

TUDOMÁNYOS HÁTTÉR, A KUTATÁS CÉLJA ÉS PROGRAMJA

Néhány évtizede világszerte feltűnően megsaporodott a napfény okozta, gyakran foglalkozási ártalomként jelentkező akut és krónikus bőrkárosodások, megbetegedések száma, beleértve a bőr malignus daganatait is. Ez egyrészt azzal hozható összefüggésbe, hogy a légkör védő ózonköpenyének változásai következtében földfelszínre jutó napfény mennyisége és minősége a 70-es évektől kezdve az egészségre kedvezőtlenül módosul, a spektrum egyre inkább a rövidebb hullámhosszak (UVB, UVC) irányába tolódik el. Másrészt a növekvő gyógyszer- és alkoholfogyasztás, valamint a nagyarányú kemizáció az iparban és a mezőgazdaságban kiszélesítették a fotokémiaailag aktív, esetenként rákkeltő vegyületek körét. Jelenlegi tudásunk szerint a kedvezőtlen biológiai hatásokért a napfénynek nemcsak az UVB sugártartománya (290-320 nm) tehető felelőssé, hanem a hosszuhullámú UVA spektrum (320-400 nm) is. A két spektrumsáv hatásmechanizmusa nem azonos és nem kellően ismert. A mára önálló szakterületté vált fotodermatológia alapvető problémája, hogy az emberi bőrben molekuláris, celluláris és target-szerv szinten mi és hogyan játszódik le a foton abszorpciója után, amíg a végeredmény, a bőrreakció megjelenik.

A DOTE Bőrklinikán 1963 óta folyik rendszeres fotodermatológiai kutatómunka, 1991 óta folyamatos OTKA támogatással. A tudományos kutatást többek között az tette indokoltá, hogy a Tiszántúl beteganyagában mindig nagyobb számban fordultak elő fotoszenzitív bőrbetegségek, mint az ország más területein (nagy napfény-intenzitás az Alföldön). Ezek egyike a fotoallergiás hátterű polymorph fény-exanthema (PFE), amely országoként változóan a lakosság 3-18%-át érinti. Hazai adatok ugyan nem állnak rendelkezésre, de a Tiszántúlon egy 2000-ben végzett epidemiológiai felmérésünkben (nem közölt adatok) a PFE-t a 18 és 24 év közötti korosztály ~10%-ában diagnosztizáltuk.

A debreceni Bőrklinika anyagában országos viszonylatban ugyancsak gyakoribbak a malignus bőrdaganatok is. A basaliomák száma például 1965 és 1995 között kétszeresére, a ma még többnyire letális kimenetelű melanoma malignum (MM) esetek száma pedig több, mint ötszörösére emelkedett, ami megegyezik nagy nemzetközi statisztikák adataival. A non melanoma (NM) bőrrákok keletkezésében pedig mind klinikailag, mind experimentálisan igazolt az UV sugártartomány szerepe, de ezt újabban az MM kialakulásában is feltételezik.

Mindezen kórképek és malignomák pathomechanizmusának számos kérdése tisztázatlan, kezelésük, de különösen prevenciójuk ma sem kielégítően megoldott. A 90-es évek elején alakult munkacsoportommal e témakörben elsősorban **sejt-és molekulárbiológiai**, valamint **genetikai vizsgálatokat** végeztünk, amelyekhez nagy segítséget nyújtottak a hazai és külföldi együttműködések, pályázati támogatások.

1/a A 2003-2006 közötti OTKA pályázati ciklusban kutatómunkánk folytatásaként összefüggéseket kívántunk keresni **az UV-fény okozta DNS-károsodások, reparációjuk**, elsősorban a többlépcsős enzimikus folyamat, a nukleotid exciziós reparáció (NER) **és az apoptosis** között annak tisztázására, hogy ezen folyamatoknak milyen szerepe van **a fotoszenzitív dermatosisok patomechanizmusában**, a fotoszenzitivitás kialakulásában. Ismert ugyanis, hogy a reparáció defektusa egyik oka lehet a fényérzékenységnek, mint az xeroderma pigmentosumban már igazolódott.

1/b Kutatómunkánk másik célja a **fotokarcinogenezis** komplex folyamatának tanulmányozása volt. Erre munkacsoportunknak a 90-es évek közepétől nyílt lehetősége részben pályázati támogatások révén, részben a külföldi tanulmányúton elsajátított modern módszerek meghonosítása segítségével, amelyek bizonyos tekintetben megsabták vizsgálataink irányát is. A jelen pályázati ciklusban egyrészt NM bőrrákokban az UV-fény genotoxikus hatását

tanulmányoztuk. Másrészt fel kívántuk mérni a NM bőrdaganatok egyéni rizikóját erre általunk kidolgozott tesztpanel segítségével.

2/ A mind mennyiségében, mind minőségében megváltozott természetes inszoláció egyre inkább indokoltá teszi az egészséges lakosság védelmét. A napfény-okozta korai és késői bőrkárosodások megelőzése érdekében, - beleértve a rosszindulatú bőrdaganatokat is, - szükséges volt a munkacsoportunk által korábban kifejlesztett **UVB-érzékeny, SUNTEST elnevezésű kémiai dosimeter-családot** új, egyszerhasználatos, **környezetbarát és egyszerűen kezelhető** termékekkel kibővíteni.

KONKRÉT TERVEK

Ad 1/a:

Egészséges egyénekből, majd fotoallergiás betegekből származó perifériás lymphocytákban az UV-fény okozta DNS-károsodás mértének és minőségének meghatározása, a NER lefolyásának időbeni nyomonkövetése comet assay-vel. A NER, a szemikonzervatív DNS-szintézis és az apoptózis tanulmányozása.

Ad 1/b/ :

Különböző exogén ko-karcinogének és az UV-sugárzás együttes hatásának vizsgálata. Egyéni tumor-rizikó meghatározására alkalmas tesztpanel kidolgozása preventív célra. A klinikánkon bevezetés előtt álló fotodinámiás terápiában (PDT) alkalmazott új fotoszenzibilizátorok fotobiológiai jellemzőinek vizsgálata a már említett sejt- és molekuláris biológiai módszerekkel.

Ad 2/

Az UV-B és az UV-A sugármérésre alkalmas új nanoszkópikus reaktorok (fényérzékeny nano-kompozitok), a PAMAM¹- és POPAM-típusú dendrimer polimerekbe zárt egyes fémionok (pl. ezüst: Ag(I)/Ag(0)- és vas-ionok: Fe(III)/Fe(II) alkalmazása az UV-sugárdózis meghatározására.

Kutatási feladatok a nanorészecskékre és a nanotechnológiára vonatkozóan:

Javasolt nanotechnológia: a reakcióban résztvevő fémionok meghatározott méretű és felületi tulajdonságú domainekbe zárása és a reakciók lejátszatása a domainek között.

A domain méretének növelése a vendégatomok méretének vagy számának növelésével.

A kutatási feltételek a résztvevők munkahelyén és kollaborációk révén adottak voltak. A komplex feladatok megoldását az biztosította, hogy a munkacsoport tagjai több szakterületet képviselnek.

¹ POPAM=poly(propilén-amin) dendrimer

[‡] PAMAM=poly(amido-amin) dendrimer

Anyag és módszerek:

UV sugárforrások:

nagy teljesítményű (800 W) UVA fényforrás(Saalman)
PUVA-kabin (Waldmann 8000)
TL01 és TL12 (Philips) UVB-fényforrások
Multitester (Saalman)
solaris simulator

Sejtenyésztés:

normál humán fibroblast, keratinocita, lymphocita;
betegekből (polymorph fényexanthema: PFE, xeroderma pigmentosum, preacancerosus állapotok, non-melanoma bőrrákok) származó fibroblast, keratinocita, lymphocita;
HaCaT spontán immortalizált keratinocita

Hisztopathológia

Micronucleus képződés

Az UV-irradiált sejtkulturákban a micronucleus képződést akkor értékeljük, amikor besugárzás után a legtöbb sejt már egyszer osztódott. Tárgylemezen fixálva a sejteket propidium-jodid festéssel az interfázisos sejtek citoplazmájában található micronucleusok mennyisége fluoreszcens mikroszkóppal értékelhető.

Comet assay

Az eukaryota sejtek szuszpenzióját tárgylemezen agaróz gélbe ágyazzuk. A sejtek citoplazmáját és a DNS-hez kötődő fehérjéket lizáló pufferben távolítjuk el, majd elektroforetizáljuk. DNS-hez kötődő fluorescens festékekkel jelezve a sejtmagok fluoreszcens mikroszkóp alatt komputer image analízis segítségével értékelhetők.

Uroporfirinogén-dekarboxiláz aktivitásmérés

Kószó F.: Br. J. Dermatol. 1992, 126: 446.

Paraoxonáz enzim aktivitás és koncentráció meghatározása

Paraoxon szubsztrát felhasználásával a keletkezett 4-nitrofenol koncentrációt mértük spektrofotometriával. Az enzim aril-észteráz aktivitás meghatározása is spektrofotometriás módszerrel valósult meg, fenilacetát szubsztrát felhasználásával, a hidrolizált termék detektálásával. A paraoxonáz enzim koncentráció meghatározása szérumból ELISA-val történt.

TBARS meghatározás

A lipidperoxidáció szintjét jelző plazma tiobarbitursav reaktív szubsztancia (TBARS) szintjét a humán plazma tiobarbitursavval történő inkubációja után n-butanol:pyridine extrakcióval az organikus fázis fotometráálásával határoztuk meg.

Valós idejű reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

Az in vitro sejtenyészetből RNS szeparálása, random hexamer primerrel RT-PCR, majd a cDNS amplifikálása CybrGreen és TaqMann módszerrel.

Az uroporfirinogén-dekarboxiláz, a haemochromatosis és a ferrokelatáz génmutációk detektálása

Perifériás vér mononukleáris sejtekből DNS szeparálása, az exonok amplifikálása primerpárok segítségével polimeráz láncreakcióval (PCR), majd a termékek tisztítása után minden egyes exon szekvenálása automata szekvenálóval. Az eredmények értékelése manuálisan és a Chromas programmal.

Adatarchiválás és feldolgozás

„Fotoderma” internetes keresőrendszer (saját fejlesztés).

Statisztikai analízis módszerek

Az adatokat PC felhasználásával Excel táblázat kezelő programban rögzítjük, és Statisztika for Windows szoftver segítségével (Student féle T próba) dolgozzuk föl. A comet assay computer image analízise az Isis szoftver segítségével történik, az adatokat a fentiekben leírt módon tároljuk és dolgozzuk föl a Man Witney testet alkalmazva.

A KUTATÁS EREDMÉNYEI

A négyéves periódusra tervezett programból a következőket valósítottuk meg, illetve az időközben adódott lehetőségeket (ösztöndíjas tanulmányutak, kollaborációk) kihasználva a következő vizsgálatokkal egészítettük ki:

I/ UV-fény okozta DNS-károsodások és reparációjuk (NER) vizsgálata

1/ A kutatási program első lépéseként az Intézetünkben korábban beállított comet assay módszert alkalmassá tettük az UV-sugárzás okozta DNS károsodás reparációja (NER) időbeni lefolyásának tanulmányozására. A vizsgálatokat egészséges egyének perifériás lymphocytáin végeztük. A legkifejezettebb reparációs aktivitás 30 perccel az UVB irradáció után következett be, azaz ez az időpont bizonyult optimálisnak a NER tanulmányozására. A sugárhatást követően 4 óra múlva a DNS károsodás csaknem teljes egészében reparálódott. A kísérletek eredményei egyben kontrollként szolgáltak a fényérzékenységben, illetve bőr-carcinomában szenvedő betegek (polymorph fény-exanthema: PFE, NM-bőrrákok) mintáin tervezett hasonló vizsgálatokhoz.

2/ Az UVB irradáció DNS-re kifejtett effektusát in vitro tenyésztett humán immortalizált keratinocytákon (HaCaT sejtek) is tanulmányoztuk. A különböző UV dózisokra bekövetkezett DNS károsodás nyomon követését ebben a vizsgálatsorozatban is comet assay-vel végeztük. Az assay alkalmasnak bizonyult normál humán keratinocytákban is a NER tanulmányozására. Ezek az előkísérletek betegekből származó keratinocytákkal tervezett vizsgálataink módszertani begyakorlására szolgáltak. A kapott eredmények kiértékelésével párhuzamosan 2004-ben összegeztük azon vizsgálataink eredményeit is, amelyekben az UV-sugárzás DNS-károsító hatásának kémiai anyagok okozta módosulását tanulmányoztuk. A különböző koncentrációjú formaldehid expozíció NER-t gátló és kromozómakárosodást fokozó effektusára vonatkozó új adatok Dr. Emri Gabriella az évben summa cum laude megvédett Ph D téziseinek egyik fejezetét képezték, illetve megjelentek az „Experimental Dermatology” folyóiratban. A kísérletsorozat részletei előző OTKA pályázatunk (T 016133) zárójelentésében található.

3/ Időközben kialakult kollaborációs lehetőségeinket felhasználva a DE OEC Immunológiai intézetével együttműködve a korábban elsajátított RT-PCR módszerrel HaCaT sejtekkel más irányú, további előkísérleteket is végeztünk. A vizsgálatok célja annak tisztázása volt, hogy a citokin termelést befolyásoló un. CATERPILLAR molekulacsalád egyes tagjainak expresszióját befolyásolja-e az UV-irradáció. A fehérjecsalád ugyanis az immunológiai folyamatok szabályozása révén patogenetikai szerepet tölthet be az UV-fény effektusával kapcsolatos allergiás, gyulladós, illetve daganatos kórképekben. 2006-ban a következő eredményeket kaptuk: UVB irradáció után a CATERPILLAR molekulák expressziója down-regulálódik mind a HaCaT, mind a normál humán keratinocytákban, azonban az expresszió mértékének visszatérése a korábbi (normális) szintre különböző a két sejtfeleségben. A sugárhatást követően a keratinocyták IL-1béta és TNF-alfa termelésének időbeni változása mutatható ki a sejtenyészet felülészójában. Az eredmények arra utalnak, hogy a bőr keratinocytáiban a CATERPILLAR fehérjecsalád tagjainak szerepe lehet az UVB besugárzást követő sejtválasz kialakításában. A beállított módszer segítségével a jövőben egészséges, illetve PFE-s, valamint bőrtumoros betegekből származó bőrbioopsziás anyag sejtjeiben tervezzük tanulmányozni a CATERPILLAR fehérjék expressziója és a citokinváltozások közti összefüggést.

4/ Ismert, hogy a DNS-t ért károsodások gén-expresszió változást eredményezhetnek, ami a mRNS szint megváltozásával jár. A továbbiakban HaCaT sejteken UVB besugárzás után a **peroxisoma proliferátor-aktivált receptor (PPAR)** expresszáldását tanulmányoztuk valós idejű reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR). Előkísérleteinkben normalizálónak cyclophilin gént használtunk, amit a PPAR alacsony expressziós szintje indokolt. Miután az irodalomban nem találtunk adatot arra, hogy UV irradiációt alkalmazva mely gén vagy gének optimálisak normalizálás céljára, a továbbiakban tervezzük több housekeeping gén expresszióját is meghatározni különböző UVB dózisokat alkalmazva, majd különböző időpontokban izolálva az RNS-t. Ezzel párhuzamosan a sejtek DNS-károsodását comet assay-vel vizsgáltuk. qRT-PCR-rel kimutattuk, hogy a HaCaT keratinocytákon alacsony szinten a PPAR alfa, beta és gamma mRNS is expresszáldik. A legalacsonyabb az alfa expressziója, a legmagasabb a gammáé, összhangban az irodalmi adatokkal. Első eredményeink szerint UVB besugárzás hatására mindhárom PPAR szintje csökken.

5/ Egy további kollaborációban (DE OEC I. Belgyógyászati klinika) comet assay-vel hyperlipidaemiás betegek perifériás lymphocytáiban tanulmányoztuk a hidrogén-peroxid indukált DNS károsodást, amelynek mértékét összevetettük a betegek szérumának paraoxonáz aktivitásával, illetve egyéb, a szervezet oxidatív statusát jellemző paraméterekkel. A II/a típusú 16 beteg és a 7 egészséges személy mintáiban nyert eredmények arra utaltak, hogy a hyperlipidaemiás betegek lymphocytáiban az oxidatív stressz hatására nagyobb mértékű DNS károsodás mutatható ki a kontrollokénál, melyben szerepet játszhat az antioxidáns kapacitás csökkenése. Tartós (6 hónapos) Atorvastatin kezelés (10 mg/nap) mellett in vivo nő a hyperlipidaemiás betegek vérének antioxidáns kapacitása és csökken a lymphocyták DNS károsodása. Eredményeink igazolják a gyógyszernek az oxidatív DNS károsodásra gyakorolt gátló hatását, melynek hátterében a paraoxonáz aktivitást emelő effektus, valamint az oxidatív folyamatok gátlása állhat.

A pályázat munkatervében szereplő további vizsgálatokra, azaz az UV-fény okozta DNS-károsodás és reparáció, valamint az apoptózis tanulmányozására fotoszenzitív dermatosisokban nem volt módunk, mivel a témával foglalkozó munkatársunk, Dr. Simics Enikő 2004-től családi okok miatt (szülés, gyermekgondozás) jelenleg sem dolgozik.

Az évek óta prosperáló hazai és az újabban kialakult nemzetközi kooperációk viszont lehetővé tették, hogy tovább bővítsük ismereteinket a szintén fokozott fényérzékenységgel kísért **cutan porphyriákban**, amelyek kialakulása jól példázza az örökletes és a környezeti faktorok együttes jelentőségét. A kórképek patogenetikai és genetikai hátterének vizsgálata biokémiai, biológiai és molekuláris genetikai módszerekkel történt.

A hazánkban leggyakoribb **porphyria cutanea tarda**ban (PCT) a tünetek kialakulásához genetikai fogékonyság mellett a legtöbb esetben egyéb provokáló faktorok is szükségesek. Ezzel kapcsolatosan 2004-ben az általunk gondozott 29 betegünkkel részt vettünk egy multicentrikus hazai tanulmányban, amelyben a hereditær haemochromatosis gén (HFE) mutációi és a hepatitis C vírus szerepét, mint provokáló tényezőt tanulmányoztuk PCT-ben. Megállapítottuk, hogy a génmutáció (C282Y) és a HCV pozitivitás nagy valószínűséggel független rizikófaktora a betegségnek.

Az elmúlt években rendkívül ritka familiaris PCT-t diagnosztizáltunk 3 testvéren, akiknek karakterisztikus klinikai tünetei gyermekkorban kezdődtek. A részletes porfirin analízis és az enzimaktivitás mérés szegedi kollaborációban történt (Dr. Kószó F.). A kórlefolyás és a laboratóriumi vizsgálatok alapján a diagnózis (PCT?, hepatoerythropoeticus

porphyria?) nem volt egyértelmű. A genetikai vizsgálat, amely a barcelonai Bőrgyógyászati klinikával (Prof. M. Lecha) kialakult együttműködés révén valósult meg, ritka compound heterozigóta mutációt mutatott ki a probandok UROD génjén. Az egyik nukleotid eltérés (az 1. exon 19. nukleotidján A>G tranzíció) eddig az irodalomban még nem közölt új missense mutáció. A másik mutációt (703C>T P235S) korábban két, egymással rokonsági kapcsolatban nem álló olasz családban azonosították, mint a betegségért felelős mutációt. A J. Exp. Clin. Dermatol.-ba benyújtott publikációban (közlés alatt) arra is rámutattunk, hogy a PCT egzakt diagnózisának felállításához esetenként szükséges lehet a DNS szekvenálás, a molekuláris genetikai vizsgálat is.

A cutan porphyriák hazánkban előforduló másik leggyakoribb típusa az **erythropoeticus protoporphyria (EPP)**, amelyet a ferrokelatáz autoszóm dominánsan öröklődő defektusa okoz. A pályázati időszakban lehetőségünk nyílt e kórképben a már 10 éve elkezdett genetikai vizsgálatok folytatására. A klinikánk fotodermatológiai szakrendelésén gondozott 23 betegünk és családtagjaik közül Varga Viktória munkatársunk (korábban Ph D hallgató) 2006 végéig 10 beteg DNS mintáiban térképezte fel az öröklött enzimdefektus hátterében álló lehetséges génmutációkat. 9 betegben az 1. intronban „single nucleotid polymorphism”-ként azonosítható eltérést, 4 betegben a fehérjeszerkezetben bekövetkezett missense mutációt (pY160C), 1 betegben exon skipping mutációt talált, 3 betegben az 1. intronban további verifikációt igénylő szekvencia eltérést észlelt.

B/ A fotokarcinogenezis tanulmányozása

Kutatómunkánkat a karcinogenezis komplex folyamatának tanulmányozása céljából mintegy 10 éve kezdtük. Korábbi vizsgálataink folytatásaként egyik célkitűzésünk egy olyan laboratóriumi vizsgálati tesztpanel kialakítása volt in vivo és in vitro vizsgálatokból, amely egy szűkebb populáció mintáit felhasználva alkalmas szélesebb körű biokémiai fenotípus meghatározásra, azaz alkalmas az egyéni tumor-rizikó meghatározására. Jólismert klinikai tény ugyanis, hogy bár a NM bőrtumorok kialakulásának egyik legfontosabb környezeti faktora a napsugárzás UVB spektruma, az azonos napfény expozíciónak kitett egyéneken nem azonos gyakorisággal keletkeznek tumorok. Az egyéni érzékenység igen különböző. Ezért további vizsgálatainkban fel kívántuk mérni a szöveti, sejt, molekuláris és genetikai eltérésekben jelentkező különbözőségeket. Ezek alapján a későbbiekben a klinikailag fokozott rizikót sejtető populációból kiszűrhetjük a magas rizikójú egyéneket, akik esetében fokozott prevenciót javasolunk és valósítunk meg.

A távlati cél megvalósításához első lépésként a NM bőrdaganatban szenvedő betegek fotodermatológiai anamnézisének felvétele és részletes klinikai/hisztológiai vizsgálata történt. A retrospektív vizsgálathoz a Bőr- és Nemikórtani Klinikán 1998.06.29. és 2004.02.12. között NM bőrdaganat miatt műtéti kezelésben részesült és szövettani diagnózissal ellátott betegek adatait dolgoztuk fel, amelyeket az általunk kifejlesztett „Fotoderma” internetes keresőrendszer segítségével elemeztünk. A statisztikai értékelést az Excel 6.0 programmal végeztük. A 1734-ből álló, tanulmányozott beteganyagban a férfiak és nők aránya közel 1:1 volt, átlag életkoruk 70 év (22-100 év között). Hisztológiai vizsgálat alapján 2786 daganatból 2621 tumor bizonyult NM bőrdaganatnak, amelyből 90% basalsejtes carcinoma, 10% laphámsejtes carcinoma volt. Mind ezek a saját, mind az összehasonlításként elemzett Nemzeti Rákregiszter adatai emelkedő incidenciáról tanúskodnak.

Multiplex NM bőrtumort a betegek 26 %-ában találtunk. A multiplex basaliomák miatt kezelt betegeknél 2-18 daganat fejlődött ki, spinaliomás betegeknél 2-5 tumor, a vegyes

csoporthoz 2-17 tumor. A multiplex daganatok többségét 6 hónapon belül fedezték fel. A betegek negyedében kifejlődött multiplex tumorképződésben genetikai fogékonyságnak és környezeti hatásoknak egyaránt szerep tulajdonítható. Ezen utóbbi betegek közül egy random kiválasztott 60 tagú csoportban felmértük a napozási szokásokat és az esetleges karcinogének szerepét a tumorképzésben. A kérdőívet kitöltő betegek kontrollvizsgálatát DNS mintára történő vérvétellel kötöttük össze. Az eredmények rámutattak irodalmi adatokkal korrelálva, hogy ez a beteg populáció további felvilágosítást és intenzívebb gondozást igényel (egyharmaduk például továbbra is napozik, 20%-uk nem védi magát a naptól, 60%-uk dohányzik, stb.) A jelen statisztikai feldolgozás megteremti a lehetőségét a multiplicitás okainak további vizsgálatára. A DNS minták elemzése folyamatban van.

Az UV-fény terhelés kérdőíves felmérése az „egészséges” lakosság körében (300 személy) az előbbi Excel program segítségével arra hívta fel a figyelmet, hogy a magyar lakosság fokozott kockázatnak van kitéve napozási szokásai, szolárium igénybevétele, illetve lokális fényvédő készítmények használata alapján, és ugyancsak rendszeresebb felvilágosítást igényel elsősorban a bőrtumorok intenzívebb prevenciója érdekében.

Vizsgálataink harmadik csoportjában új fotoszenzibilizátorok fotobiológiai jellemzőit kívántuk tanulmányozni a már említett sejt- és molekuláris biológiai módszerekkel, amelyeket a külföldön mintegy 20 éve bevezetett fotodinámiás terápiában (PDT) alkalmaznak. Sajnálatos módon ez a modern kezelési eljárás Intézetünkben csak 2006-ban valósult meg, így a tervezett vizsgálatokat nem volt módunkban elvégezni.

OTKA T043451 pályázat közreműködői összesített szakmai beszámolója a 2003-2006.-ban végzett kutatásokról:

Sejt- és molekuláris biológiai vizsgálatok az ultraibolya-fény okozta dermatosisokban és bőrtumorokban. Nanoszkopikus reaktorok kutatása a kémiai aktinometriában a prevencióban

A 3., 4. és 5. generációs, azaz G3-,G4- és G5-dendrimer (poliamidoamin-borostyánkősav, PAMAM-SACOOH) alapú UV-dózismérő K+F-hez szükséges alapkutatásokat a következő témákban végeztük el:

1. G3-,G4- és G5-dendrimer–ezüst(I) komplexek egyensúlyi vizsgálata:

Meghatároztuk a dendrimerek Y_i ezüst-komplekképző kapacitáit:

$$Y_i = \frac{n(Ag^+ - E_i)}{n(E_i)}$$

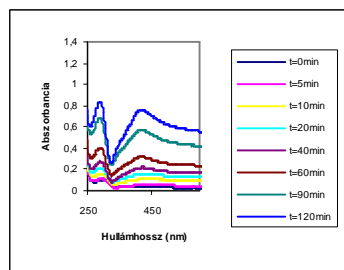
ahol E_i a G_i -PAMAM-SACOOH dendrimert, $n(Ag^+ - E_i)$ az ezüst-komplex és $n(E_i)$ a dendrimer mennyiségét jelöli. A K_i^H értékek a dendrimerekben lévő az elektronpár donoratomok protonálódási állandói.

E_i	$\lg K_i^H$ (terc-N)	$\lg K_i^H$ (COOH)	terc-N száma (elméleti)	$Y_i = \frac{n(Ag^+ - E_i)}{n(E_i)}$
E3	6,80 ($\pm 0,02$)	4,48 ($\pm 0,01$)	30	10,1
E4	7,00 ($\pm 0,03$)	4,67 ($\pm 0,03$)	62	21,4
E5	6,94 ($\pm 0,02$)	4,50 ($\pm 0,02$)	126	45,9

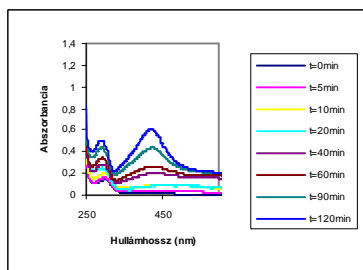
Megállapítottuk, hogy a vizsgált dendrimerek Y_i ezüst-komplekképző kapacitásai az elméletileg várható értékeknél (tercier-nitrogén atomok száma/2) kb. 25%-kal kisebbek.

2. G3-,G4- és G5-dendrimer–ezüst(O) nanokompozitok UV-VIS jellemzése:

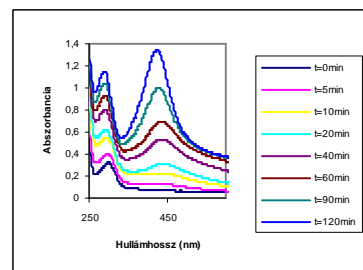
Az UV fény besugárzás hatására a G3-,G4- és G5- dendrimer –ezüst(I) rendszerben elszíneződés figyelhető meg. A szín mélyülése a G3-,G4- és G5-



$$c_{E3}=1,1 \cdot 10^{-4} M; c_{AgNO_3}=1,7 \cdot 10^{-3} M;$$



$$c_{E4}=1,1 \cdot 10^{-4} M; c_{AgNO_3}=3,6 \cdot 10^{-3} M;$$



$$c_{E5}=1,1 \cdot 10^{-4} M; c_{AgNO_3}=7,3 \cdot 10^{-3} M;$$

dendrimer–ezüst(O) nanokompozitok keletkezésével értelmezhető, és arányos a besugárzás idejével, azaz (állandó fényintenzitás mellett) a besugárzó fény dóziséval. A látható tartományban (szabad szemmel is) észlelhető fényelnyelés a

nagy méretű Ag(O)-fémklaszterekhez, az ultraibolya tartományban észlelhető fényelnyelés a kis méretű Ag(O)-fémklaszterekhez rendelhető plazmon-átmenetekkel értelmezhető. Az adott kísérleti körülmények között 180 perc UV fény besugárzást követően nem változott tovább a szín intenzitása (telítési értéket ért el).

3. G5-dendrimer –ezüst(O) nanokompozitok ESR-spektroszkópiás jellemzése:

Semleges, vagy enyhén bázikus vizes oldatban a G5-dendrimer –ezüst(O) nanokompozit nagyon gyenge ESR-jelet ad, ami arra utal, hogy a szabad gyök ezüst atomok közelében lévő tercier nitrogén donoratomok gyökfogó jellegűek. Savas (pH<3) közegben, amikor a tercier nitrogén donoratomok teljes mértékben protonáltak, az ESR-jel megjelenik, azaz a tercier nitrogén donoratomok gyökfogó jellege protonált állapotban sokkal gyengébb, esetleg eltűnik. A G3-,G4- és G5-dendrimerek gyökfogó jellegének bizonyítását elvégeztünk.

4. G3-,G4- és G5- dendrimerek gyökfogó sajátosságainak tanulmányozása:

A G3-,G4- és G5- dendrimerek gyökfogó jellegének bizonyítására egy standard módszert, a BSA oxidatív átalakításának G3-,G4- és G5- dendrimerek általi gátlását használtuk fel. A BSA-ban a protein karbonil-csoportok jelentős növekedését eredményezik a nagy energiájú (80 krad) ⁶⁰Co-gamma besugárzás hatására a víz radiolízise során keletkező OH[•]-gyökök. Az oxidatív átalakulást a BSA-oldathoz adott gyökfogók (pl. a tercier nitrogén donoratomot tartalmazó dialkil-etanolamin) az OH[•]-gyökök befogásával gátolják. A dialkil-etanolamin gyökfogókhöz hasonlóan a G3-,G4- és G5- dendrimerek hatásos gyökfogók.

dendrimer típusok	[dendrimer] 10 ⁻⁶ M	karbonil (nmol) /fehérje (mg)	védőhatás %
G3-PAMAM-SACOOH	5	20,76	77,8
G4-PAMAM-SACOOH	5	25,18	73,1
G5-PAMAM-SACOOH	5	41,41	55,8

A védőhatás a gyökfogó hatásosság mértéke, ami a G3>G4>G5 irányban változik.

5. Dendrimer –ezüst(I), illetve dendrimer –ezüst(I)-vas(III) UV dózismérők

érzékenységének összehasonlítása: A 2. pontban megadott kísérleti körülmények között a szín intenzitása a G3-,G4- és G5- dendrimer –ezüst(I) rendszerben 180 perc UV fény besugárzást követően már nem változott tovább, azaz telítési értéket ért el.

A G3-,G4- és G5- dendrimer –ezüst(I)-vas(III) rendszerben (megegyező kísérleti körülmények között) már 5 perc UV fény besugárzást követően kialakult a telítési érték. A G3-,G4- és G5- dendrimer –ezüst(I) dózismérő rendszerrel nagy (a napozásnál fellépőnél 1-3 nagyságrenddel nagyobb) UV-dózist, a G3-,G4- és G5- dendrimer –ezüst(I)-vas(III) dózismérő rendszerrel a napozásnál várható UV-dózist lehet mérni. A G3-,G4- és G5- dendrimer –ezüst(I) rendszerek 2 nagyságrenddel kevésbé érzékenyek az UV-fényre, mint a G3-,G4- és G5- dendrimer –ezüst(I)-vas(III) rendszerek.

6. A dendrimer pszeudo-fázis oldatkémiai jellemzése: A G3-, G4- és G5- dendrimer pszeudo-fázis oldatkémiai, kombinált spektrofotometriás és potenciometriás pH-méréseken alapuló jellemzését szélesebb pH-tartományra kiterjesztettük. Megállapítottuk, hogy vizes oldatokban a G3-PAMAM dendrimer makroligandum jellegű, a G5-PAMAM dendrimer pszeudo-fázis jellegű, a G4-PAMAM dendrimer pedig átmenetet képvisel a homogén (egyfázisú) és heterogén (kétfázisú) jelleg között. A dendrimerek vizes oldatban várható méretének és a dendrimer pszeudo-fázis víztartalmának fényszórás fotometriás méréseken alapuló felderítését elvégeztük.

7. A dendrimer-ezüst(I)

komplexekben található

Ag(I)ionok ● molekulán

belüli helyének NMR-

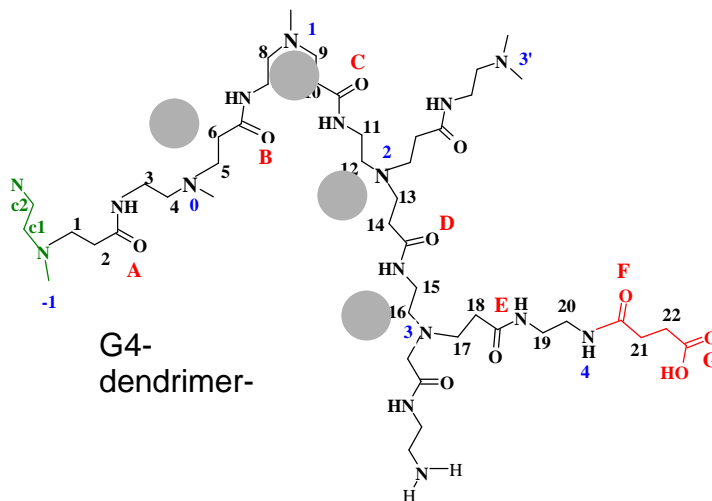
spektroszkópiás mód-

szerral felderítésének

eredménye: Az Ag(I)ionok

a terciér-N környezetében

találhatók.



AZ EREDMÉNYEK FELHASZNÁLÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI

Az UV-irradiációt követő DNS-károsodás vizsgálata az alapkutatásban a dermatológia számos területén ígéretes és perspektivikus. Így például egyes fotoallergiás kórképek patomechanizmusának tisztázásában, az immunmodulációban, a bőr karcinogenezisében.

Az alkalmazott assay-k, módszerek egyszerűsége, gyorsasága alapot ad olyan további kutatások tervezésére, melyek környezeti tényezők és a DNS-károsodás, valamint a DNS-reparáció összefüggéseit, illetve az egyéni fogékonyság kiszűrését (pl. cutan porphyriákban, familiárisan halmozódó bőrtumorok esetén) célozzák meg.

A genetikai kutatások eredményei cutan porphyriákban, de bőrtumorokban is részben az érintett családokban az öröklésment pontos feltárásában és ezzel a megalapozott diagnózis felállításában, valamint a genetikai tanácsadásban segítenek, részben lehetővé teszik párhuzam vonását a klinikai kép és a genetikai eltérés között. Ennek a prevencióban, a mutációt hordozók kiszűrésében és a rizikótényezők fokozott elkerülésében van jelentősége.

Az új környezetbarát UV-dosimeter-család kifejlesztése közelebb visz az egész lakosságot érintő profilaxisuk hatékony stratégiájának kialakításához.

Kutatómunkánk jól kapcsolódott a résztvevő kutatóhelyek, intézetek és tanszékek Ph D programjaihoz. A négyéves periódus alatt Dr. Emri Gabriella (DE OEC Bőrklinika) 2004-ben summa cum laude minősítéssel Ph D fokozatot szerzett a pályázati témában végzett tudományos munkája alapján. Két másik munkatársunk (Bőrklinika) Ph D, illetve MTA doktori tézisei beadás előtt állnak. Emellett a résztvevő kutatóhelyeken számos diplomamunka született és előadás hangzott el diákköri konferenciákon a téma egy-egy részletének kidolgozása kapcsán.