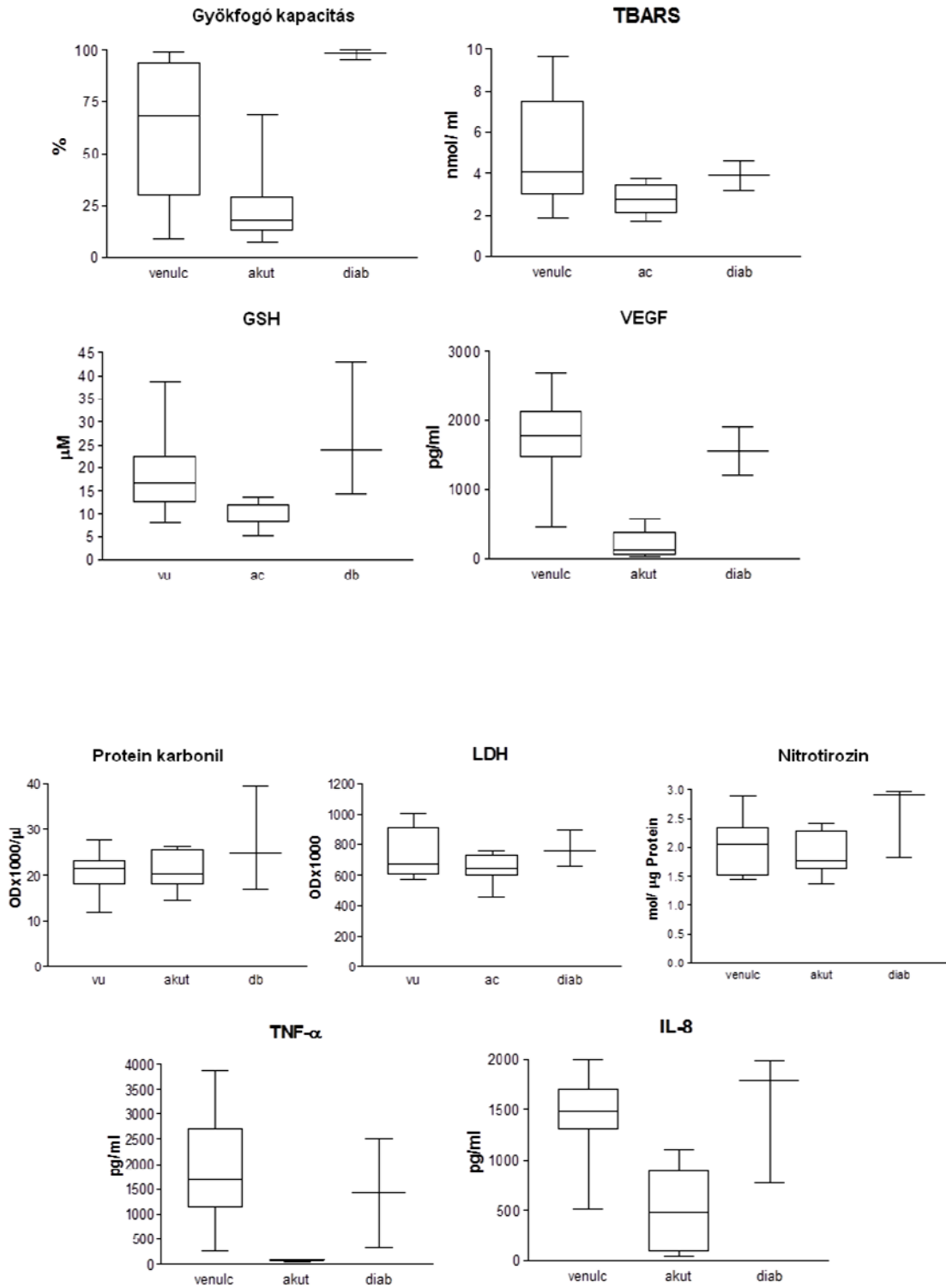
## 2. ábra Oxidatív stresszparaméterek és gyulladási mediátorok szérumban

Néhány oxidatív stresszparaméter és gyulladási mediátor szérumszintjének bemutatása krónikus (vu= vénás ulcus), akut (égés) és diabeteses (diab) sebek esetén. (CTL= kontroll)



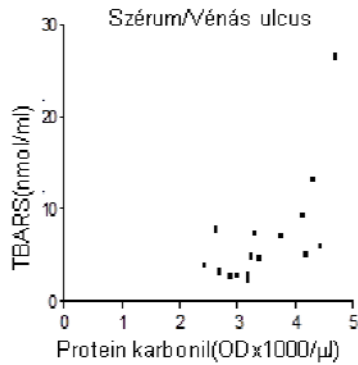
### 3. ábra Oxidatív stresszparaméterek és gyulladási mediátorok sebgyógyulásban

Néhány oxidatív stresszparaméter és gyulladási mediátor sebgyógyulásban mért szintjének bemutatása krónikus (vu= vénás ulcus), akut (égés) és diabéteses (diab) sebek esetén.

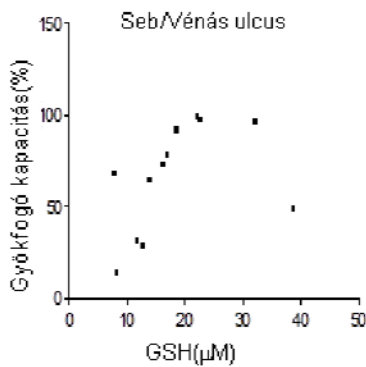


#### 4. ábra Laboratóriumi mérések korreláció-analízise

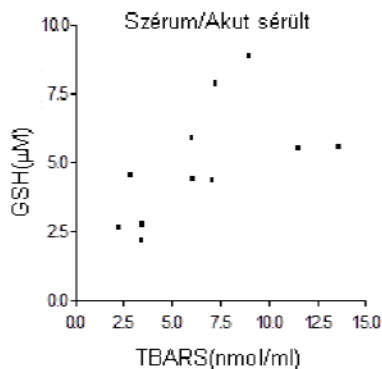
A mért oxidatív stresszparamétereket egymással korreláltattuk és a lent bemutatott párok esetén találtunk szignifikáns korrelációt.



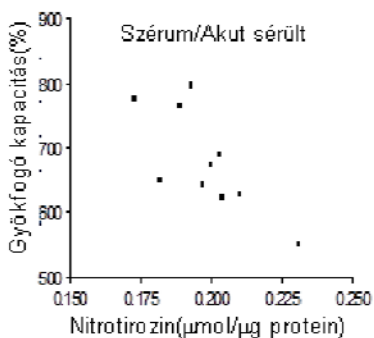
Number of XY Pairs	16
Spearman r	0.6196
95% confidence interval	0.1630 to 0.8576
P value (two-tailed)	0.0105
P value summary	*
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes



Number of XY Pairs	12
Spearman r	0.6224
95% confidence interval	0.05602 to 0.8857
P value (two-tailed)	0.0347
P value summary	*
Exact or approximate P value?	Exact
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes



Number of XY Pairs	11
Spearman r	0.6636
95% confidence interval	0.08546 to 0.9075
P value (two-tailed)	0.0306
P value summary	*
Exact or approximate P value?	Exact
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes



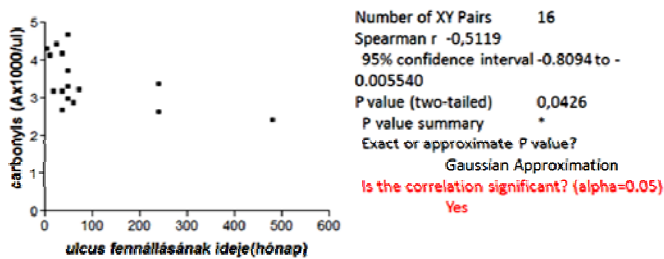
Number of XY Pairs	11
Spearman r	-0.7364
95% confidence interval	-0.9297 to -0.2250
P value (two-tailed)	0.0128
P value summary	*
Exact or approximate P value?	Exact
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes

## 5. ábra Laboratóriumi mérések és a seb klinikai paramétereinek (méret, fennállás ideje) korreláció-analízise.

Korrelációt találtunk égési sebek estén a cuprac assayvel mért antioxidáns kapacitás és az égés területe között. A krónikus sebek (ulcus) mérete a fehérjeoxidációval (karbonil) és a lipid peroxidációval (TBARS) mutatott korrelációt, míg az ulcus fennállási idejével a fehérjeoxidáció korrelált.

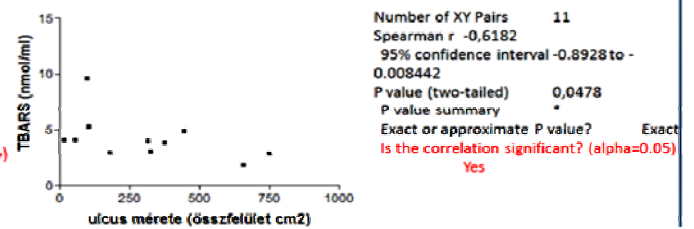
### I. VÉNÁS EREDETŰ ULCUS

#### 5. Ulcus fennállásának ideje (hónap) vs. Szérum Carbonyls (Ax1000/u)



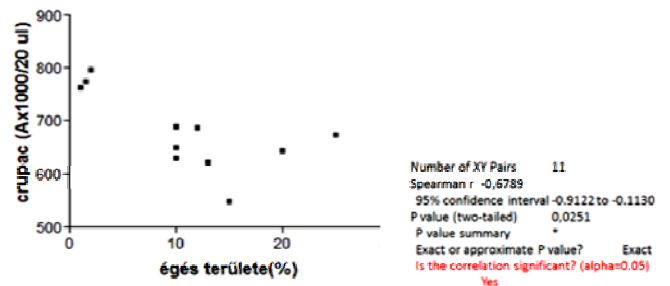
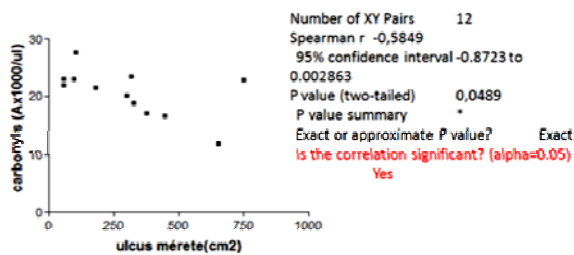
### I. VÉNÁS EREDETŰ ULCUS

#### 1. Ulcus mérete (összfelület cm<sup>2</sup>) vs. Sebváladék TBARS (nmol/ml)



### I. VÉNÁS EREDETŰ ULCUS

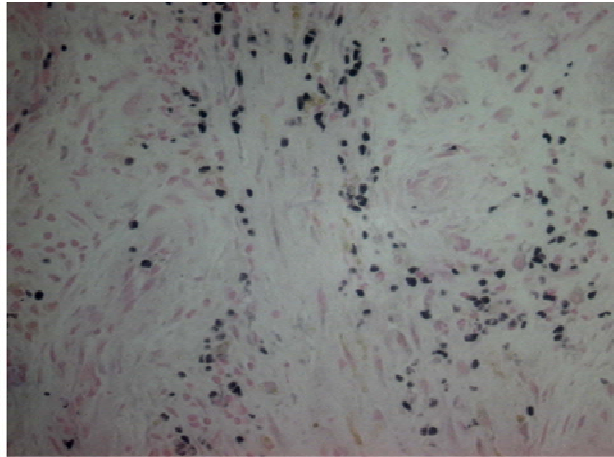
#### 7. Ulcus mérete (összfelület cm<sup>2</sup>) vs. Sebváladék carbonyls (Ax1000/u)



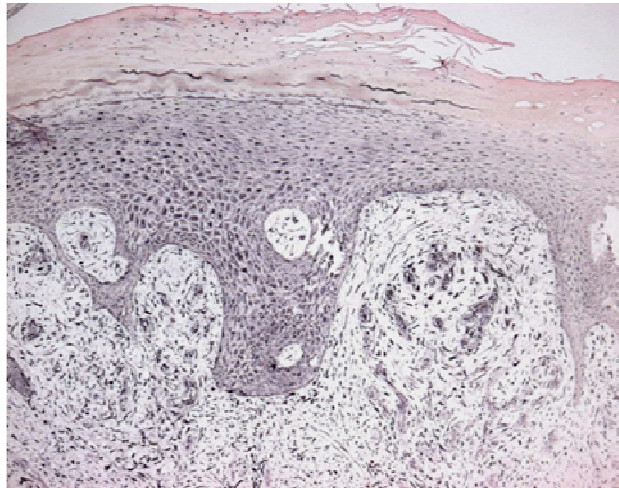


**6. ábra Nitrotirozin, PARP-1 és PAR kimutatása humán sebekben.**

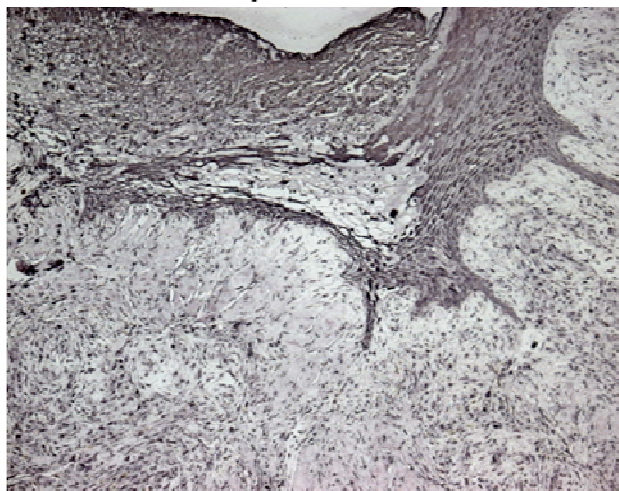
Nitrotirozin, PARP-1 és PAR polimer kimutatása immunhisztokémiai eljárással humán sebekben.



**Nitrotirozin poz. sejtek a sebalapon**



**PARP-1 expresszió a sebszélén**



**PAR polimer a sebalapon és a sebszélén**