

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2940.

BALÁZS KATALIN BETTINA

Molekuláris és experimentális onkológia
című program

Programvezető: Dr. Bödör Csaba, egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Lumniczky Katalin, osztályvezető főorvos

Sugárterápia szerepe a szisztémás immunválasz rövid- és hosszútávú modulálásában fej-nyaki és prosztata daganatos betegekben

Doktori értekezés

Balázs Katalin Bettina

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lumniczky Katalin, PhD, osztályvezető főorvos

Hivatalos bírálók: Dr. Hideghéty Katalin, Ph.D., habilitált egyetemi tanár
Dr. Huszty Gergely Dénes, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Hegyesi Hargita, Ph.D, egyetemi docens

Tagok: Dr. Pesznyák Csilla, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Fintha Attila, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2023

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	9
1.1. Az ionizáló sugárzás fajtái és hatásai	9
1.1.1. A sugárzás biológiai hatása és elsődleges célpontja a sejtben.....	9
1.1.2. Kromoszóma-aberrációk	10
1.1.3. Determinisztikus és sztochasztikus hatások	11
1.1.4. Kis dózisu sugárzás hatásai	12
1.2. Daganatellenes kezelések típusai.....	12
1.2.1. Immunterápia a daganatgyógyításban	13
1.2.2. Sugárterápia a daganatgyógyításban	13
1.2.2.1. Teleterápia	14
1.2.2.2. Alacsony (LDR) és magas dózisirátájú (HDR) brachyterápia	14
1.2.2.3. Kiber-kés (CyberKnife) terápia.....	15
1.2.3. Az ionizáló sugárzás hatása a daganatsejtekre	15
1.3. Veleszületett immunrendszer feladata és sejtjes elemei.....	17
1.3.1. Monociták, makrofágok.....	17
1.3.1.1. Prostatata specifikus antigén (PSA) fagocitózisa	19
1.3.2. Dendritikus sejtek (DC; Dendritic Cell).....	19
1.3.3. Természetes ölösejtek (NK; Natural Killer).....	21
1.4. Adaptív immunrendszer feladata és sejtjes elemei.....	21
1.4.1. Naiv, effektor és regulátor T limfociták (Treg).....	22
1.4.2. A T limfociták immunológiai kimerülése és szenescens állapota	24
1.4.3. Memória T-sejt alpopulációk.....	25
1.4.4. B limfociták, plazma sejtek, memória B sejtek.....	26
1.5. Sugárterápia hatása az immunrendszer sejtjeire.....	27
1.6. Sugárzás indukálta fibrózis kialakulása.....	28
1.7. Fej-nyaki és prostatata daganatok kialakulása, előfordulási gyakoriságuk.....	28
2. Célkitűzések	30
3. Módszerek	32
3.1. Fej-nyaki és prostatata daganatos betegek klinikai paraméterei, sugárterápiás kezelésük	32
3.1.1. Betegek sugárkezelés utáni nyomon követése.....	34

3.1.2. Korban és nemben illesztett kontrol páciensek vizsgálatba vonása	34
3.2. Perifériás vér begyűjtése, PBMC és plazma minták izolálása.....	34
3.3. Prostatata daganatos betegek plazma PSA-szintjének hosszú távú nyomon követése	35
3.4. Prostatata daganatos betegek akut és krónikus gasztrointesztinális és genitourinális mellékhatásainak monitorozása.....	35
3.5. Prostatata daganatos betegek perifériás limfocitáiban kialakult kromoszóma sérülések vizsgálata	36
3.6. Génexpressziós, fehérje és sejt szintű vizsgálatok	36
3.6.1. Perifériás vérsejtek gén expressziós profiljának vizsgálata, RNS izolálás és reverz transzkripció	37
3.6.1.2. Kvantitatív valós idejű polimeráz-lánreakció (qRT-PCR)	37
3.6.2. Nagy áteresztőképességű fehérje vizsgálat protein-array módszerrel	37
3.6.2.1. Vérplazma fehérjék validálása ELISA módszerrel	38
3.6.3. Növekedési faktorok és proinflammatorikus kemokinek vizsgálata vérplazmából LegendPlex módszerrel.....	38
3.6.3.1. Vérplazma fehérjék validálása ELISA módszerrel	40
3.6.4. PBMC-k feldolgozása, az immunsejtek jellemzése áramlási citometriás módszerrel	40
3.6.5. Immunfenotipizálási panelok tervezése, izotípus és fluoreszcencia mínusz egy (FMO) kontrollok alkalmazása.....	42
3.6.6. Fenotipizálási panel rendszerek felépülése.....	43
3.6.6.1. Monociták és PSA+ makrofágok kapuzása	44
3.6.6.2. Mieloid és limfoid eredetű dendritikus sejtek kapuzása.....	44
3.6.6.3. Természetes ölüsejtek és funkcionális alcsoportjainak kapuzása.....	45
3.6.6.4. Osztódó természetes ölüsejtek kapuzása	46
3.6.6.5. A T limfocita alcsoportok kapuzása	47
3.6.6.6. Szuppresszív T limfociták kapuzása.....	47
3.6.6.7. Osztódó regulátor T sejtek kapuzása	49
3.6.6.8. Kifáradt T limfociták kapuzása	49
3.6.6.9. Aktivált és szenescens T limfociták kapuzása.....	50
3.6.6.10. Naiv és memória T limfociták kapuzása	51

3.6.6.11. B limfociták és funkcionális alcsoportjainak kapuzása	53
3.6.6.12. Mieloid eredetű szuppresszor sejtek kapuzása	54
3.6.7. Statisztikai vizsgálatok	55
3.6.8. Etikai engedélyek	56
4. Eredmények	57
4.1. A fej-nyaki daganatos betegek eredményei.....	57
4.1.1. A betegek klinikai paraméterei.....	57
4.1.2. Perifériás vérsejtek gén expressziós profiljának vizsgálati eredményei.....	58
4.1.3. A vérplazma fehérjeprofil vizsgálatának eredménye protein array technikával.....	60
4.1.4. A protein array validálása ELISA technikával	60
4.1.5. A veleszületett és adaptív immunrendszer sejtselemeinek változása	62
4.1.5.1. CD4+ T limfociták és FoxP3+ regulátor T limfociták változása	62
4.1.5.2. T limfociták funkcionális integritásának és proliferációs kapacitásának változása	63
4.1.5.3. Mieloid és limfoid eredetű dendritikus sejtek változása	67
4.1.5.4. Mieloid eredetű szuppresszor sejtek változása.....	68
4.2. Prostatata daganatos betegek eredményei	68
4.2.1. A betegek klinikai adatai	68
4.2.2. A betegek akut és krónikus GI és GU mellékhatásai, IPSS és QoL tesztek eredményei.....	69
4.2.3. Az alacsony dóziszrátájú brachyterápiában (LDR) részesült prostatata daganatos betegek első eredményei.....	70
4.2.3.1. A vérplazma fehérjeprofil vizsgálatának eredménye LegendPlex technikával.....	70
4.2.3.2. A CD4+ T limfociták és FoxP3+ regulátor T limfociták változása	72
4.2.3.3. T limfociták funkcionális integritásának és proliferációs kapacitásának változása	72
4.2.4. A négy prostatata daganatos betegcsoport veleszületett és adaptív immunstátuszának összehasonlítása	76
4.2.4.1. Monocita alcsoportok változása	76
4.2.4.2. PSA+ makrofágok változása	77

4.2.4.3. Plazma PSA és a makrofág PSA szintjének összehasonlítása.....	78
4.2.4.4. A plazma PSA és makrofág PSA szintje közötti korreláció.....	80
4.2.4.5. Mieloid és limfoid eredetű DC-k változása.....	81
4.2.4.6. NK sejtek és alcsoportjaik változása	82
4.2.4.7. Osztódó NK sejtek változása.....	86
4.2.4.8. A teljes limfocita csoport, illetve a CD3+, CD4+ és CD8+ T limfocita alcsoportok változása.....	88
4.2.4.9. CD4-CD8- dupla negatív T limfociták változása.....	92
4.2.4.10. CD3+ és CD3- T limfociták arányának változása.....	93
4.2.4.11. CD4+FoxP3+, CD4+CD127 ^{alacsony} /-CD25 ^{magas} és a CD8+FoxP3+ fenotípusú regulátor T sejtek változásának összehasonlítása.....	94
4.2.4.12. CTLA4+ T limfociták és regulátor T sejtek változása.....	97
4.2.4.13. Osztódó T limfociták változása.....	100
4.2.4.14. Osztódó regulátor T sejtek változása.....	101
4.2.4.15. Kifáradt T limfociták változása.....	103
4.2.4.16. Aktivált és szenescens T limfociták változása.....	105
4.2.4.17. A kromoszóma sérülések száma és az immunfenotípus változások közötti összefüggések vizsgálata.....	110
4.2.4.18. Memória T limfociták változása.....	111
4.2.4.19. B limfociták és alcsoportjaik változása.....	112
5. Megbeszélés.....	115
6. Következtetések.....	132
7. Összefoglalás.....	135
8. Irodalomjegyzék.....	137
9. Saját publikációk jegyzéke.....	155
10. Köszönetnyilvánítás.....	157

Rövidítések jegyzéke

AMR.....	Akut mukozális reakció
APC	Antigén prezentáló sejt
APC	Allofikocianin
AUA	Amerikai Urológiai Társaság
CTLA4.....	T-limfocita antigén-4
CD.....	Cluster of Differentiation
CDK1	Ciklin-dependens kináz 1
CCR	C-C kemokin receptor
DC/FDC.....	Dendritikus sejt/ Follikuláris dendritikus sejt
DNS	Dezoxiribonukleinsav
ELISA.....	Enzimhez kötött immunszorbens vizsgálat
EORTC.....	Daganatkutatás és Kezelés Európai Szervezete
FBS	Magzati borjú savó
FMO	Fluoreszcencia mínusz egy
FoxP3.....	Forkhead box P3
GI.....	Gasztrointesztinális
GS	Gleason score
Gy	Gray
GU	Genitourinális
HDR.....	High-dose-rate
HSC	Hematopoetikus őssejt
MAPK.....	Mitogén-aktivált protein kináz
MDSC.....	Mieloid eredetű szuppresszor sejt
MFI.....	Medián fluoreszcencia intenzitás
MHC	Fő hisztokomatibillitási komplex
HIV	Humán Immundeficiencia-Vírus
HPV	Humán Papillóma Vírus
NNGYK.....	Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központ
NK	Természetes ölüsejt
nTreg.....	Természetes regulátor T sejt

Ir-192	Iridium 192-es izotóp
I-132	Jód 132-es izotóp
IPSS	Nemzetközi Prosztata Tünetek Pontszám
iTreg	Indukált regulátor T sejt
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon gamma
IARC.....	Rákkutatás Nemzetközi Ügynöksége
KCl	Kálium-klorid
LDR	Low-dose-rate
LINAC	Lineáris gyorsító alapú terápia
LNT	Lineáris, küszöbdózis nélküli modell
LPS	Lipopoliszacharid
OOI.....	Országos Onkológiai Intézet
OD	Optikai denzitás
PBMC	Perifériás vér mononukleáris sejt
PBS	Foszfát pufferes sóoldat
Pd-103.....	Palládium 103-as izotóp
PD1	Programozott sejthalál fehérje-1
PE	Fikoeritrin
PFA.....	Paraformaldehid
PSA.....	Prosztata specifikus antigén
qRT-PCR	Kvantitatív valós idejű polimeráz-láncreakció
RNS	Ribonukleinsav
RTOG	Sugárterápiás Onkológiai Csoport
SASP.....	„Senescence-activated Secretory Phenotype”
SB	Staining buffer
SEB.....	Staphylococcal Enterotoxin-B
TCR/BCR	T sejt receptor/ B sejt receptor
TGF- β	Transzformáló növekedési faktor béta
TNF- α	Tumor nekrozis faktor alfa
Th.....	Helper T sejt
Treg.....	Regulátor T sejt

1. Bevezetés

1.1. Az ionizáló sugárzás fajtái és hatásai

Az ionizáló sugárzás olyan energiaközlés, amely semleges közegben képes a vele kölcsönhatásba lépő atomokat gerjeszteni, vagy róluk elektront leszakítva ionizálni, ezáltal pedig töltéssel rendelkező részecskéket (ionokat) létrehozni. Az élő szervezetre hatással lévő sugárforrásokat feloszthatjuk eredetük szerint (természetes, mesterséges) és az élő szervezethez viszonyított helyzetük szerint (külső és belső sugárforrások). A természetes eredetű háttérsugárzást az emberi tevékenység közvetlenül nem befolyásolja, magába foglalja a galaktikus és szoláris kozmikus sugárzást, illetve a természetes, földkérgi eredetű radioaktív izotópok sugárzását. Mesterséges eredetű sugárforrások azok, amelyeket az emberi tevékenység hoz létre. A mesterséges eredetű sugárexpozíció legnagyobb része az orvosi diagnosztikából és a sugárterápiás kezelésekből származik, amelyek száma az utóbbi évtizedekben rohamosan megnőtt (Brenner and Hall 2007). Az orvosi sugárforrásokhoz sorolhatóak a röntgendiagnosztikai vizsgálatok, az izotópdiagnosztika és radiofarmakonok, a sugárterápiás eljárások (teleterápia, brachyterápia, radioizotóp kezelés). A sugárforrások helyzetük szerinti csoportosítása alapján külső sugárterhelésnek nevezzük, ha a sugárforrás az emberi szervezeten kívül van, míg a belső sugárterhelés során a levegőből vagy a tápláléklánc elemein keresztül a sugárforrás a szervezeten belülré kerül (Thorne 2003).

1.1.1. A sugárzás biológiai hatása és elsődleges célpontja a sejtben

Egyszeri fiziko-kémiai folyamattal kezdődik a sugárzás és az élő anyag közötti kölcsönhatás. Sejtbe hatolva a sugárzás atomokat és molekulákat gerjeszt, illetve ionizál. Ez az állapot nagyon instabil, azonban molekulák közötti kölcsönhatások révén viszonylag stabil termékek kialakulásához vezet. Direkt a hatás, ha a sugárenergia elnyelődése és a kiváltott elsődleges folyamat ugyanazon a molekulán jön létre, illetve indirekt, ha különbözőkön, vagyis a változás egyik molekuláról a másikra tevődik át. Utóbbira példa az olyan sugárzás, amelynek hatására előbb a vízben (sejtek nagy víztartalma miatt) keletkeznek nagy reakcióképességű szabad gyökök (az elektronok kölcsönhatásba lépnek a vízmolekulákkal), majd ezek másodlagos reakcióik útján a biológiailag aktív molekulák átalakulását, károsodását okozzák. Szabad gyök olyan

atom, amelynek külső elektronhéján egy páratlan spin elektron van, emiatt nagyon reaktív. A gyökreakció során a szerves molekulákból is képződhetnek szabad gyökök, így egy reakciósorozat is beindulhat, amelynek eredményeképpen maga a DNS, illetve a membrán többszörösen telítetlen zsírsavmolekulái károsodnak (Riley 1994, Anker and Shriev 2009).

1.1.2. Kromoszóma-aberrációk

Gyakorlatilag bármelyik sejtalkotót károsíthatja az ionizáló sugárzás (például sejtmembrán, mitokondrium), azonban sokszorosán bizonyított tény, hogy a sugárzás sejten belüli elsődleges célpontja az örökítőanyag, a DNS. Sugárhatásra többféle DNS károsodás is kialakulhat, ilyen az egyláncú, vagy kétláncú DNS-törés, bázis-károsodás, bázis-vesztés, két lánc denaturációja, a DNS két lánc közötti intramolekuláris keresztkötések, illetve a DNS-fehérje keresztkötések kialakulása (Ward 1988). A sugárkárosodást szenvedett sejtek sorsát alapvetően az befolyásolja, hogy a következő sejtosztódás előtt ki tudják-e javítani a DNS sérülésüket. Azonban az intenzíven osztódó sejtekben (például vérbérendszertől őssejtek) a ki nem javított kettős lánctörésekből származó letört DNS darabok nem kerülnek át az utódsejtekbe, az általuk kódolt összes genetikai információ elveszik. A nagymértékű információhiány következtében a sejtek nagy része az osztódást követően elpusztul. Ezzel magyarázható az osztódó sejtek fokozott sugárérzékenysége, illetve a nyugalmi állapotban lévő sejtek sugárrezisztenciája. A sejtek egy kis hányada a kialakult mutációk ellenére életben marad és a génhibáikat osztódás során tovább örökíthetik az utódsejtekbe (Foray, Arlett et al. 1997, Helleday, Lo et al. 2007, Vignard, Mirey et al. 2013).

A letális kromoszóma-aberrációk közé a dicentrikus és a gyűrű alakú kromoszómák tartoznak, amelyek mindegyike kétláncú DNS törések hibás javításából származik. A letális kromoszóma-aberrációk száma függ az ionizáló sugárzás dóziséjától. Kisebb dózisok esetén az összefüggés lineáris, míg nagyobb dózisoknál a hatás a dózis négyzetével arányos. Az egyén sugárterhelése becsülhető a perifériás vér limfocitáinak kromoszóma-aberrációiból, a limfociták megfelelő tenyésztése és metafázisban való sejtciklus blokkolása után (erről bővebben a 3.5. fejezetben lesz szó) (Chadwick and Leenhouts 1998, Senthamizhelvan, Pant et al. 2007).

1.1.3. Determinisztikus és sztochasztikus hatások

Szervezeti szinten az ionizáló sugárzásnak két biológiai, egészségügyi hatását különítjük el, ezek az eleve elrendelt, determinisztikus, és a véletlenszerű, vagyis sztochasztikus hatások. A determinisztikus hatások egy bizonyos küszöbdózis felett biztosan be fognak következni, és súlyosságuk a dózis nagyságával nő, kialakulásuk oka pedig a sugárzás okozta nagyfokú sejtpusztulás. Kis dózisú sugárzás esetén is történik kismértékű sejtpusztulás, azonban a küszöbdózis alatt nem jelentkezik semmilyen szervezeti szintű hatás. Ha a sejtpusztulás mértéke elér egy olyan szintet, amely az adott szerv működését már jelentősen befolyásolja, akkor szervezeti szintű tünetek jelentkeznek. Ide sorolhatóak a klasszikus sugárbetegség tünetcsoportjai (vérképző rendszeri-csontvelői szindróma, gyomor-bél rendszeri szindróma, agyi-érrendszeri szindróma), amelyek az elszenvedett dózis függvényében, egy küszöbdózis felett alakulnak ki. Továbbá a lokális besugárzás hatására kialakuló akut sugársérülések is ide tartoznak, melyek a krónikus sugárdermatitis, szürkehályog, vagy a magzatot érő különböző teratogén elváltozások (Fry 2001).

A sztochasztikus hatásokon a daganat, illetve az öröklődő megbetegedések kialakulását értjük, vagyis statisztikai valószínűség szerint megjelenő hatások ezek. A hatás kialakulásának valószínűsége az elszenvedett dózis nagyságával arányos (minél nagyobb az elszenvedett sugárdózis, annál nagyobb valószínűséggel alakul ki sztochasztikus hatás), azonban a már kialakult hatás (például daganatképződés) súlyossága már nem függ a dózis nagyságától. Küszöbdózisuk nincs, tehát a lehető legkisebb sugárdózis is kiválthat sztochasztikus hatásokat, amelyek a besugárzást követően akár évekkel, évtizedekkel később jelennek meg. Így a sugárvédelem alapvető törekvése ezen kockázatok minimalizálása és a sugárterhelés mértékének a lehető legalacsonyabb szintre való szorítása. A sztochasztikus hatások kialakulásának hátterében az ionizáló sugárzás okozta genom instabilitás és mutációk megjelenése áll. Ezen hatások közé tartozik a daganatok keletkezése, illetve az öröklődő megbetegedések kialakulása (Rajaraman, Hauptmann et al. 2018, Domina and Kopylenko 2022).

1.1.4. Kis dózisú sugárzás hatásai

A kis és nagy dózisok közötti határ máig vitatott a sugárbiológiában, azonban a nemzetközi szakirodalomban megállapodás szerint a 100 mGy dózis alatti tartományt tekintjük kis dózisoknak. A sztochasztikus hatások jellemzésére és a sugárvédelemben a dóziskorlát meghatározására a lineáris, küszöbdózis nélküli modellt (LNT) alkalmazzák. A modell szerint már egyetlen, alacsony energiájú és intenzitású sugárforrásból származó részecske is elegendő lehet ahhoz, hogy sugárzás indukálta daganatot okozzon az exponált személyben (Boice 2017). Azonban újabb kutatások eredményeképpen a lineáris összefüggésen túl további három modell is elképzelhetővé vált. Ilyen a sugárzás kis dózisú tartományában mérhető hiperszenzitivitáson alapuló, nem lineáris modell, amely az LNT modellhez képest magasabb kockázatot jósol. További lehetséges modell a küszöbdózis modell, amely szerint egy bizonyos dózis alatt nincs kockázata a sugárzásnak. A negyedik, hormesis modell szerint a kis dózisú sugárzás előnyös, hasznot tulajdonít annak. A különböző modellek jól mutatják, hogy – a nagy dózissal ellentétben – a kis dózisok biológiai hatásai kevésbé egyértelműek, olykor ellentmondásosak, ezért is vizsgáljuk a sugárbiológiai kutatások középpontjában áll (Doss 2013, Costantini and Borremans 2019).

1.2. Daganatellenes kezelések típusai

Az onkológiában a daganatterápia egyik leghatékonyabb módja a lokális sugárterápia. A sugárterápia legfontosabb feladata a daganatos sejtek, szövetek elpusztítása (citotoxikus hatás kifejtése) úgy, hogy a környezetükben lévő ép szövetek a lehető legkisebb mértékben károsodjanak, azok dózisterhelését minimalizálja. Fontos azonban megemlíteni, hogy a legtöbb daganattípus esetében a kezelés multimodális, melyben a sugárterápia mellett műtéti megoldásnak, a kemoterápiának, célzott terápiáknak és az immunterápiának egyaránt fontos szerepe van, illetve ezeket gyakran kombináltan kell alkalmazni. A terápia eredményessége a daganat típusától és előrehaladottságától függően többféle lehet, elérhető teljes gyógyulás is, azonban az esetek egy részében remissziót követő lokális kiújulás és áttétképződés is bekövetkezhet. Ilyen esetekben (ha a salvage műtét nem végezhető el) és a betegnél korábban már teljes dózisú irradiáció történt, akkor az ismételt sugárkezelés során leadható dózis már korlátozott (a kumulatív dózisok okozta szövődésmennyiség kockázata)

minimalizálása miatt) (Abusaris, Storch et al. 2011, Abusaris, Hoogeman et al. 2012, Janvary, Ferenczi et al. 2018).

1.2.1. Immunterápia a daganatgyógyításban

Fontos kiemelni, hogy a fent említett hagyományos daganat kezelési módok mellett az utóbbi két-három évtizedben egyre nagyobb hangsúlyt kap a daganatellenes kezelés ötödik pilléréként számontartott immunterápia, amelynek során a beteg a saját immunrendszerének aktiválása révén képes a hatékony tumor pusztításra. Az úgynevezett daganatellenes vakcinák esetében *ex vivo* az adott tumor antigén ellen „betanított” DC-k fokozzák a tumorelles immunaktivitást, azonban magas eszközigénye miatt alkalmazása kevésbé terjedt el (Bol, Schreibelt et al. 2019). Az immunterápiák másik csoportját az immunellenőrzőpont-gátlók képezik, amelyek a negatív immunszabályozás gátlásán alapulnak. Közülük is elsősorban a daganat általi T sejt szuppressziót megszüntető mechanizmusok bizonyulnak a leghatékonyabbnak (Nagasaki, Ishino et al. 2022). A későbbiekben részletesen bemutatott immunfenotipizálási vizsgálataink során a már ismert T-limfocita antigén-4 (CTLA4) és a programozott sejthalál fehérje-1 (PD1) immunfék receptorok vizsgálatán túl egyéb, a T sejtek felszínén expresszálandó gátló, vagy épp aktiváló receptorok vizsgálatára is fókuszáltunk.

1.2.2. Sugárterápia a daganatgyógyításban

A daganatgyógyítás tehát egy komplex, több tudományterület szakmai tudását igénylő szegmense a gyógyászatnak, ahol azonban a folyamatosan fejlődő, egyre célzottabb terápiák mellett a sugárkezelés mindmáig az egyik alappillére a daganat gyógyításnak. A sugárterápiás eljárásokat az alkalmazott sugárforrás élő szervezethez képesti elhelyezkedése alapján két fő kategóriába sorolhatjuk, ezek a közel- és távolbesugárzási eljárások. A vizsgálatainkba bevont fej-nyaki és prosztatata daganatos betegek kezelésére ma már több alternatív közel- és távolbesugárzási eljárás is rendelkezésre áll, amelyek hatékonysága hasonló, azonban az immunrendszerre gyakorolt hatásuk eltérő lehet. Ennek köszönhetően lehetőségünk nyílt a különböző besugárzási protokollok immunrendszerre gyakorolt hatását vizsgálni és

összehasonlítani a túlélő betegekben. A következő alfejezetekben röviden ismertetem a leggyakrabban alkalmazott sugárterápiás eljárások típusait.

1.2.2.1. Teleterápia

A teleterápia, avagy „távolbesugárzás” a testtől bizonyos távolságra elhelyezett (külső) sugárforrásból történő kezelés. Többféle berendezés használata is bekerült a gyakorlatba hosszabb-rövidebb időre. Az első ilyen gépek a röntgenkészülékek voltak, majd kobalt- és cézium ágyúk, amelyek a nevüket az alkalmazott mesterséges radioizotóporól kapták. Míg a cézium ágyúk használata nem terjedt el, addig kobaltágyúkat ma is használják a daganatterápiában. Ugyanakkor napjainkban egyre elterjedtebbé válnak és átveszik a sugárzó izotópok alkalmazásán alapuló technológiák helyét az úgynevezett lineáris gyorsítók. Ezek a részecskegyorsítók egy változatát képviselik, amellyel elektromosan töltött részecskéket (például elektronokat, protonokat, pozitronokat) képesek egyenesvonalú pályán gyorsítani. Leggyakrabban az elektronnyalábokkal előállított röntgensugárzást alkalmazzák a daganatos betegségek kezelésére (Friedman 1992, Friedman 2008).

1.2.2.2. Alacsony (LDR) és magas dózisirátájú (HDR) brachyterápia

A brachyterápia, avagy „közelbesugárzás” esetében a sugárforrást az élő szervezeten belülre, testüregekbe helyezik applikátorok segítségével, vagy a szövetekbe szúrják erre alkalmas tűk felhasználásával (Zaorsky, Davis et al. 2017). A nagy dózisteljesítményű (HDR; high-dose-rate) brachyterápia során afterloading (utántöltő), robotikusan vezérelt technikát alkalmazzák, amely pár perces kezelést jelent, majd a sugárforrást eltávolítják a szervezetről. Ennek során leggyakrabban irídium-192-es izotópot (Ir-192) használnak (Mate, Gottesman et al. 1998). A kis dózisteljesítményű (LDR; low-dose-rate) brachyterápia esetében úgynevezett seed-et alkalmaznak, amelyek permanens sugárforrásként a beteg testében maradnak (életük végéig), és folyamatosan fejtik ki daganatroncsoló hatásukat. Fontos kiemelni, hogy a mi vizsgálati rendszerünkben ez a terápia típus testesíti meg az alacsony dózisu sugárterhelést, hiszen a teljes dózis (145 Gy) nagyon lassan, körülbelül egy év alatt kerül leadásra a prosztata szövetébe. Leggyakrabban alkalmazott permanens sugárforrások a jód-132-es (I-132) és a palládium-103-as (Pd-103) izotópok (Marcus, Jani et al. 2010).

1.2.2.3. Kiber-kés (CyberKnife) terápia

A kumulatív dózisok minimalizálásához rendkívül hasznos lehet a napjainkban egyre elterjedtebb sztereotaxiás sugárkezelési forma, az úgynevezett Kiber-kés (CyberKnife), amely rendkívül precíz, célzott sugársebészeti technológia, az ép szövetek nagyfokú védelmét biztosítja. A kezelés hazánkban is elérhető 2018 óta (Ma, Wang et al. 2017, Janvary, Ferenczi et al. 2018).

1.2.3. Az ionizáló sugárzás hatása a daganatsejtekre

A daganatok sugárzással szembeni érzékenységét számos tényező befolyásolja, ebből adódóan eltérő módon reagálnak a sugárterápiára. Ilyen tényezők a daganatot felépítő egyes sejtek sugárérzékenysége, a daganat mikrokörnyezetében lévő hipoxia és annak mértéke, a sugárterápia utáni reoxigenizáció foka, valamint a tumorsejtek osztódási kinetikája, amely egyben megszabja repopulációjuk gyorsaságát is. Továbbá a tumoros mikrokörnyezet talán legnagyobb jelentőséggel bíró tagjai az immunrendszer különböző sejtjei, amelyek befolyásolják és meghatározzák a lokális gyulladást, illetve a daganatellenes immunválasz típusát és mértékét (Lumniczky and Safrany 2016). Ebben a fejezetben ismertetem a sugárzás daganatsejtekre kifejtett hatását, majd az immunrendszer sejtjeinek rövid bemutatása (1.3. és 1.4. fejezetek) után kitérek a sugárzás immunrendszerre kifejtett hatásaira (1.5. fejezet).

Sugárzás hatására a daganatsejtek a legtöbbször nem pusztulnak el azonnal, hanem több sejtosztódást követően késői, a mitózisban bekövetkezett hiba következtében kialakuló úgynevezett mitotikus katasztrófa („mitotic catastrophe”) következtében pusztulnak el. Ez az apoptózistól független sejthalálformája (mint ahogyan az autofágia és a nekrozis is) (Okada and Mak 2004). A sejtosztódás során a G2 fázis ellenőrzőpontja nem működik (CDK1; ciklin-dependens kináz 1 működésében bekövetkezett hiba miatt), akkor a sejt „éretlenül” lép mitózisba, mielőtt a DNS teljesen replikálódna, vagy a DNS-károsodást a sejt kijavította volna. A szabályozó fehérjék hibája miatt aberráns mitózis vezet a mitotikus katasztrófához, a sejt halálához. Ezek a lassan pusztuló sejtek metabolikusan még sokáig aktívak maradnak és képesek tovább termelni számos, az immunrendszer működését befolyásoló molekulát is, amelyek egyrészt lokálisan a tumor környezetében fejtik ki hatásukat, másrészt a keringésbe kerülve szisztémásan befolyásolják az immunrendszert. Részben ez

a mechanizmus felelős a lokális sugárterápia szisztémás hatásaiért. Ugyanakkor sugárzás hatására mind a tumorsejtek, mind a daganatos mikro környezetben jelen levő nem daganatos sejtek szenescens (korai öregedés) állapotába is kerülhetnek, ezáltal végleg elveszítik osztódási képességüket, de metabolikusan aktívak maradnak, és az úgynevezett szenescencia által aktivált szekretorikus fenotípus (SASP, „senescence-activated secretory phenotype”) alakul ki. Ebben az állapotban képesek olyan citokineket és kemokineket termelni, amelyek gyulladásos reakciókat váltanak ki. Amennyiben ez a szenescens fenotípus a daganatsejtekben alakul ki a sugárzást követően és rövid ideig áll fent, akkor a felszabaduló gyulladásos faktorok immunaktiváló hatásúak, míg ha a tumor környezetében lévő egyéb sejtekben alakul ki a fenotípus és tartósan fennmarad, akkor a kialakuló krónikus gyulladás immungátló hatású (Coppe, Patil et al. 2008, Davalos, Coppe et al. 2010, Tchkonja, Zhu et al. 2013). Az 1.4.2. fejezetben a szenescens T limfociták részletesebb bemutatására kerül sor. Végül ritkábban ugyan, de sugárzás hatására a daganatsejtekben korai sejthalál (leggyakrabban apoptózis) is kialakulhat (Lumniczky and Safrany 2015). Immunológiai szempontból immunogén és tolerogén sejtpusztulási mechanizmusokat különíthetünk el. Immunogén esetében olyan molekulák kerülnek a tumorsejtek felszínére és/vagy az extracelluláris térbe, amelyek képesek a daganatellenes immunválaszt aktiválni, míg a tolerogén sejthalál során a pusztuló tumorsejtek az immunrendszer aktivációját gátló molekulákat fejeznek ki. A sugárzás mind a két sejtpusztulást képes befolyásolni.

A daganat progresszió során a tumorsejtek számos olyan mechanizmust fejlesztenek ki, amelyekkel képesek az immunrendszer elemei elől megbújni („tumor escape”), ezáltal kikerülnek az immunológiai felügyelet alól, fokozva ezzel az immunszuppresszió mértékét, amely a daganatképződéshez vezet (Whiteside, Mandapathil et al. 2011). Ilyen immunrendszert „kijátszó” mechanizmus például a daganatsejtek felszínén az alacsony fő hisztokompatibilitási komplex (MHC)-expresszió, az adhézión és kostimulátor molekulák hiánya, a tumor antigének elfedése, illetve immunszuppresszív hatású citokinek termelése. A felsorolt mechanizmusok mindegyike a tumorsejtek életben maradását és a daganat kialakulásának lehetőségét fokozza. Több humán daganat esetében kimutatták, hogy a sugárzás képes fokozni a tumorsejtek felszínén az MHCI-molekulák mennyiségét, javítva az antigénprezentációt, azaz a tumorsejtek immunrendszer általi felismerését és

eliminálását (Santin, Rose et al. 1996, Santin, Hermonat et al. 1997, Lumniczky and Safrany 2015).

A daganatsejtek és az őket körülvevő mikrokörnyezet szinte valamennyi sejte különböző (aktiváló, vagy gátló) citokineket és kemokineket képes termelni. Szintén fontos megemlíteni, hogy a sugárzás a daganaton belül képes befolyásolni a daganatellenes immunitást meghatározó citokinek profilját és azok koncentrációját. A sugárzás nemcsak a tumorelles immunrendszert stimuláló citokinek termelődését képes serkenteni a daganaton belül, hanem az immunrendszert gátlókat is (például IL-10, TGF- β és TNF- α), így közvetlenül is hozzájárulhat a daganatok progressziója során kialakuló általános immunszuppresszióhoz (Yamamoto, Kimura et al. 2003).

1.3. Veszületett immunrendszer feladata és sejtjes elemei

Az evolúció során a fertőző ágensek, valamint a nem sajátként felismert, gazdaszervezetre veszélyes, illetve tumorossá fajult sejtek eltávolítására kétféle immunrendszer fejlődött ki, ezek a velesztületett (natív) és a szerzett (adaptív) rendszerek, amelyek szorosán és összehangoltan együttműködve biztosítják az immunhomeosztázist. A velesztületett immunrendszernek alapvető szerepe van az adaptív immunválasz elindításában és irányának meghatározásában is, vagyis annak „eldöntésében”, hogy az adaptív immunrendszer mely antigénekre milyen effektor mechanizmussal válaszoljon. Ugyanis a velesztületett immunrendszer sejtjes és szolubilis elemei biztosítják a szervezet első immunológiai védelmi vonalát. Veszélyt észlelve azonnal képesek aktiválódni, azonos vagy nagyon hasonló mechanizmusokkal válogatás nélkül képesek a szervezetet károsító különböző patogének leküzdésére, és minden esetben hasonló lépésekben zajlik le az eliminációs folyamat, így a velesztületett immunrendszer védekezése a patogénre nézve nem fajlagos. Továbbá fontos szerepe van a velesztületett immunrendszer elemeinek a sérült, szenescens és az apoptotikus sejtek felismerésében, bekebelezésében és eltávolításában is (Yatim and Lakkis 2015).

1.3.1. Monociták, makrofágok

A humán csontvelői hematopoetikus őssejtből (HSC) differenciálódó monocitákat korábban két alpopulációra osztották a Lipopoliszacharid (LPS) receptor CD14 (cluster of differentiation 14) és a CD16 sejt felszíni markerek expressziója alapján

(CD14+CD16⁻ és CD14+CD16⁺) (Zhao, Zhang et al. 2009), de az újabb kutatások és nomenklatúra alapján a CD16⁺ alcsoportot további két kisebb populációra bontják, így megkülönböztetjük a CD14^{magas}CD16⁻ klasszikus („classical”), a CD14^{magas}CD16⁺ átmeneti/intermediált („intermediate”) és a CD14+CD16^{magas} nem-klasszikus („non-classical”) monocita csoportot (Ziegler-Heitbrock, Ancuta et al. 2010). A teljes monocita csoporton belül a legnagyobb arányban a klasszikus monociták fordulnak elő (~85%), a maradék 15%-on osztozik a másik két csoport (nem-klasszikus: ~10%, intermediált: ~5%). Átfogó gén expressziós vizsgálatok tették nyilvánvalóvá a három populáció között fennálló fenotipikus és funkcionális különbségeket. A klasszikus monociták elsődleges feladata a fagocitózis, míg a másik két csoport képes például a staphylococcal enterotoxin B (SEB)-mediált T-sejt proliferáció stimulálása. Az intermediált csoport a legfőbb ROS termelő populáció homeosztatisz körülmények között, és érzékszódést stimuláló hatásuk is van, számos pro-angiogenesisz faktor receptorát expresszálják a felszínükön, például endoglin (ENG), Tie2 tirozin kináz és a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor 2 (VEGFR2) receptorokat (Zawada, Rogacev et al. 2011). A monociták a felszíni CD14 molekulák segítségével a gyulladásos stimulusokra, például lipopoliszacharidokra is képesek reagálni (CD14 az LPS koreceptora), azonban a stimulus hatására eltérő citokineket termelnek; klasszikus alcsoport elsősorban IL-10, G-CSF, CCL2, RANTES, IL-6, IL-8 kemokineket, az intermediált csoport: IL-6 és IL-8 interleukineket, míg a nem-klasszikus monociták elsősorban TNF- α , IL-1 β , IL-6 és IL-8 kemokineket expresszálnak (Wong, Tai et al. 2011, Wong, Yeap et al. 2012).

A csontvelőt elhagyva a véráramon keresztül a monociták különböző stimulusok hatására szövetekbe vándorolnak, és véglegesen differenciált makrofágokká érnek. Kisebb részük a vérerekben marad, mint endoteliális makrofág, nagyobb részük szövetekben különböző típusú makrofágokká (például máj Kupffer-sejtjei) alakulnak. A makrofágok egy része nem marad a differenciálódás helyszínén, hanem vándorolnak a szervezetben. A szövetekben található nyugvó makrofágok mellett a periférián kimutathatók az aktivált fenotípusú sejtek is, amelyek a szöveti stimulusok következtében fokozott működésre képesek (Grage-Griebenow, Flad et al. 2001, Martinez, Gordon et al. 2006). A makrofágok kulcsfontosságú szerepet töltenek be mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer működésében. Egyik legfontosabb

funkciójuk a különböző típusú és méretű partikulumok, kórokozók és idegen anyagok bekebelezése, amellyel a szervezet elsődleges védelmi vonalát biztosítják. Továbbá a szervezetben naponta nagy mennyiségben keletkező apoptotikus sejtek eltakarítását is elsősorban a makrofágok végzik, megakadályozva így a saját struktúrák által indukált autoimmun folyamatok kialakulását. Illetve a naponta nagy számban elpusztuló eritrociták feldolgozása során keletkező vas vérkeringésbe történő visszajuttatását is ők végzik (Atri, Guerfali et al. 2018).

1.3.1.1. Prosztata specifikus antigén (PSA) fagocitózisa

Az előző fejezetben ismertetett számos makrofág funkcion túl szeretném kiemelni a tanulmányom szempontjából is fontos feladatát a makrofágoknak. Az osztódó monociták képesek a prosztata daganatos mikro környezetbe vándorolni, majd ott aktivált makrofágokká differenciálódnak. Fagocitotikus képességüknek köszönhetően a prosztata, illetve a daganatsejtek által a tumoros mikro környezetbe kibocsátott prosztata specifikus antigént (PSA) is képesek aktív módon bekebelezni, majd a PSA+ makrofágok a vérkeringésben is megjelennek, így minimálisan invazív módon, a perifériás vérből is vizsgálható a mennyiségük. A cirkuláris PSA+ makrofágok monitorozása segítséget nyújthat a jó és rosszindulatú prosztata daganatos elváltozások elkülönítésében (Herwig, Mitteregger et al. 2008, Leers, Nap et al. 2008). Jelenleg a prosztata daganat kimutatására egyedül a plazma PSA markert használják, azonban megemelkedett szintje nem csak malignus, hanem a prosztata szövetét érintő egyéb jóindulatú elváltozások következtében is tapasztalható, így tumor specificitásuk nem megfelelő (Telesca, Etzioni et al. 2008).

1.3.2. Dendritikus sejtek (DC; Dendritic Cell)

A dendritikus sejtek mieloid és limfoid előalakokból egyaránt kialakulhatnak, újabb kutatások szerint a DC-k hematopoézise elkülönül a monociták vonalától, azonban különböző stimulusok hatására, például gyulladás következtében a monociták képesek dendritikus sejtekké differenciálódni (Collin and Bigley 2018). A dendritikus sejtek eredetük, membránstruktúráik és funkcióik tekintetében is két, elkülönült sejtpopulációt alkotnak. A CD11c+ mieloid, avagy „konvencionális” DC-kre jellemző a hatékony antigénfelvétel és antigénprezentációs képesség (Guilliams, Ginhoux et al.

2014), a CD123+ limfoid, vagy „plazmacitoid” DC-k elsősorban vírusfertőzés következtében aktiválódnak, és nagy mennyiségben termelnek IFN α és IFN β antivirális hatású citokineket (Reizis 2019). A DC-k intenzív antigénfelvevő, átalakító és bemutató képességük révén, mint hivatásos antigénprezentáló (APC) sejtek, a specifikus adaptív immunválasz beindításában nélkülözhetetlenek. Az antigén felvételét, fagocitózist követően közeli nyirokcsomóba vándorolva válnak érett DC-vé. Az érési folyamat során több ezer gén aktiválódik, ami a DC-k fenotípusának megváltozását okozza, többek között a patogénfelismerő receptorok száma lecsökken, mert fagocitózist már nem végeznek, de nagy számban fejeznek ki membránjukon MHC-molekulákkal asszociált peptideket és kostimulátor molekulákat (CD40 és B7 családba tartozó CD80 és CD86), továbbá citokintermelésük is fokozódik. Az érett DC-k az MHC-antigénkomplex bemutatásával, kostimulátor molekulák közvetítésével és IL-12-termeléssel a nyirokcsomókban található, antigénspecifikus érett, naiv T sejtek leghatékonyabb aktivátorai. A DC-k az MHC-I molekuláikon keresztül a citotoxikus CD8+ T sejteknek, míg az MHC-II receptorokon keresztül a CD4+ T sejteknek képesek antigént prezentálni, így egyidejűleg képesek mind a CD8+, mind a CD4+ T sejteket aktiválni (Thery and Amigorena 2001). A T sejtek a T-sejt receptoraikon (TCR) keresztül kapcsolódnak a DC-k MHC-peptid komplexéhez. Azonban önmagában ez még nem vezet sikeres antigén prezentációhoz és T-sejt aktivációhoz. Szükséges, hogy a két sejt közötti kapcsolat stabil és hosszan tartó legyen, amelyet a DC-k felszínén kifejeződő adhéziós és kostimulációs molekulák tesznek lehetővé, hozzákapcsolódva a T sejt felszínéhez (például: CD28 molekulához). A kialakult stabil kölcsönhatást nevezzük immunológiai szinapszishoz (Dustin 2014). Ennek következtében mindkét sejt citokineket termel, ami tovább erősíti a T-sejt aktiváció hatékonyságát. Sikeres aktiválást követően a CD8+ T sejtek direkt sejtpusztító hatású perforin és granzim fehérjéket termelnek, amelyek a target sejt hátyáján réseket képeznek, így a sejtet lebontó enzimek bejuthatnak, majd elpusztítják azt (Zhang and Bevan 2011). A DC-k által sikeresen aktivált CD4+ T sejtek szintén citokineket termelnek, amelyekkel egyrészt a B sejtek ellenanyagtermelő plazmasejteké történőérését, valamint a citotoxikus T sejtek sejtpusztító aktivitását segítik. TNF- α és INF- γ citokinek termelésével fokozzák a tumorsejtek MHC-I expresszióját, és így azok kevésbé tudnak „elbújni” a CD8+ T sejtek elől (Dustin 2014).

1.3.3. Természetes ölüsejtek (NK; Natural Killer)

A természetes ölüsejtek alkotják a T- és a B-limfociták mellett a harmadik fő limfoid sejtpopulációt. A csontvelői eredetű limfoid őssejtekből keletkeznek, azonban ezekben a sejtekben nem történik meg az antigénfelismerő receptorláncok génátrendeződése, így a limfocitákkal ellentétben ők nem rendelkeznek specifikus antigénkötő receptorral, így a CD3 kostimulációs markert sem expresszálják. A felszíni CD56 adhéziós molekula és a CD16 aktivációs receptor expressziós profilja alapján öt különböző érési és aktiváltsági állapotát tudjuk megkülönböztetni az NK sejteknek. Ezek az éretlen prekursor formák ($CD56^{\text{magas}}CD16^{-}$), éretlen/korai érett ($CD56^{\text{magas}}CD16^{\text{alacsony}}$), érett, citotoxikus formák ($CD56^{\text{alacsony}}CD16^{\text{magas}}$), továbbá az aktivációt követő degranulált formát ($CD56^{\text{alacsony}}CD16^{-}$), illetve a folytonos és hosszan tartó aktivációs stimulus következtében kialakuló anergikus NK sejtek ($CD56-CD16^{\text{magas}}$) (Amand, Iserentant et al. 2017). Mint az NK sejtek a veleszületett immunrendszer elemei, aktivációs stimulusra – például fertőzött vagy malignus sejtek jelenlétére – azonnal reagálnak, és elpusztítják azokat antigénkötő receptorok jelenléte nélkül (innen a természetes ölüsejt elnevezés), még mielőtt a $CD8^{+}$ T sejtekkel találkozna az idegen sejt. Az érett NK sejtek sejtpusztító működésének alapja, hogy képesek különbséget tenni a normál, illetve a vírussal fertőzött, vagy tumorossá fajult sejtek között a sejtfelszíni MHCI-molekulák expressziós szintje alapján, amely az utóbbi, megváltozott saját, vagy idegen struktúrák esetében drasztikusan lecsökken. Az NK-sejtek amellet, hogy a felismerést követően rövid időn belül elpusztítják a veszélyes sejteket, jelzik a veszélyt az adaptív immunrendszer számára (Kim, Chwae et al. 1997).

1.4. Adaptív immunrendszer feladata és sejt es elemei

Az adaptív immunrendszer önmagában nem képes immunvédelmet biztosítani – a fagociták (elsősorban a DC-k és a makrofágok), vagyis a veleszületett immunrendszer elemeinek fent ismertett funkciói nélkülözhetetlenek a T- és a B-limfociták aktiválásához. A veleszületett immunrendszer és szerzett immunitást biztosító fajlagos védekező rendszer sok szempontból eltér egymástól. Legfontosabb különbség, hogy az adaptív immunválasz fajlagos: az effektor funkciók csak az azokat kiváltó antigén ellen irányulnak. Az adaptív folyamatokat a T és a B sejtek közvetítik, ezek jelen vannak a

szervezetben, de a végrehajtó funkciók ellátására csak bizonyos idő (több nap, illetve hét) elteltével válnak képessé, amikor a klonális expansió eredményeként kellő számban felszaporodnak majd differenciálódnak a megfelelő fajlagosságú receptort hordozó limfociták. Szintén fontos különbség, hogy az adaptív folyamat során immunológiai memória is kialakul; ha ugyanazon antigén ismételt a szervezetbe jut, akkor sokkal gyorsabban és hatékonyabban alakul ki a másodlagos válasz (Yatim and Lakkis 2015, Magadan 2020).

1.4.1. Naiv, effektor és regulátor T limfociták (Treg)

A limfociták a limfoid irányban elkötelezett őssejtből fejlődnek ki. A T limfociták érésének egy bizonyos szakaszában a prekursor alakok elhagyják a csontvelőt és elvándorolnak a tímuszba, ahol az antigéntől független érésük teljessé válik. Az érés során először pozitív klón szelekción esnek át, ezzel kiszelektálódnak azok a T sejtek, amelyek felismerik a saját MHC molekulákat. Ezután a CD4+ helper és a CD8+ citotoxikus T limfociták érése ketté válik, és megjelenik a felszínükön a T-sejt receptor (TCR+CD3+ sejtek). Ezt követően a tímusz makrofágjaival és dendritikus sejtjeivel lépnek kapcsolatba az érő T sejtek, és azok a T sejtek, amelyek a TCR révén nagy affinitással tudnak kapcsolódni a saját antigénekkkel, az érés ezen fázisában elpusztulnak. Ez a T sejtek negatív szelekciója, amelynek révén "megtanulják" a saját antigén felismerését és kialakul az úgynevezett autotolerancia (Kondo, Ohigashi et al. 2019). Az így éretté vált naiv T-limfociták elhagyják a tímuszt és a véráram útján jutnak el a másodlagos nyirokszervekbe. További sorsukat a szöveti sejtekkel és a hivatásos APC-vel való találkozás következményei határozzák meg. A T-limfociták az APC-vel való kapcsolódást követően eltérő citokin receptorokat, transzkripciós faktorokat és citokineket kifejező effektor T-limfocitákká differenciálódhatnak. A naiv CD4+ sejtek T helper 1- (Th1), Th2- vagy Th17- effektor sejtekké, míg a naiv CD8+ T-limfociták sejtpusztító képességgel rendelkező végrehajtó sejtekké fejlődnek (Luckheeram, Zhou et al. 2012, Mittrucker, Visekruna et al. 2014).

Fontos megjegyezni, hogy a perifériás vérben lévő CD4+ és CD8+ T limfociták aránya (CD4+/CD8+) biomarkerként funkcionál, melynek normál értéke 1,5-2,5 határok között mozog (befolyásolhatja a kor, nem, genetika). Továbbá eltolja az arányt különböző virális fertőzések (például HIV) vagy daganat jelenléte (Amadori, Zamarchi

et al. 1995, Howard, Fasano et al. 1996, Sheu, Hsu et al. 1999, Jiang, Kang et al. 2004, Xu, Luo et al. 2009). Kórosan alacsony aránya (<1.0) immunszenescenciára, szenescencia-indukálta diszfunkcióra, illetve fokozott T limfocita aktivációra utal (Serrano-Villar and Deeks 2015, Sato, Adachi et al. 2019), míg tartósan magas aránya (>1.5) fokozott gyulladáshoz vezető folyamatokra és megnövekedett T helper aktivációra utal (Salih, Almeahmadi et al. 2022).

A TCR-rel rendelkező naiv T sejtek fontos típusát képezik a szabályozó funkcióval rendelkező, immunhomeosztázis fenntartásában fontos szerepet játszó regulátor T sejtek (Treg). Képződésük helyétől függően két fő típusát különböztetjük meg: ezek a tímuszban CD4+FoxP3+ T sejtekből fejlődő, változatos TCR-rel rendelkező természetes szabályozó T sejtek (nTreg; natural regulatory T), amelyek változatos mechanizmusok révén fejtik ki szabályozó funkcióikat. A tímuszban lejátszódó pozitív szelekció során a saját antigénekhez nagy affinitással kötődő sejtekként maradnak életben. A másik csoport a naiv T-limfocitákból a perifériás szövetekben képződő indukált regulátor T sejtek (iTreg; induced regulatory T), amelyek szuboptimális antigén stimuláció, vagy a nem megfelelő kostimuláció következtében jönnek létre. A vérben keringő Treg-eknek a nagyobb részét alkotják a periférián átalakult sejtek (Jordan, Boesteanu et al. 2001, Bilate and Lafaille 2012). Fontos megjegyezni, hogy újabb tanulmányok már a szintén tímusz eredetű, szuppresszív funkcióval rendelkező CD8+ Treg sejtek csoportjával is egyre intenzívebben foglalkoznak, és többféle alcsoportjukat beazonosították már, például CD4+CD25+ Treg-ekkel funkcionálisan megegyező CD8+CD25+ Treg-eket, azonban molekuláris szintű működési mechanizmusairól jóval kevesebbet tudunk (Churlaud, Pitoiset et al. 2015, Fenoglio, Dentone et al. 2018, Rouas, Merimi et al. 2019).

A differenciálódott Treg-ek perifériára jutva az alloreaktív T sejteket gátolják. Feladatuk tehát kettős; a sajátjal szembeni tolerancia fenntartása mellett képesek az immunválasz szuppressziójára. A DC-vel kapcsolódva gátolják az immunválaszban résztvevő T sejteket, továbbá a Treg-ek a tumorellenes immunitás gátlásával, immunszuppresszív funkcióik révén (például T sejtek, NK, B, DC sejtek aktivációjának, proliferációjának és effektor funkcióinak gátlásával) hozzájárulnak a daganatok kialakulásához (Chen, Du et al. 2016). A „forkhead box P3” (Foxp3) transkripciós faktor a legrégebb óta és legszélesebb körben használt markere a szuppresszor funkciókkal

rendelkező Treg sejteknek. Sokáig a CD4 és a CD25 markerekkel kiegészítve történt a Treg csoport beazonosítása (Fontenot, Gavin et al. 2003, Hori, Nomura et al. 2003), azonban a FoxP3 intracelluláris jelöléséhez fixálni és permeabilizálni szükséges a sejteket, amelyek ezt követően már nem életképesek, így funkcionális vizsgálatra alkalmatlanná válnak. Újabb vizsgálatok előtérbe helyezik a FoxP3 marker nélküli, sejtfelszíni markerekkel beazonosított Treg csoportok vizsgálatát. Több tanulmány foglalkozott alternatív markerekkel (például CD39, CD73), azonban a CD127 (az IL-7 receptor α lánc) a CD25 markerrel együtt alkalmazva bizonyult megfelelőnek a Treg-ek beazonosítására. A CD127 expressziója fordítottan korrelál a FoxP3 mennyiségével és a szuppresszív funkció mértékével, így a Treg-ek felszínén alacsonyan, vagy egyáltalán nem expresszálódik (Liu, Putnam et al. 2006, Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006).

A T limfocitáknak egy kicsi, azonban annál jelentősegteljesebb alcsoportját képezik a CD3+CD4-CD8- dupla negatív T sejtek, melyek a Treg sejtekkel mutatnak hasonló funkciókat. Feltételezések szerint a periférián lévő érett T limfocitákból alakulnak ki, immunszuppresszív hatásuk révén elősegíthetnek tumor metasztázis folyamatokat (Greenplate, McClanahan et al. 2019).

1.4.2. A T limfociták immunológiai kimerülése és szenescens állapota

Az 1.2.3. fejezetben kitértem, hogy a sugárzás mind a daganatsejtek, mind a daganatos mikro környezetben jelenlevő egyéb sejtek korai öregedését képes indukálni, azonban fontos megemlíteni, hogy a sugárzástól függetlenül, egyéb tényezők hatására is kialakulhat az immunsejtek szenescens állapota. Krónikus gyulladás, virális fertőzés vagy daganatos megbetegedés következtében a sokszor ismétlődő vagy folytonos antigén stimuláció az egyes T-sejt klónok "immunológiai kimerülését" váltja ki, amit a megváltozott fenotípussal és működéssel járó „korai öregedés” (szenescencia), majd sejthalál követ (Miggelbrink, Jackson et al. 2021). Az immunológiai kimerülés során a T sejtek effektor funkciói fokozatosan, hierarchikus sorrendben vesznek el. Először megszűnik a proliferációs kapacitásuk, majd az IL-2 interleukint és a tumor nekrozis faktorokat (TNF) termelő képességük, metabolikus szabályozás felborul, ezzel egyidejűleg pedig megnő a sejtfelszíni gátló receptorok expressziója, ilyen például az általunk is vizsgált PD1, LAG3, 2B4 és a CD160 (Wherry 2011).

A folyamatos antigén stimulus és több aktivációs ciklust követően a T sejtek felszíni CD28 molekulájának kifejeződése folyamatosan csökken, míg a CD57 marker expressziója nő (Arosa 2002, Esensten, Helou et al. 2016, McLane, Abdel-Hakeem et al. 2019). A CD28 és CD57 markerek expressziós profilja alapján négy funkcionálisan elkülöníthető T-sejt alpopulációt tudunk megkülönböztetni, köztük a CD28 markert már nem expresszáló sejteket, amelyek már elindultak a szenescens állapot felé. A felosztás szerint ezek a csoportok a nem/korai aktivált (CD28+CD57-), aktivált (CD28+CD57+), aktivált/korai szenescens (CD28-CD57-) és a véglegesen differenciálódott szenescens T sejtek (CD28-CD57+) (Pangrazzi, Reidla et al. 2020). Fontos kiemelni, hogy annak ellenére, hogy a kifáradás és a szenescens állapot hasonló sejtes karakterisztikával és elváltozásokkal jár, kiváltó okuk eltérő. Míg a T-sejt kimerülés folyamatát külső immunológiai szabályozó mechanizmusok irányítják, addig a szenescencia belsőleg, a MAPK által szabályozott stressz válasz eredményeképpen alakul ki (Pawelec 2019, Kaiser, Semeraro et al. 2021).

1.4.3. Memória T-sejt alpopulációk

Az elsődleges immunválasz lecsengése után életben maradt antigénspecifikus CD4+ és CD8+ T-limfociták hosszú életű memória T sejtekké alakulnak, melyek gyors aktivációja és osztódása hatékony másodlagos effektor sejtek kialakulásához vezet (Wherry and Ahmed 2004, Raphael, Joern et al. 2020). A memória T sejtek élettartama nagyon hosszú (akár a 20 évet is meghaladhatja). A sejt felszíni C-C kemokin receptor 7 (CCR7) expressziója, illetve annak hiánya alapján két funkcionális csoportba oszthatóak a humán memória T-sejt alpopulációk (Sallusto, Lenig et al. 1999). A CCR7 receptor a memóriasejtek másodlagos limfoid szervekbe való migrációját segíti elő. A receptort expresszáló memória őssejtek (CD45RO-CCR7+, CD95+CD28^{magas}) és centrális memória sejtek (CD4RO+CCR7+CD95+CD28+) a másodlagos nyirokszervek között oszlanak el, közvetlen effektor funkció ellátására nem képesek, azonban rendkívül hatékonyan képesek aktiválni a DC-eket, és képesek CCR7 receptort nem expresszáló effektor sejtekké differenciálódni. A memória őssejtek egy kis csoportot alkotnak a memória sejteken belül, amelyek önmegújító képességgel rendelkeznek, így önmagukat és a többi típusú effektor és memória T sejteket képesek létrehozni (Gattinoni, Speiser et al. 2017). A CCR7 receptort nem expresszáló terminális memória (CD45RO+CCR7-

CD95+CD28+), effektor memória (CD45RO+CCR7-CD95+CD28-) és a terminális effektor T sejtek (CD45RO-CCR7-CD95-CD28-) az immunválasz által érintett területre vándorolnak a periférián és képesek az effektor funkcióikat hatékonyan ellátni (Campbell, Murphy et al. 2001, Mahnke, Brodie et al. 2013). A lokális immunizálás hatékonyságának hátterében az áll, hogy az effektor memória T sejtek a keringésből visszavándorolnak arra a területre, ahol aktiválódtak. Ezt a visszavándorlást a T sejteken kifejeződő egyéb adhéziós molekulák és kemokinreceptorok teszik lehetővé. A terminális effektor T sejtek a memória T sejtekből differenciálódnak, majd klonális expanszió (azaz az antigénspecifikus limfociták antigén hatására történő proliferációja) során sejtpusztító hatású perforint és granzim-B enzimeket nagy mennyiségben expresszáló citotoxikus effektor T sejtekké alakulnak, így képesek akár a malignus sejteket is elpusztítani (Joshua, Vuckovic et al. 2021).

1.4.4. B limfociták, plazma sejtek, memória B sejtek

A B-limfociták antigén független érése a csontvelőben indul meg (embrionális korban a májban és a lépben is zajlik), majd a már B sejt receptorral (BCR) rendelkező, de még éretlen B sejtek, az úgynevezett tranzicionális B sejtek elhagyják a csontvelőt és a véráram útján másodlagos nyirokszervekbe (elsősorban a lépbe, nyirokcsomókba) vándorolnak, ahol további érésen mennek keresztül. A szomatikus hipermutáción átesett B sejtek kölcsönhatásba kerülnek a csíráközpontok világos zónájában található folliculáris dendritikus sejtek (FDC) által megkötött antigénnel (Eibel, Kraus et al. 2014). Azok a B sejtek, amelyek felszíni Ig-jei a szomatikus mutációk eredményeképpen nagy affinitással kötik az antigént, tovább élnek, míg az antigént fel nem ismerő (a szomatikus mutáció következtében "rosszul sikerült" BCR-t hordozó) B sejtek apoptózis útján elpusztulnak. Ez a folyamat az affinitás érés. Ezután az antigén fajlagos felismerésének ellenőrzése történik, az aktivált B és T limfociták részvételével. Ez a mechanizmus biztosítja azt, hogy kizárólag az azonos antigént felismerő Th és B sejtek között alakul ki ez utóbbiak továbbélését, differenciálódását, és az antigénspecifikus ellenanyag termelését lehetővé tevő kapcsolat. Itt zajlik le az ellenanyagok izotípusváltása, és a sejtek további differenciálódása is. A nagy affinitású receptort hordozó B sejtek, amelyek elhagyják a csíráközpontot, antigénnel való találkozás eredményeként egy részükből nagy affinitású BCR-rel rendelkező,

ellenanyag-termelő plazmasejtek, másik részükből pedig hosszú életű memóriasejtek jönnek létre, amelyek újabb antigénstimulus hiányában is több hónapig vagy akár évekig életképesek maradnak a vérkeringésben (Bannard and Cyster 2017, Chi, Li et al. 2020). A fent leírt B-sejt érési formákat sejtfelszíni markerek segítségével elkülöníthetjük. A sejtfelszíni CD24 és CD38 markerek expressziója alapján beazonosíthatjuk az éretlen tranzicionális, az érett naiv, illetve a korai és késői memória B sejteket, míg a CD21 és CD86 receptorok kombinációjával az aktivált B sejteket és a plazmasejteket is meghatározhatjuk (Pape, Taylor et al. 2011, Buffa, Pellicano et al. 2013, Zwang, Ganesh et al. 2018, Reincke, Payne et al. 2020, Cencioni, Ali et al. 2021).

1.5. Sugárterápia hatása az immunrendszer sejteire

A nagy dózisú sugárzáshoz korábban az immunrendszert gátló hatást társítottak, azonban a legújabb kutatások szerint az ionizáló sugárzás és az immunrendszer között egy dinamikus kapcsolat van, amelynek során a sugárzás hatására bizonyos immunfolyamatok felerősödnek, mások gátlás alá kerülnek. Így a daganatellenes immunválasz akár pozitív, akár negatív irányban módosulhat ionizáló sugárzás hatására (Lumniczky and Safrany 2016).

A sugárzás közvetlenül és közvetve is hat az immunrendszer sejteire. A közvetlen hatás a daganatos mikrokörnyezetbe beszűrődő limfocitákon, makrofágokon és DC-ken keresztül lokálisan érvényesül, míg a közvetett hatás a daganatsejtek, valamint a daganatos mikrokörnyezet egyéb sejtes elemei által termelt szolubilis faktorokon keresztül hat mind lokálisan, mind szisztémásan. Az immunrendszer sejteinek a sugárérzékenysége igen széles skálán mozog; a B sejtek és a CD8+ T sejtek rendkívül sugárérzékenyek, és sugárzás hatására gyorsan elpusztulnak. Ugyanakkor a monociták, makrofágok és Treg sejtek a limfocitáknál sokkal sugárrezisztensebbek. Az NK sejtek sugárérzékenységéről ellentmondásos tanulmányok találhatóak a szakirodalomban. Egyes publikációk szerint az NK sejtek sugárrezisztensebbek a CD3+ T sejteknél (Bogdandi, Balogh et al. 2010, Swanson, Jhavar et al. 2020), míg más tanulmányok az ellenkezőjéről számolnak be (Falcke, Ruhle et al. 2018). Az eltérő mértékű sugárérzékenységből adódóan a sugárterápia során a daganatot infiltráló immunsejtek pusztulásának mértéke eltérő (Bogdandi, Balogh et al. 2010, Heylmann, Rodel et al. 2014). Továbbá a besugárzás a túlélő immunsejtek fenotípusát és működését is

jelentősen befolyásolhatja. Egy, az alacsony dózisu ionizáló sugárzás immunrendszerre gyakorolt hatásait összefoglaló tanulmány szerint az alacsony dózisu expozíció is képes károsítani mind a veleszületett, mind pedig az adaptív immunfolyamatokat (Lumniczky, Impens et al. 2021).

Fontos megjegyezni, hogy a sugárterápiás eljárások során alkalmazott különféle besugárzási protokollok immunrendszerre gyakorolt szisztémás és hosszú távú hatásairól még nincs elegendő információnk. A sugárbiológia egyik esszenciális, és kiemelt kutatási területe ez, amellyel napjainkban is számos kutatócsoport foglalkozik hazai és nemzetközi szinten egyaránt.

1.6. Sugárzás indukálta fibrózis kialakulása

Az ionizáló sugárzás hosszú távú mellékhatásai között szerepel a fibrotikus elváltozások kialakulása, amely a beteg életminőségét nagymértékben befolyásolja. A fibrózis kialakulása összefügg a korábban részletesen ismertetett, sugárzás-indukálta reaktív oxigén és nitrogén gyökök megjelenésével, amelyek a lokális gyulladás kialakulásáért felelősek. Ebből a gyulladásos állapotból fog végül kialakulni a fibrotikus gyulladásos közeg, amelyre jellemző a fokozott kollagén lerakódás, rossz erezettség és a hegesedés. Hátterében a fibroblasztok miofibroblasztokká alakulása áll, amelyek fokozott osztódása mellett nagymértékű kollagént, és egyéb extracelluláris mátrix komponenseket termelnek (Straub, New et al. 2015). A fibrózis kialakulását számos citokin és növekedési faktor szabályozza, amelyek közül mi is vizsgáltunk néhányat.

1.7. Fej-nyaki és prosztatata daganatok kialakulása, előfordulási gyakoriságuk

A tanulmány középpontjában a fej-nyaki és prosztatata daganatos betegek vizsgálata áll, amely daganatos megbetegedések gyógyításában már rutinszerűen alkalmaznak mind közel, mind távol besugárzást is, így lehetőségünk nyílik a különböző besugárzási protokollok immunrendszerre gyakorolt hatását összehasonlítani. Ebben az alfejezetben ismertetem a daganatok kialakulását és előfordulási gyakoriságukat világszinten és hazai viszonylatban.

A fej-nyaki daganatok csoportjába tartoznak azok a daganatok, amelyek a fej és a nyak régiójában fejlődnek ki, elsősorban a szájüregi, száj-garati, orrgarati, algarati, gége és orrüreg/melléküregi daganatok. A fej és a nyak szerveit sokféle szövettípus alkotja,

amelyek mindegyikéből kiindulhatnak rosszindulatú daganatok. A fej-nyaki daganatok legnagyobb része úgynevezett laphámrák, amely főleg a nyirokrendszer útján képez áttéteket a környezetében lévő nyirokcsomókban, és legnagyobb csoportját a szájüregi daganatok képezik. A prosztatatarák a prosztata mirigyeit bélelő hámból kiinduló rosszindulatú daganat, amely növekedése során a prosztata mirigyeihez hasonló mirigyszerű struktúrákat képez, vagyis szerkezetét tekintve a prosztatatarák úgynevezett mirigyes rák (adenokarcinoma). Jellemzően az idősebb férfiak betegsége, előfordulásának gyakorisága a korrallal nő, a gyakorisági csúcsot 75. életévben éri el.

A Rákkutatás Nemzetközi Ügynöksége (International Agency for Research on Cancer – IARC) által közzétett adatok alapján 2020 évben világszerte az új daganatos esetek száma összesen 19,3 millióra, míg daganatos megbetegedésekben elhunyt esetek száma 10 millióra becsülhető. Szakértői elemzések szerint az új daganatos esetek száma 2040-re várhatóan a 2020 évi adatokhoz képest 47%-kal fog megnövekedni, amely több, mint 28 millió új esetet jelent majd. A 2020 évi adatok alapján világszerte a leggyakrabban diagnosztizált daganatos megbetegedés a nőket érintő mell daganat, amelyet a tüdődaganat követ a sorban. A harmadik leggyakoribb daganat típus a prosztata daganat, amely az összes regisztrált daganatos esetek 7,1%-át teszi ki, azaz több, mint 1,4 millió újabb beteget. Ugyanakkor a fej-nyaki (ajak, szájüregi) területeket érintő daganatos esetek száma ennél kevesebb, a regisztrált esetek 2%-át teszik ki, így a 18-dik helyen áll a közzétett listában. A tanulmányban vizsgált 36 különböző daganatos megbetegedés esetében regisztrált esetek 185 ország adataiból készültek (forrás: GLOBOCAN, Rákkutatás Nemzetközi Ügynöksége, (Sung, Ferlay et al. 2021).

A Nemzeti Rákregiszter által publikált adatok alapján Magyarországon is évről évre egyre nő a bejelentett új rosszindulatú daganatos megbetegedések száma; 2001-ben 61 260 főt regisztráltak, míg 2019-ben már 75 347 fővel növekedett a daganatos betegek száma hazánkban. Mind a fej-nyaki, mind a prosztata daganatos megbetegedések komoly népegészségügyi problémát jelentenek hazánkban is. 1948 és 2000 között a fej-nyaki tumorok által okozott halálozás közel 6-szorosára emelkedett. A prosztata daganatos férfiak száma 2000-ben 3606 volt, míg 2019 évben 4802 főt regisztráltak, az elmúlt 20 évben pedig összesen 83 539 új eset került a nyilvántartásba, amelyből évente 1400-1500 férfi hal meg.

2. Célkitűzések

Világszinten és hazánkban is mind a fej-nyaki, mind a prosztatata daganatos megbetegedések komoly népegészségügyi problémát jelentenek. Mindkét daganattípus kezelésének egyik legfontosabb eszköze mindmáig a sugárterápia. Ennek segítségével különféle besugárzási protokollokat alkalmazva lehetőség nyílik különböző hatékonyságú, illetve eltérő mellékhatás-kockázattal járó terápia kiválasztása és alkalmazása. A sugárterápia képes befolyásolni a szisztémás immunológiai folyamatokat, azonban jelenleg keveset tudunk arról, hogy a megváltozott immunstátusz (amely lehet éppen előnyös, vagy hátrányos a beteg számára) meddig marad fent a túlélő betegekben. A különböző intenzitású és energiájú sugárterheléssel járó terápiás protokollok által okozott immunstátusz változásról még kevesebb információ áll rendelkezésünkre. Továbbá a prosztatata daganat kiújulás monitorozására jelenleg a plazma PSA szint nyomon követése a legelfogadottabb módszer, azonban alacsony tumor specificitása miatt alternatív marker monitorozása is szükséges.

- Célunk volt vizsgálni a daganatokkal összefüggő, ionizáló sugárzás indukálta szisztémás akut és késői, veleszületett és adaptív immunfolyamatokat különböző sugárterápiás protokollal kezelt fej-nyaki és prosztatata daganatos betegekben:
 - A komplex immunológiai státusz jellemzéséhez egy rendkívül átfogó fenotipizálási panel rendszert kívántunk létrehozni, amellyel a veleszületett és az adaptív immunválaszban résztvevő immunsejtek különböző érési és funkcionális alcsoportjai beazonosíthatók és hosszú távon monitorozhatók.
 - Célunk volt összehasonlítást végezni arról, hogy az egyes terápia típusok (külső és belső sugárkezelés) eltérő intenzitású és energiájú sugárterhelése hogyan befolyásolja a betegek akut, és krónikus immunológiai folyamatait.
- Az összetett, génexpressziós-, fehérje-, és sejt-szintű vizsgálatokkal kívántuk feltérképezni a sugárzás indukálta szisztémás folyamatokat.
- Szintén célkitűzéseink között szerepelt olyan T sejt felszíni immunellenőrzőpontgátló receptorok vizsgálata, amelyek megnövekedett expressziója a daganat ellenes immunterápiák potenciális célmarkerei lehetnek, és amelyek blokkolásával a T sejt tumor ellenes aktivációja fokozható.

- A sugárterápiának ezen célmarkerek expressziós mintázatára gyakorolt rövid és hosszú távú hatásait is vizsgálni kívántuk, amely befolyásolhatja az alkalmazni kívánt különböző terápiás eljárások sorrendjét és kombinációját is.
- Továbbá célunk volt olyan celluláris és szolubilis immunológiai biomarkerek beazonosítása is, amelyek indikátorai lehetnek a terápia okozta késői mellékhatásoknak, többek között az ionizáló sugárzás okozta késői fibrózis kialakulásának.
- Végül a prosztatata daganatos betegek plazma PSA szintjének nyomon követése mellett további kiegészítő, nagyobb tumorspecificitással rendelkező, szintén minimálisan invazív módon a perifériás vérből vizsgálható marker azonosítása is szerepelt célkitűzéseink között.

3. Módszerek

3.1. Fej-nyaki és prosztatata daganatos betegek klinikai paraméteri, sugárterápiás kezelésük

Vizsgálatainkba 23 fej-nyaki (14 férfi, 9 nő beteg) és 98 prosztatata daganatos férfi beteg került bevonásra 2016 és 2020 között. A fej-nyaki daganatos betegek intenzitás modulált sugárterápiáját és a kontroll vérvételeket a lengyelországi Maria Skłodowska-Curie Rákkutató Intézet végezte, míg a prosztatata daganatos betegek terápiáját, mellékhatások monitorozását és a vérmintákat a budapesti Országos Onkológiai Intézet (OOI) biztosította. A perifériás vérből vizsgálni kívánt celluláris és szolubilis paraméterek meghatározását, a molekuláris vizsgálatok megtervezését és kivitelezését mind a két tanulmányban a Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központ (NNGYK) Sugárterápiás Osztályával együttműködve végeztem.

A vizsgálatba bevont Humán Papillóma Vírus (HPV)-negatív fej-nyaki tumoros betegek 52%-a gége, 35%-a szájüregi és 9%-a száj-garati és 4%-a fültőmirigy lokalizációjú daganatban szenvedett (Függelék 5. táblázat). A vizsgálatból való kizárást jelentette, ha a sugárterápián kívül műtétben, vagy kemoterápiában is részesült a beteg, illetve, ha nyirokcsomói, vagy távoli áttét is kialakult már a páciensben a daganat diagnózisának pillanatában. Frakcionált külső sugárterápiás kezelésben részesültek a fej-nyaki daganatos betegek. A csoporton belül a betegek különböző nagyságú teljes dózis kaptak (51–52,8 Gy; 57,6–60 Gy; 64,8–74 Gy) a kezelés során, és a teljes dózis eltérő nagyságú (1,6-2,2 Gy), és számú frakciókban (17-40) került leadásra. A sugárzás indukálta akut mukozális reakció (AMR) mértékének nyomon követése is megvalósult a betegeken.

A vizsgált prosztatata daganatos betegeket négy csoportba sorolhatjuk a kapott sugárterápia típusa alapján: LDR brachyterápiás (n=31), HDR brachyterápiás (n=32), lineáris gyorsító (LINAC)-alapú teleterápiás (n=20) és a Kiber-kés terápiás (n=15) csoport. Az LDR brachyterápia során alkalmazott, és a páciensek prosztatata szövetébe ültetett ¹²⁵I izotópok kezdeti dózis rátája 1,692 Gy volt, a teljes 145 Gy dózist körülbelül 12 hónap alatt adták le a prosztatata szövetében, ahonnan ezt követően sem kerültek eltávolításra, egészen életük végéig. Az alkalmazott jódiotóp dózis-leadásának időkinetikáját a függelék 1. ábra szemlélteti. A HDR brachyterápia során szintén a prosztatata szövetébe juttatott izotópok segítségével adták le a kívánt dózist, amelyhez

leggyakrabban ^{192}Ir izotópot használnak. A teljes 19 Gy (esetenként 21 Gy) dózist néhány perces kezelés során kapták meg a betegek távvezérelt technika segítségével. Mindkét brachyterápiás kezelés során tehát műtéti úton, tűk segítségével kerültek a sugárzó izotópok a prosztata szövetébe.

A LINAC-alapú teleterápiás kezelés során a betegek 1,8-2,5 Gy nagyságú dózisokban kapták a 70-78 Gy teljes dózist, míg a Kiber-kés technológiával 5 x 8 Gy dózist kaptak. A vizsgálatból való kizárást jelentette, ha nyirokcsomói, vagy távoli áttét is kialakult már a páciensben a daganat diagnózisának pillanatában.

Az elsődleges daganat előrehaladottsági foka (T), regionális nyirokcsomói áttét (N), illetve távoli metasztázis megléte (M) alapján felállított TNM-klasszifikáció szerint mind a fej-nyaki, mind a prosztata daganatos betegeket jellemeztük. A prosztata daganatos betegek esetében a TNM adatok mellett Gleason pontszámokat és plazma PSA értékeket is meghatároztunk. A Gleason értékek a daganat agresszivitásának meghatározására használt osztályozási rendszer. A TNM besorolás, a Gleason pontszámok és a plazma PSA értékeket együttes értelmezése alapján kockázati csoportokba sorolhatók a prosztata daganatos betegeket (alacsony kockázat: kezelés előtti PSA < 10 ng/mL, GS 2-6 és T1-T2a; közepes kockázat: kezelés előtti PSA = 10–20 ng/mL és/vagy GS 7 és/vagy T2b; magas kockázat: kezelés előtti PSA > 20 ng/mL és/vagy GS 8-10 és/vagy T3a).

A kockázati besorolás határozza meg a prosztata daganatos betegek esetében az alkalmazandó sugárterápia típusát. A kis és közepes kockázatúak mind a négy féle kezelésben részesülhetnek, azonban akiknek 60 cm³-nél kisebb a prosztata térfogata, és a rektum (mint védendő szerv) 5 mm-nél messzebb van a prosztatától, és beleegyeznek, azok a betegek brachyterápiát kapnak (amely randomizálva van az LDR és HDR között). Akik nem kaphatnak brachyterápiát a fent említett okok miatt, vagy kaphatnak, csak nem egyeznek bele, ők 2019-ig teleterápiában, majd 2019 után főként Kiber-kés terápiában részesültek hazánkban. Magas kockázatú prosztata daganatos betegek esetében nem alkalmaznak brachyterápiát, kizárólag teleterápiát, vagy Kiber-kés terápiát kaphatnak (2019 után főleg az utóbbit).

3.1.1. Betegek sugárkezelés utáni nyomon követése

A fej-nyaki daganatos betegek esetében csak rövid nyomon követésre volt lehetőségünk. Három alkalommal történt vérvétel: a kezelés megkezdése előtt egy héten belül, az utolsó frakció leadása után (azt követő 6 órán belül), illetve egy hónappal a sugárterápia végét követően. A prosztatata daganatos betegek esetében sikerült megvalósítani az öt éves nyomon követést, vérvételre tíz alkalommal került sor: közvetlenül a kezelés előtt és után, majd az első évben négy alkalommal (3, 6, 9, 12 hónappal a kezelést követően), egy év után pedig évente egyszer (24, 36, 48, 60 hónappal a kezelést követően) történt perifériás vérvétel a betegekről. Jelen dolgozat az első három év eredményeit mutatja be. Minden vérvétel alkalmával meghatároztuk a plazma PSA szint, illetve gasztrointesztinális (GI) és genitourinális (GU) mellékhatások pontozása is megtörtént, amelyekre a következő alfejezetekben még bővebben kitérek.

3.1.2. Korban és nemben illesztett kontrol páciensek vizsgálatba vonása

Mind a fej-nyaki daganatos beteg, mind a prosztatata daganatos betegek vizsgálata mellé korban és nemben illesztett, adott daganatra nézve negatív, egészséges önkéntes perifériás vérét is vizsgáltuk (összesen n=30), és a betegekből mért paraméterek változását a kontrol csoporthoz is hasonlítottuk.

3.2. Perifériás vér begyűjtése, PBMC és plazma minták izolálása

Perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC) és plazma minták izolálásához körülbelül 10 ml/alkalom mennyiségű perifériás vért vettek minden betegtől. A vér heparinos csövekbe került (Vacuette tube, Greiner Bio-One GmbH, 4550 Kremsmünster, Austria), amely közvetlenül antitrombin hatást fejt ki, így meghosszabbíthatja a minta alvadási idejét. A vért foszfát pufferes sóoldattal (PBS) 1:1 arányban hígítottuk, majd ezt 6 ml-enként 2-2 ml Histopaque oldatra rétegeztük (Sigma-Aldrich, Co., 3050 St. Louis, MO, USA) nagy óvatossággal, hogy a két réteg ne keveredjen egymással. Ezután centrifugálás (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) következett 2000 rpm-en, 24°C-on, 15 percig, fék nélküli beállítással. Ezzel a sűrűség-gradiens centrifugálással elkülönültek a perifériális mononukleáris sejtek (PBMC), mintegy „felhő” réteget alkotva a felette elhelyezkedő vérplazma és az alatta lévő Histopaque-oldat között. A kinyert PBMC-t új csőbe gyűjtve kétszer mostuk PBS

oldattal, majd meghatároztuk a sejtszámot tripánkékes festéssel Bürker-kamrában. Ezután a PBMC-eket szétosztva ($1,5 \times 10^6$ sejt /ml), fagyasztó médiumban lefagyasztottuk, amelynek összetétele: RPMI-1640 médium 10% dimetil szulfoxiddal (DMSO) és 50% magzati borjú savóval (FBS) kiegészítve. Először -80°C hőmérsékletre tettük a mintákat 2-propanolt tartalmazó fagyasztó dobozba (NALGENE™, Reanal Labor, Budapest, Magyarország), amely biztosította a minták lassú, fokozatos, és ezáltal kíméletes megfagyását, minimalizálva a gyorsan kialakuló jégkristályok okozta sejtpusztulás mértékét. Két nappal később a PBMC minták átkerültek folyékony nitrogénbe felhasználásig.

A sűrűség-gradiens centrifugálás során felülúszóként elvált vérplazmát új csövekbe gyűjtve lecentrifugáltuk (2500 rpm, 10 perc, 24°C), hogy a mintában maradt sejttörmelékeket eltávolíthassuk. Centrifuga után a felülúszóként kinyert tiszta plazmát a kívánt térfogatokban szétosztva -80°C hőmérsékletre helyeztük felhasználásig.

3.3. Prostatata daganatos betegek plazma PSA-szintjének hosszú távú nyomon követése

A prostatata daganatos betegek plazma PSA szintjének meghatározása minden vérvétel alkalmával megtörtént (kivétel közvetlenül a beavatkozás utáni időpontban, amelynek nem volt sok relevanciája a kezelés előtti PSA meghatározás miatt), azaz van PSA adatunk kezelés előtti időpontból, valamint a beavatkozás utáni 3-dik hónaptól egészen 36-dik hónapig. A betegek PSA értékeit a Függelékben található 11-14. táblázatok foglalják össze külön betegcsoportonként.

3.4. Prostatata daganatos betegek akut és krónikus gasztrointesztinális és genitourinális mellékhatásainak monitorozása

A prostatata daganatos betegek akut és krónikus gasztrointesztinális és genitourinális mellékhatásait minden vérvétel alkalmával rögzítettük a nyomon követés teljes időtartama alatt. A toxicitási kritériumokat a Sugárterápiás Onkológiai Csoport (Radiation Therapy Oncology Group - RTOG) és a Daganatkutatás és Kezelés Európai Szervezete (European Organization for Research and Treatment of Cancer – EORTC) határozták meg, ezeket alkalmaztuk mi is. A besorolási rendszer 0-tól 5-ig tart; 0: nincs mellékhatás, 1: van mellékhatás, de beavatkozást nem igényel, 2: beteg gyógyszeres kezelést igényel, 3: súlyos hasmenés, nyálkahártya sérülés, alhasi felfűvódás, 4: kritikus

állapot, 5: sugárzás okozta elhalálozás (Cox, Stetz et al. 1995). Ezeket a pontszámokat az orvos határozza meg és adja minden beteg esetében.

Továbbá a betegek saját maguk is pontozzák tüneteiket A Nemzetközi Prostatata Tünetek Pontszám (International Prostate Symptom Score - IPSS) rendszere segítségével, amelyet az Amerikai Urológiai Társaság (American Urological Association - AUA) hozott létre. Ez alapján beszélhetünk enyhe (pontszám ≤ 7), mérsékelt (pontszám 8-19) és súlyos (pontszám 20-35) tünetekről (Barry, Fowler et al. 1992). A betegek a vizeletürítés tüneteinek alapján is pontozzák életminőségüket, arra a kérdésre válaszolva, hogy ha a jelenlegi állapot maradna fent életük végéig, akkor mennyire lennének elégedettek vele. A pontozás a következő: 0: kiváló állapot, 1: jó, 2: kielégítő, 3: vegyes, 4: többnyire elégedetlen, 5: elégedetlen, 6: borzasztó (Clark and Fallowfield 1986, Aaronson, Bullinger et al. 1988). A betegek klinikai paramétereit a Függelékben található 6-8. táblázatai foglalják össze.

3.5. Prostatata daganatos betegek perifériás limfocitáiban kialakult kromoszóma sérülések vizsgálata

A prostatata daganatos betegek perifériás vérmintáiban lévő limfociták ionizáló sugárzás indukálta kromoszóma sérüléseit is meghatározta az OOI. A limfocita kultúrákat fitohemagglutininnal (PHA, 2% v/v, Gibco), 10% FBS-sel és penicillinnel/streptomiccinnel (100 U/ml/ 100 µg/ml, Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) kiegészített RPMI-1640 médiumban inkubálták 46 órán át, 37°C-on. Ezt követően a limfociták osztódásának leállítására érdekében a kultúrákat kolcemiddel (0.1 µg/ml, Gibco) inkubálták további két órát, ennek során a mitotikus orsók blokkolódtak. Ezután következett a limfociták hipotonizálása (0,075 M KCl, 15 perc, 37°C), majd fixálása metanol-ecetsav 3:1 arányú elegyével. A fixált sejtek üveg lemezekre való kicseppentése után következett a Giemsa festés 3%-os festék oldattal, majd mikroszkóp segítségével manuális kiértékelés során meghatározták a kromoszóma-aberrációk számát.

3.6. Génexpressziós, fehérje és sejt szintű vizsgálatok

3.6.1. Perifériás vörsejtek gén expressziós profiljának vizsgálata, RNS izolálás és reverz transzkripció

A fej-nyaki daganatos betegek vérmintáiból a teljes RNS kivonása PAXgene Blood miRNA kit (Qiagen, PreAnalytiX GmbH, Hilden, Germany) segítségével történt Qiacube (Qiagen, Manchester, UK) izoláló robot segítségével. A kivont RNS mennyiségi vizsgálatát ND-1000 NanoDrop spektrofotométer, míg a minőségi vizsgálatát TapeStation 220 (Agilent Technologies, CA, USA) készülék segítségével végeztük. A cDNS-átírást 350 ng teljes RNS izolátumból készítettünk cDNS reverz transzkripció kit (High Capacity cDNA reverse transcription kit; Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) felhasználásával a gyártói utasítások szerint.

3.6.1.2. Kvantitatív valós idejű polimeráz-lánreakció (qRT-PCR)

Kvantitatív valós idejű polimeráz-lánreakciót (qRT-PCR) Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany) készülékkel végeztük. A mintákat triplikátokban futtattuk 10 µl végtérfogatú reakcióelegyben, amely 1 µl cDNS-t, illetve hat különböző primert és fluoreszcens próbát (3'-6-Carboxyfluorescein: FAM, 6-Hexachlorofluorescein: HEX, Atto 680, Atto 390, Texas Red; Eurogentec Ltd., Fawley, Hampshire, UK és CY5; Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, UK) tartalmazott. A HPRT1, DDB2, GADD45, SESN1, FDXR és az MDM2 gének expresszióját vizsgáltuk, a pontos nevüket és a primerek szekvenciáit a függelék 1. táblázata foglalja össze. A PCR reakciók során a következő hőmérsékleti beállításokat alkalmaztuk: 2 percig 95°C-on, majd 45 cikluson át 10 másodpercig 95°C-on és 60 másodpercig 60°C-on inkubáltuk a mintákat. Az adatokat a Rotor-Gene Q Series szoftver segítségével elemeztük ki. A gének ciklus küszöb (Ct) értékeit a belső kontroll gén (HPRT1) Ct értékéhez normalizáltuk.

3.6.2. Nagy áteresztőképességű fehérje vizsgálat protein-array módszerrel

A fej-nyaki daganatos betegek vérplazmájából 105 különböző, gyulladáshoz hozható fehérje változását vizsgáltuk nagy áteresztőképességű Proteome Profiler Antibody kit (Human XL Cytokine Array Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) segítségével a sugárkezelés előtti és utáni időpontokban. A vizsgálatok során 350 µl plazma mintával inkubáltunk minden egyes array membránt, majd ezt követően biotinilált detektáló antitest koktéllal, majd

Streptavidin-HRP reagenssel inkubáltuk, végül pedig kemilumineszcens detektáló reagenssel láthatóvá tettük a jeleket, amelyet röntgen filmen (CL-XPosure Film, Thermo Scientific, Rockford, United States) rögzítettünk. A különböző intenzitású jelek kiértékelését ImageJ szoftver segítségével végeztük.

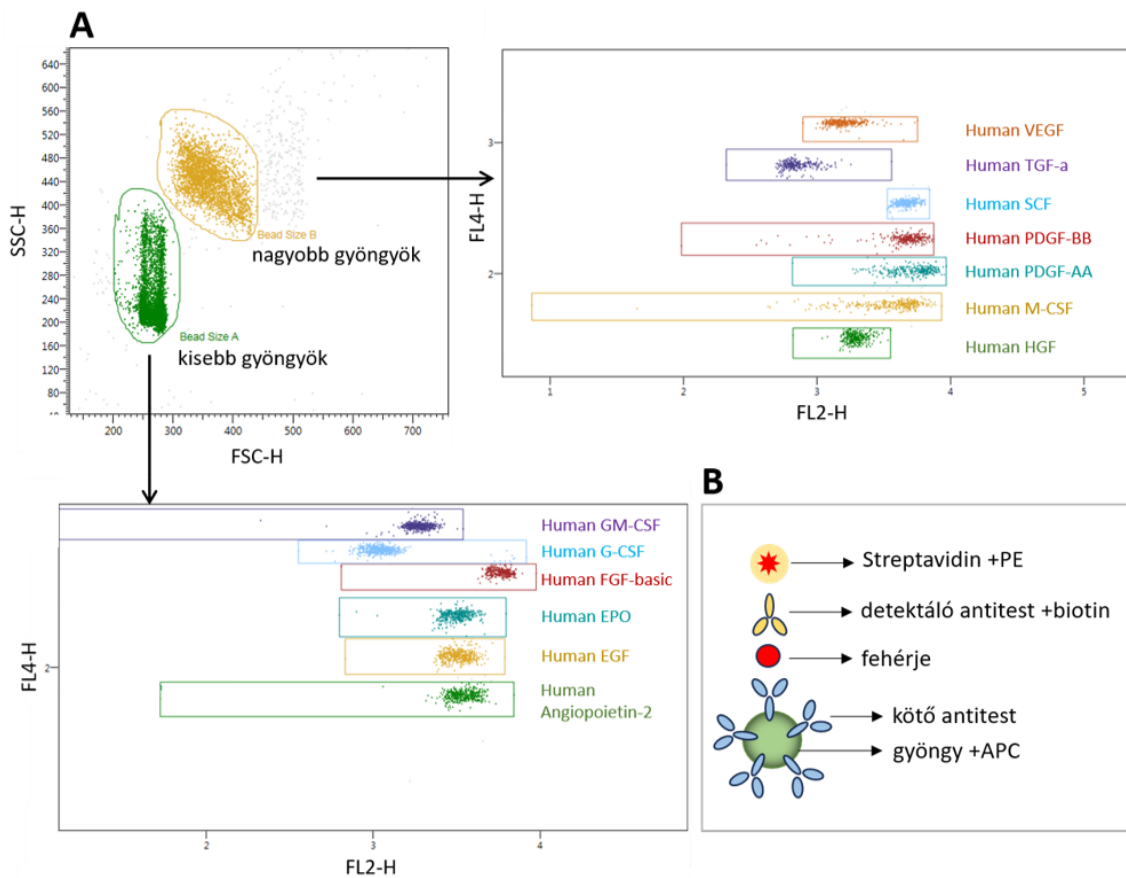
3.6.2.1. Vérplazma fehérjék validálása ELISA módszerrel

A protein-array eredmények alapján a fej-nyaki daganatos betegek vérplazmájában szignifikánsan változott fehérjéket szendvics ELISA technika (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) segítségével validáltuk a gyártói protokoll szerint. Ehhez a már korábban lefagyasztott plazma mintákat felolvasztottuk, majd lecentrifugáltuk (2500 rpm, 25°C, 8 perc), így eltávolítottuk az esetlegesen mintában maradt sejttörmelékeket. Minden mérés során használtunk standard sort, amelynek egyenes egyenletéből határoztuk meg az ismeretlen koncentrációjú beteg plazma mintákban az adott fehérje koncentrációját. A mintákat 450 nm hullámhosszon (570 nm hullámhossz korrekcióval) mértük le spektrofotométer (Biotek, Synergy HT) segítségével a kísérlettel megegyező napon. Az optikai denzitás (OD) értékeket Gen5 2.09 verziójú szoftver segítségével mértük meg, majd a már említett standard sor ismert koncentrációjú és ismert OD értékű tagjaiból felvett görbe segítségével számoltuk ki a fehérjék koncentrációit.

3.6.3. Növekedési faktorok és proinflammatorikus kemokinek vizsgálata vérplazmából LegendPlex módszerrel

LDR brachiterápiában részesült prosztata daganatos betegek (n=18) plazmájából gyöngy alapú fehérje vizsgálatot végeztünk a sugárterápia előtti és utáni időpontokból származó mintákból. Kontroll csoportként korban és nemben illesztett páciensek (n=23) plazmáját használtuk fel. A vizsgálat során kétféle, a gyártó által összeállított LegendPlex panelt (BioLegend, San Diego, CA, USA) használtunk fel, egyikkel 13 különböző növekedési faktort, a másikkal pedig 13 féle proinflammatorikus kemokint tudunk egyszerre vizsgálni. A vizsgált fehérjék listáját, és a nevek rövidítésit a függelék 2. táblázat tartalmazza.

A technika alapja, hogy hat kisebb és hét nagyobb méretű gyöngyből álló mixet inkubálunk együtt a plazma mintákkal. A méretbeli különbségeknek köszönhetően az SSC-FSC grafikonon jól elkülöníthető egymástól a kisebb és a nagyobb méretű gyöngyök csoportja. A gyöngyök a gyártó által hozzájuk konjugált allofikocianin (APC/FL4) fluorokróm intenzitásában is eltérnek egymástól. A kísérlet során pedig fikoeritrin (PE/FL2) fluorokrómmal jelölt Streptavidinnel is inkubáljuk a plazma+gyöngy keverékét. Ezek alapján tudjuk az összesen 13 különböző gyöngy frakciót elkülöníteni egymástól az APC/PE grafikonon. A gyöngyök mindegyikéhez csak az egyik fehérjére specifikus kötő antitest van konjugálva, így válik lehetővé, hogy 13 féle különböző fehérje jelenlétét egyszerre tudjuk vizsgálni ugyan abban a mintában. A másodlagos ellenanyag (detektáló antitest) mennyisége arányos a kötő antitest által megkötött fehérje mennyiségével, így a detektáló antitesthez kapcsolódó Streptavidin+PE átlagos fluoreszcencia intenzitásából számolhatjuk az egyes fehérjék koncentrációját. A gyöngyök kapuzása mind a kétféle panel esetében azonos stratégia szerint történt. A növekedési faktorokat vizsgáló panel kapuzását a 1A ábra szemlélteti, míg egy adott gyöngy sematikus felépítése a 1B ábrán látható.



1. ábra: A LegendPlex módszer során alkalmazott gyöngyök kapuzási stratégiája (A), amellyel 13 féle különböző fehérjét tudunk egyidejűleg vizsgálni. Egy gyöngy, és a hozzá „szendvics” szerűen kapcsolódó kötő antitest, fehérje, biotinilált detektáló antitest és PE-nel jelölt Streptavidin sematikus rajza (B). Forrás: saját ábra.

A mérésekhez a már korábban lefagyasztott plazma mintákat felolvasztottuk, majd lecentrifugáltuk (2500 rpm, 25°C, 8 perc), így eltávolítottuk az esetlegesen mintában maradt sejtörmelégeket. A mintákat az előre összeállított gyöngyök keverékével és a biotinilált detektáló antitesttel inkubáltuk folyamatos forgatás közben. Ezután hozzáadtuk a fikoeritrin (PE/FL2) fluorókrómmal jelölt Streptavidin másodlagos ellenanyagot, amely a minták detektálásának alapjául szolgáló fluoreszcens jelet biztosította. Próbsa mérések alkalmával itt is meghatároztuk a plazma minták hígításának szükséges mértékét, amellyel mind a 13 fehérje egyszerre kimérhető. Az ELISA-hoz hasonló módon ez esetben is használtunk standard sort, mind a 13 fehérjéhez külön, amellyel a mintákban ismeretlen mennyiségben jelen levő fehérjék pontos koncentrációja meghatározható volt. A mintákat áramlási citométerrel mértük le (FACS Calibur, Becton Dickinson, CA, USA) a feldolgozással megegyező napon, az eredményeket pedig a Cell-Quest™ Pro és az Excel programok segítségével végeztük.

3.6.3.1. Vérplazma fehérjék validálása ELISA módszerrel

A LegendPlex módszerrel vizsgált 26 fehérjéből ötnek (PDGA-AA, PDGF-BB, CXCL5/ENA-78, RANTES, VEGF) a változását ELISA technika segítségével validáltuk HDR brachiterápiában részesült prosztata daganatos betegek (n=18) plazmájában. Ezek esetében is a gyártói protokoll szerint jártunk el, és a fent leírtakhoz hasonló módon történt a kiértékelés is.

3.6.4. PBMC-k feldolgozása, az immunsejtek jellemzése áramlási citometriás módszerrel

A folyékony nitrogénben tárolt PBMC minták feldolgozásakor a mintákat 37°C-os vízfürdőben felolvasztottuk, majd 5% FBS-t tartalmazó RPMI-1640 médiumban lecentrifugáltuk (2200 rpm, 8 perc, 4°C). A PBMC-k a cső alján pelletet képeztek, így a felülúszó eltávolításra került. A pelletet 2 ml szérum mentes RPMI médiumban felvettük, majd meghatároztuk a sejtszámot tripánkékes festéssel Bürker-kamrában. A

sejtszám meghatározása után újra lecentrifugáltuk (2200 rpm, 8 perc, 4°C), majd a pelletet annyi staining pufferbe (SB) vettük fel, hogy 100 µl-ben $0,5 \times 10^6$ sejt legyen (8 féle panel esetén 800 µl puffer került a pelletre). Ezt FACS csövekbe szétosztottuk, majd következett a sejtfelszíni markerek fluorokrómokkal konjugált monoklonális antitestekkel történő jelölése (a markerkombinációk részletes leírása a 4.6.3. alfejezeten olvasható). A sejteket az antitestekkel 30 percig inkubáltuk sötétben, 4°C-on. Jelölés után lecentrifugáltuk a szuszpenziót (2200 rpm, 8 perc, 4°C), majd a sejteket 1%-os paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk, és 4°C tároltuk mérésig.

Néhány panel esetében sejten belüli markerek (FoxP3, Ki67, PSA) expresszióját is vizsgáltuk, amelyre a külső markerek megjelölése után került sor. Ehhez fixálni és permeabilizálni kellett a sejteket, amelyhez a kereskedelmi forgalomban kapható kitet használtuk (Foxp3 Fix/Perm Buffer kit, Biolegend, San Diego, CA, USA) a javasolt útmutató szerint. Miután átjárhatóvá vált a sejtek membránja, hozzáadtuk a sejten belüli markereket specifikusan jelölő, fluorokrómokkal konjugált monoklonális antitesteket, és 30 percig inkubáltuk sötétben, szobahőmérsékleten. Ezt követően mostuk, majd 1%-os PFA-val fixáltuk, és 4°C tároltuk mérésig. Az intracelluláris PSA jelöléshez először a többi sejtfelszíni markert jelölő antitesttel együtt fluorokrómmal nem konjugált anti-PSA antitestet is használtunk, amely blokkolta a makrofágok felszínén jelenlevő, aspecifikus PSA-t, majd ezután fixáltuk, permeabilizáltuk, és jelöltük a sejten belüli PSA-t.

Az így megjelölt PBMC-eket áramlási citométer (FACS Calibur, Becton Dickinson, CA, USA, és Cytotflex, Beckman Coulter, CA, USA) segítségével kvantifikáltuk még a jelöléssel megegyező napon. Minden beteg esetében egyszerre jelöltük és mértük a nyomon követés teljes időtartama alatt begyűjtött összes mintáját. A kinyert áramlási citometriás adatokat a CytExpert (Beckman Coulter, CA, USA) és a Kaluza 1.5a elemző programok segítségével végeztük.

A fej-nyaki daganatos betegek esetében egy szűkebb fenotipizálási panel rendszert alkalmaztunk, amellyel vizsgáltuk az effektor és regulátor T limfocitákat és azok funkcionális markereit (CTLA4, PD1, CD39), osztódó T limfocitákat, mieloid eredetű szuppresszor sejteket (MDSC), természetes ölüsejteket és a dendritikus sejteket (mieloid, limfoid). Az LDR csoport egy részében (n=21) még a fent részletezett, szűkebb panelrendszert alkalmaztuk, azonban újabb 10 LDR kezelésben részesült betegen, illetve a többi prosztatata daganatos beteg esetében már egy kibővített

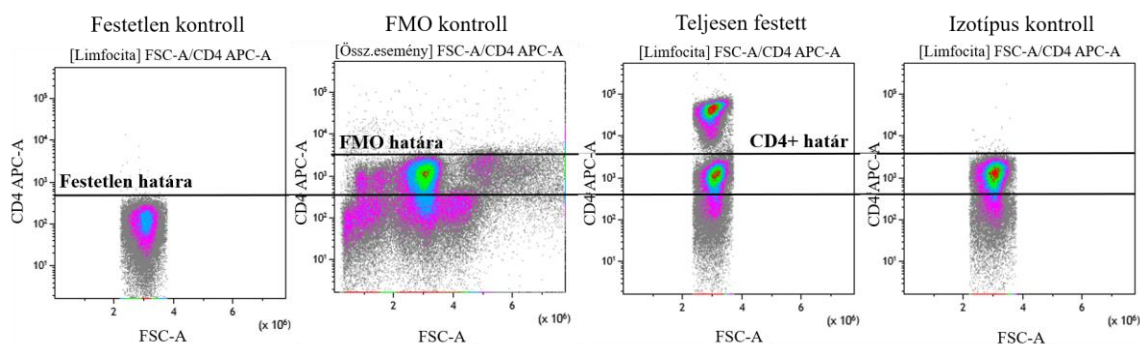
immunfenotipizálást végeztünk. Ennek segítségével különböző érési és funkciójú T limfocitákat (naiv, effektor, citotoxikus, regulátor, aktivált, kifáradt, szeneszcens), memória T sejteket (memória őssejtek, centrális, terminális, effektor, terminális effektor), B limfocitákat (tranzicionális, érett naiv, aktivált, memória), plazma sejteket, természetes ölüssejteket és azok érési és funkcionális alcsoportjait (éretlen, korai érett, érett, degranulált, anergikus NK), dendritikus sejteket (mieloid, limfoid) azonosítottuk be és vizsgáltuk. Monocitákat (klasszikus, átmeneti, nem-klasszikus), PSA-tartalmú makrofágokat, illetve a CD4+, CD8+ T limfociták, Treg sejtek és NK sejtek proliferációs kapacitását pedig csak az újonnan bevont prosztata daganatos betegekben vizsgáltuk (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápia: n=20; Kiber-kés terápia: n=15).

3.6.5. Immunfenotipizálási panelek tervezése, izotípus és fluoreszcencia mínusz egy (FMO) kontrollok alkalmazása

A többszínű („multi-color”) áramlási citometriás panelek tervezésének egyik legkritikusabb lépése a különböző emissziós spektrummal (fénykibocsátási hullámhossz tartománnyal) rendelkező fluorokrómok megfelelő kombinálása. Az egyes emissziós spektrumok különböző mértékben átfedhetnek egymással, ennek minimalizálása a cél. Ugyanis, ha ugyan abban a mintában ugyan azon lézer által gerjesztett és azonos színű fluorokróموkat alkalmazunk, akkor azok elkülönítése nem lehetséges. A CytExpert kiértékelő program segítségével minimális mértékű átfedés utólagos kompenzálására van csak lehetőség.

Ezután beállítottuk minden egyes antitest esetében a fél millió sejt megjelöléséhez minimálisan szükséges antitest mennyiségét (titrálás), majd meghatároztuk az egyes fluorokrómokkal jelölt antitestek pozitív/negatív határait. Ehhez izotípus és fluoreszcencia mínusz egy (FMO) kontrollokat alkalmaztunk. Az izotípus kontrollokat negatív kontrollként használjuk, segítenek elkülöníteni a nem specifikus háttérjelet a specifikus ellenanyag jeltől, nincs releváns specifitásuk a célantigénnel szemben. Fontos, hogy az alkalmazott izotípus kontroll mindig ugyan abból a gazdafajból származzon, ugyan azzal az izotípussal és alosztállyal rendelkezzen, és ugyan azzal a fluorokrómmal legyen konjugálva, mint az elsődleges antitest. Alkalmazásakor a használt antitestek közül mindig az egyik helyett annak izotípus kontrollját tesszük az antitest koktélba. Az FMO kontrollok esetében – ahogyan a neve is utal rá – mindig az

egyik fluorokrómmal jelölt antitestet hagyjuk ki a mérésből, helyére nem teszünk semmit, az összes többi antitestet pedig változatlanul meghagyjuk. A kontrollok mellett mindig használtunk festetlen mintát is, amelybe egy jelölt antitestet sem tettünk. A bemutatott kontrollok segítettek a teljesen festett mintákban meghatározni minden egyes markerek pozitív/negatív határát az alább bemutatott módon (2. ábra).



2. ábra: Festetlen, FMO, teljesen festett és izotípus kontrollok együttes vizsgálatával történt minden egyes marker pozitív/negatív határának beállítása. Ehhez mind a négy kontroll esetében a függőleges tengelyen a vizsgálni kívánt marker (például itt: CD4), míg a vízszintes tengelyen pedig az előre irányuló fényszórás területi dimenziója (Forward Scatter-Area: FSC-A) szerepelt. Forrás: saját ábra.

3.6.6. Fenotipizálási panel rendszerek felépülése

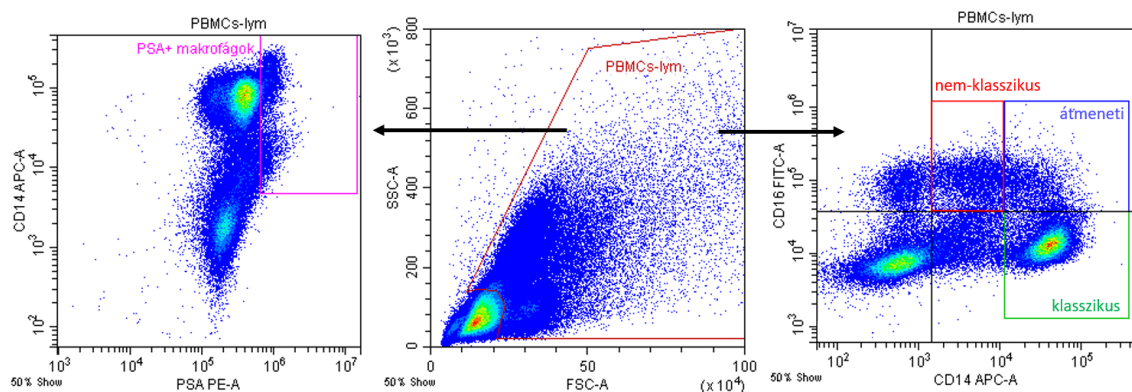
A kezdetben alkalmazott szűkebb fenotipizálási rendszer öt különböző panelből épül fel, amelyekhez maximálisan négyféle különböző fluorokrómmal jelölt monoklonális antitestből álló koktélt alkalmaztunk (függelék 3. táblázat). Ezzel a panellal vizsgált fej-nyaki (n=23) és LDR terápiában részesült prosztatata daganatos beteg (n=21) mintáit FACS Calibur készülékkel mértük le, és a Kaluza elemző szoftver segítségével értékeltük ki.

A kibővített rendszer a korábbira épül, annak tovább fejlesztésével összesen nyolc különböző immunfenotipizálási panelt alakítottunk ki, mindegyikben 7 különböző fluorokrómmal jelölt monoklonális antitestet alkalmaztunk egyszerre (függelék 4. táblázat), melyek segítségével összesen több, mint 40 féle különböző érési és funkcionális immunsejt alpopulációt tudunk egyszerre meghatározni és vizsgálni a betegek perifériás vérében. Ezzel a panellal vizsgált prosztatata daganatos betegek (LDR:

n=10; HDR: n=32; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) mintáit Cytoflex készülékkel mértük le, és a CytExpert elemző szoftver segítségével értékeltük ki.

3.6.6.1. Monociták és PSA+ makrofágok kapuzása

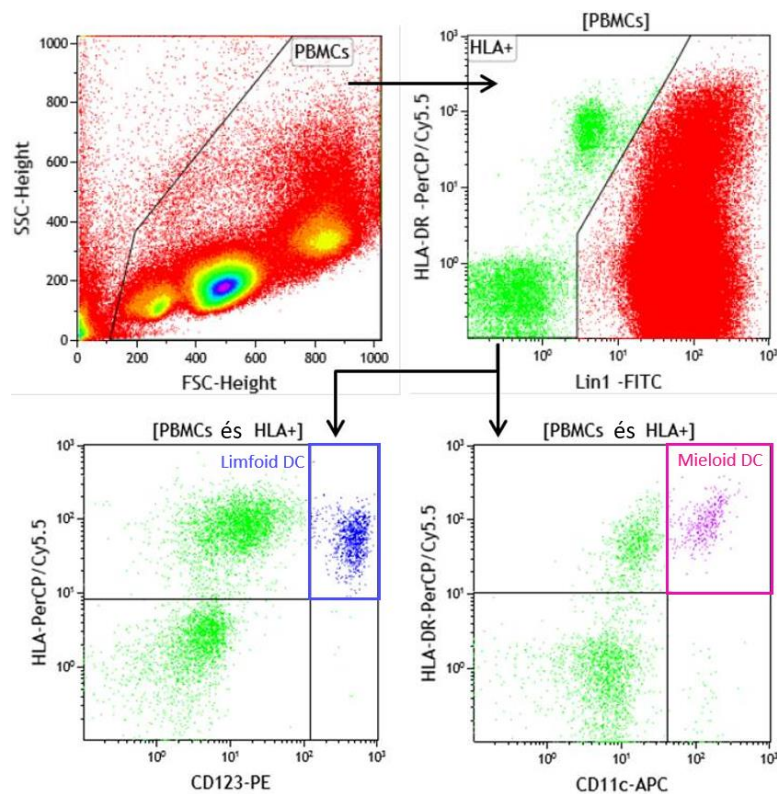
A perifériás vérben keringő monocitáknak három különböző altípusát különítettük el a CD14 és CD16 sejtfelszíni markereik segítségével a teljes PBMC csoportban (amelyből kizártuk a limfociták csoportját). Ezek a klasszikus ($CD14^{magas}CD16^{-}$), átmeneti ($CD14^{magas}CD16^{+}$) és a nem-klasszikus ($CD14^{+}CD16^{magas}$) monocita formák. Továbbá vizsgáltuk a keringő, PSA-tartalmú, CD14+PSA+ dupla pozitív makrofágokat is ugyan abból a kiindulási csoportból (PBMC-ből kivont limfocita csoport) (3. ábra).



3. ábra: Monociták és PSA+ makrofágok kapuzását a limfocitákon kívüli PBMC tartományban végeztük. Klasszikus ($CD14^{magas}CD16^{-}$), átmeneti/intermediált ($CD14^{magas}CD16^{+}$) és nem-klasszikus ($CD14^{+}CD16^{magas}$) monocita formákat, illetve PSA-tartalmú, CD14+PSA+ dupla pozitív makrofágokat vizsgáltuk. Forrás: saját ábra.

3.6.6.2. Mieloid és limfoid eredetű dendritikus sejtek kapuzása

A mieloid és limfoid eredetű dendritikus sejtek meghatározását a teljes PBMC csoporton, majd a Lineage-/HLA-DR+ alcsoporton belül végeztük. Mieloid DC-k CD11c+Lineage-, míg a limfoid DC-k CD123+Lineage- fenotípusúak (4. ábra). A gyártó által készített Lineage1 antitest koktél összetétele: CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 és CD56.



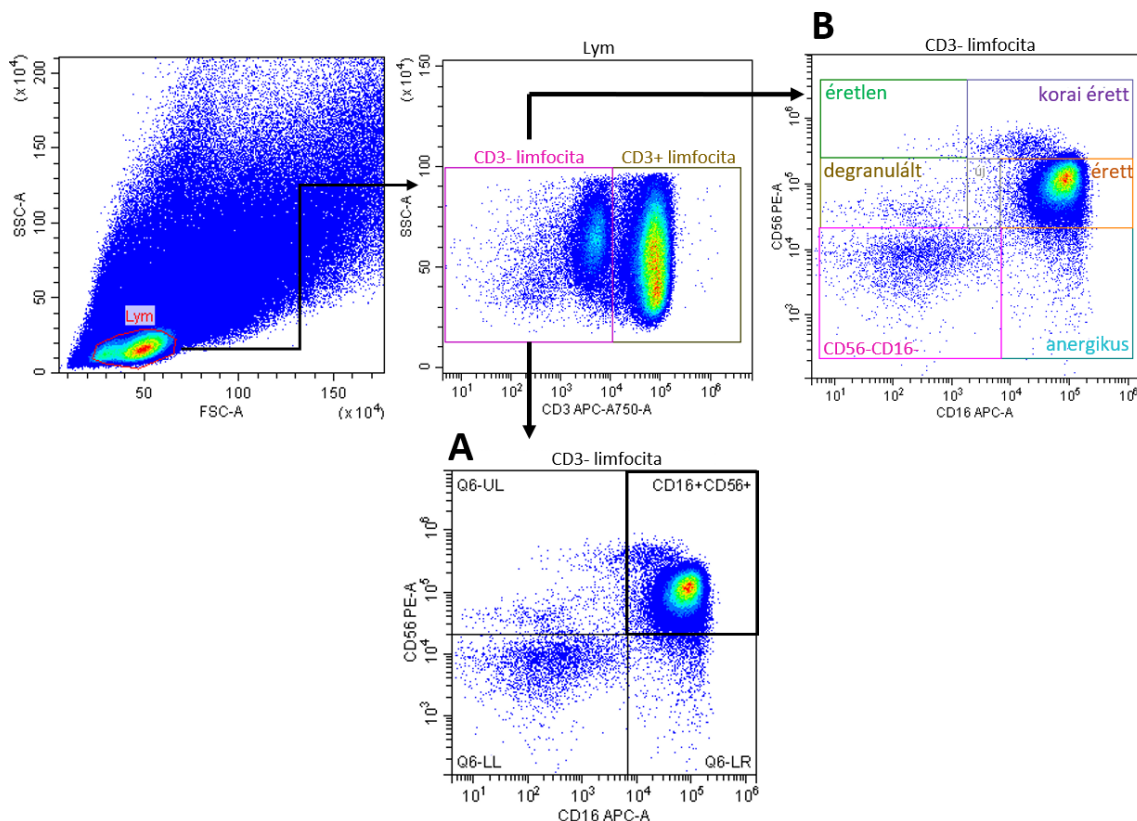
4. ábra: CD11c+ mieloid és CD123+ limfoid eredetű dendritikus sejtek kapuzását a PBMC Lineage-/HLA-DR+ alcsoportján belül végeztük. A mieloid DC-k CD11c+Lineage-, míg a limfoid DC-k CD123+Lineage- fenotípusúak. Forrás: (Balazs, Kis et al. 2019).

3.6.6.3. Természetes ölüsejtek és funkcionális alcsoportjainak kapuzása

A teljes limfociták csoportját (Lym) fizikai paramétereik alapján, az oldalra irányuló (SSC) és az előre irányuló (FSC) fényszórási grafikonon határoztuk meg minden esetben. Az FSC a relatív sejt méretet, míg az SSC a sejtek relatív granuláltságát, illetve komplexitását adja meg. A bemért sejteket méretük és granuláltságuk alapján az SSC-FSC grafikon meghatározott, egymástól eltérő területein detektáljuk. A limfociták kisebb méretűek és kevésbé granuláltak (mint például a monociták, vagy a granulociták), így egyértelműen elkülöníthető a csoportjuk. A limfocitákon belül vizsgáltuk az NK sejteket, illetve a következő alfejezetekben bemutatott különböző T és B limfocita csoportokat.

A természetes ölüsejteket CD16+CD56+ dupla pozitív csoportként határoztuk meg a CD3- limfocita kapunk belül. További öt különböző érési és funkcionális alcsoportját különíthetjük el az NK sejtektől a két említett sejt felszíni marker

különböző expressziós szintje alapján. Ezek az éretlen prekurzorok ($CD56^{magas}CD16^{-}$), éretlen/korai érett alakok ($CD56^{magas}CD16^{alacsony}$), érett citotoxikus ($CD56^{alacsony}CD16^{magas}$), degranulált ($CD56^{alacsony}CD16^{-}$) és az anergikus NK sejtek ($CD56^{-}CD16^{magas}$) (5. ábra).



5. ábra: Természetes ölüsejteket a CD3- limfocitákon belül CD16+CD56+ dupla pozitív csoportként azonosítottuk be (A), majd a különböző funkcionális alcsoportjaik kapuzását a CD16 és CD56 markerek különböző expressziós szintje alapján különítettük el (B). Ezek az éretlen prekurzorok ($CD56^{magas}CD16^{-}$), éretlen/korai érett alakok ($CD56^{magas}CD16^{alacsony}$), érett citotoxikus ($CD56^{alacsony}CD16^{magas}$), degranulált ($CD56^{alacsony}CD16^{-}$) és az anergikus NK sejtek ($CD56^{-}CD16^{magas}$) csoportját azonosítottuk be. A dupla negatív sejtek nem funkcionális alcsoportja az NK sejteknek. Forrás: saját ábra.

3.6.6.4. Osztódó természetes ölüsejtek kapuzása

Az NK sejtek alcsoportjainak osztódási kinetikáját a Ki67 marker expressziójával határoztuk meg (függelék 2. ábra). A Ki67 fehérje a G0 fázis kivételével a sejtciklus minden fázisában kifejeződik a sejtmagban, így expressziójának mérésével

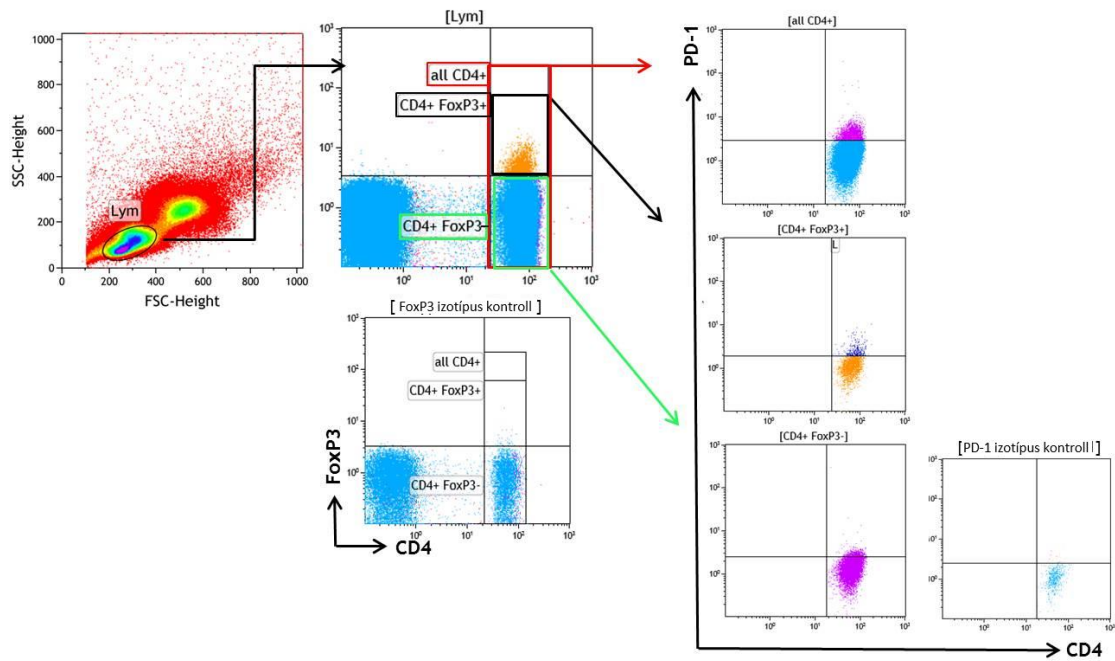
következtethetünk a sejtosztódás tényére és mértékére. Az NK sejtek alcsoportjaiban a Ki67+, azaz osztódó frakciót különítettük el a Ki67- (nyugvó) állapotú alakoktól.

3.6.6.5. A T limfocita alcsoportok kapuzása

A teljes limfociták csoportját, ahogy korábban részleteztem, fizikai paramétereik alapján, az SSC-FSC fényszórási grafikonon határoztuk meg minden esetben. A limfocitákon belül vizsgáltuk a CD3+CD4+ helper és a CD3+CD8+ dupla pozitív citotoxikus T limfocita alcsoportokat, valamint ezek arányát is meghatároztuk. A CD3+ limfocita kapunk belül határoztuk meg a CD4-CD8- dupla negatív T sejteket, a CD4+ és CD8+ limfocitákon belül pedig a CD3- aberráns limfocita arányt (függelék 3. ábra). A CD3+CD4+ és a CD3+CD8+ T sejt csoportokon belül pedig a többi, később részletezett funkcionális T sejt alcsoportokat (regulátor, kifáradt, szenescens, memória) határoztuk meg.

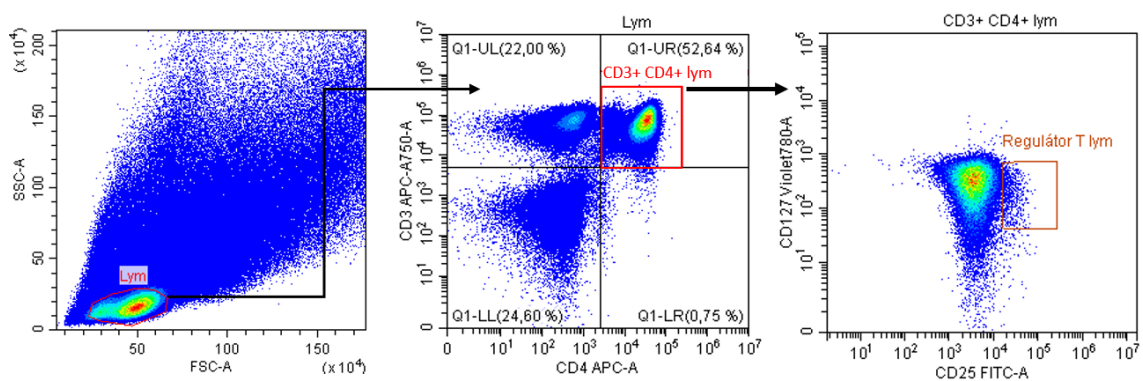
3.6.6.6. Szuppresszív T limfociták kapuzása

A regulátor T sejteket a teljes limfocita kapun belül vizsgáltuk. Beazonosításukhoz a FoxP3 transkripciós faktort használtuk, amely sejten belüli festéshez a korábban leírtak szerint fixálni és permeabilizálni kellett a sejteket. Így CD4+FoxP3+ dupla pozitív sejként azonosítottuk a Treg-eket. A PD1+ T sejt alcsoportot mind a teljes CD4+ T limfocita, mind a CD4+FoxP3+ regulátor T limfocita, mind pedig a CD4+FoxP3- effektor T limfocita csoporton belül meghatároztuk (6. ábra). A CTLA4+ és CD39+ T sejt alcsoportokat ugyan ezen a kapuzási stratégián keresztül vizsgáltuk (ezért külön nem ábrázoltuk).



6. ábra: Szuppresszív T limfociták kapuzását a teljes limfocita csoporton belül végeztük. Meghatároztuk a CD4+FoxP3+ dupla pozitív Treg sejteket, továbbá a PD1+ T sejt alcsoportot mind a teljes CD4+ T limfocita, mind a CD4+FoxP3+ regulátor T limfocita, mind pedig a CD4+FoxP3- effektor T limfocita csoporton belül. Forrás: (Balazs, Kis et al. 2019).

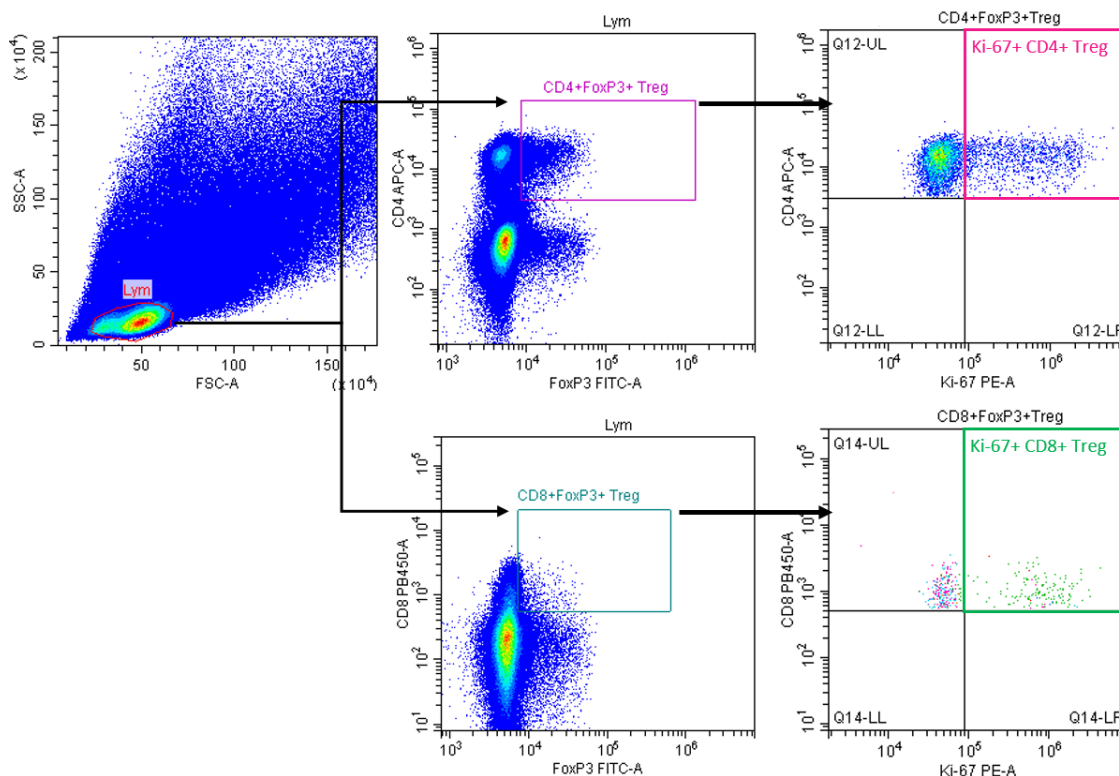
Belső festést nem igénylő módon, a CD25 (IL-2) és a CD127 (IL-7) sejtfelszíni markerek alapján is beazonosítottuk a Treg sejtek csoportját $CD127^{\text{alacsony}}/^-CD25^{\text{+}}/\text{magas}$ fenotípussal. A CTLA4 aktivációs markerek expresszióját a CD4+ T sejtek, és a $CD127^{\text{alacsony}}/^-CD25^{\text{magas}}$ regulátor T limfociták felszínén is meghatároztuk (7. ábra).



7. ábra: A $CD127^{\text{alacsony}}/^-CD25^{\text{magas}}$ sejtfelszíni markerekkel beazonosított regulátor T limfociták kapuzása. Forrás: saját ábra.

3.6.6.7. Osztódó regulátor T sejtek kapuzása

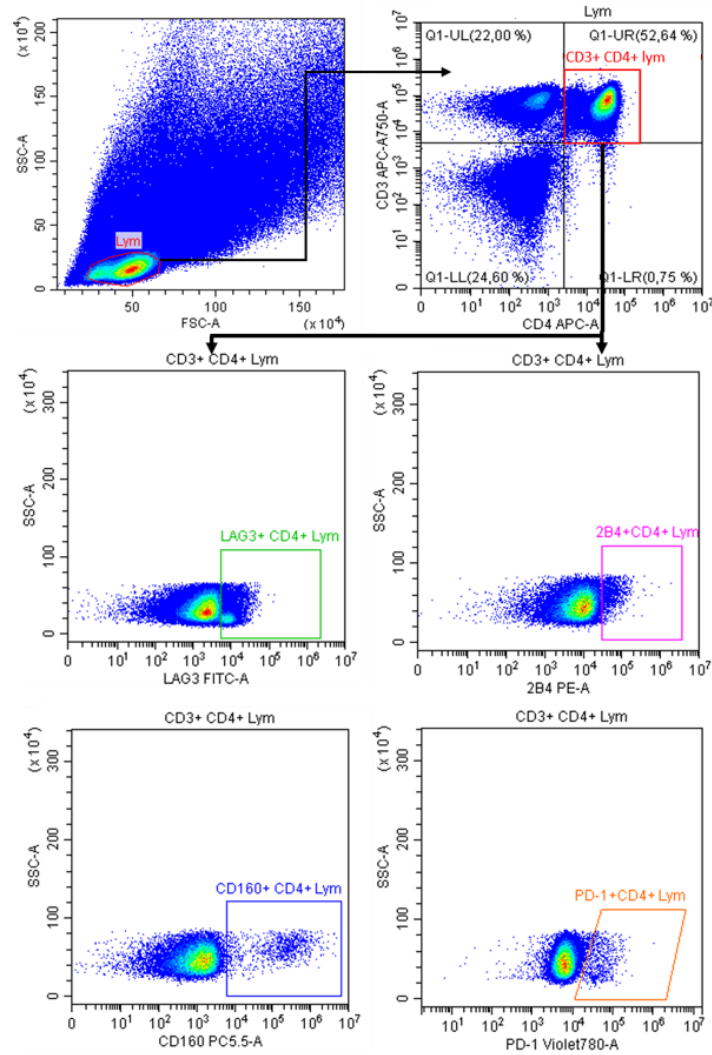
Nem csak a CD4+FoxP3+, hanem a CD8+FoxP3+ Treg sejtek csoportját is vizsgáltuk a teljes limfocita csoporton belül, majd az osztódási kapacitásukat is meghatároztuk mindkettő Treg alcsoportnak a már említett Ki67 sejtben belüli marker expressziója segítségével (8. ábra).



8. ábra: Osztódó regulátor T sejtek kapuzását a teljes limfocita csoporton belül végeztük. A Ki67 marker expressziója segítségével határoztuk meg a Ki67+ osztódó CD4+FoxP3+ és CD8+FoxP3+ Treg sejtek frakcióját. Forrás: saját ábra.

3.6.6.8. Kifáradt T limfociták kapuzása

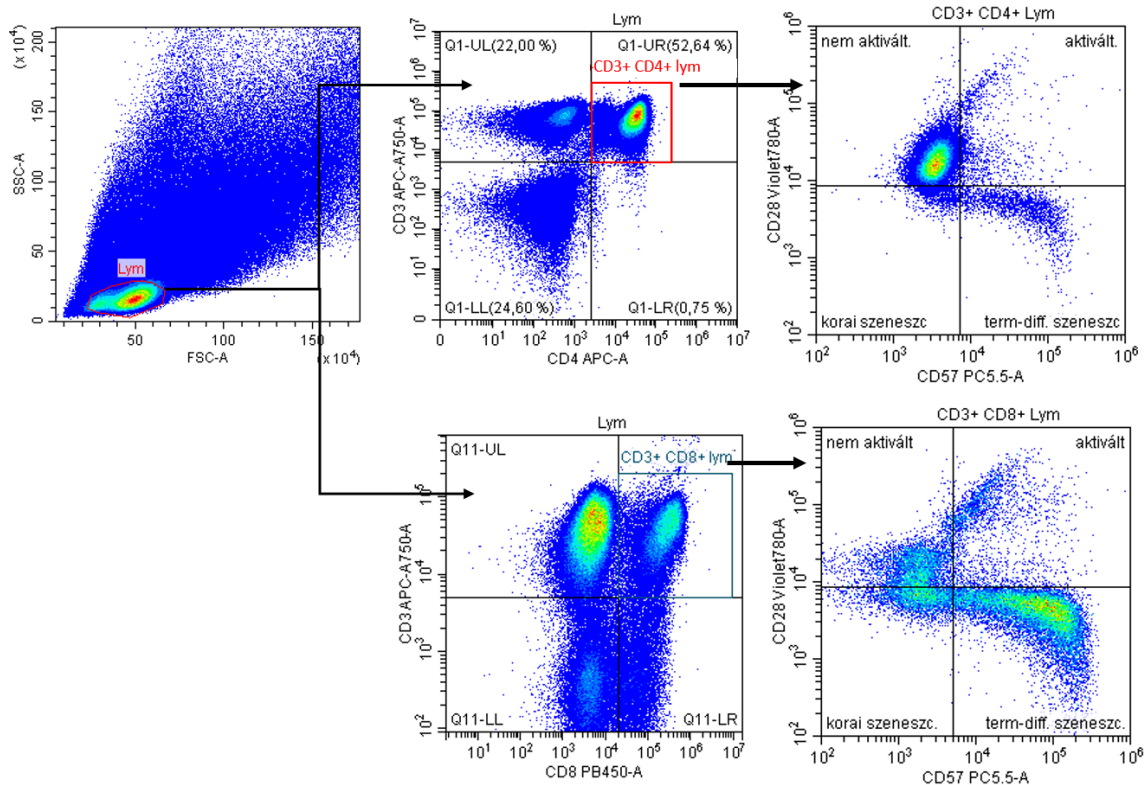
A T limfociták immunológiai kimerülését jelző négy legfontosabb sejtfelszíni markert a teljes limfocita csoporton belül meghatározott CD3+CD4+ és CD3+CD8+ T limfociták kapujában végeztük. Ezek a markerek a LAG3, 2B4, PD1 és a CD160 (9. ábra). A CD3+CD8+ T limfociták kapuzási stratégiáját külön nem ábrázoljuk.



9. ábra: A T limfociták immunológiai kimerülését jelző négy legfontosabb sejtfelszíni markert (LAG3, 2B4, PD1 és a CD160) vizsgáltuk a PBMC csoporton belül meghatározott CD3+CD4+ és CD3+CD8+ (nincs külön ábrázolva) T limfociták kapujában. Forrás: saját ábra.

3.6.6.9. Aktivált és szeneszscens T limfociták kapuzása

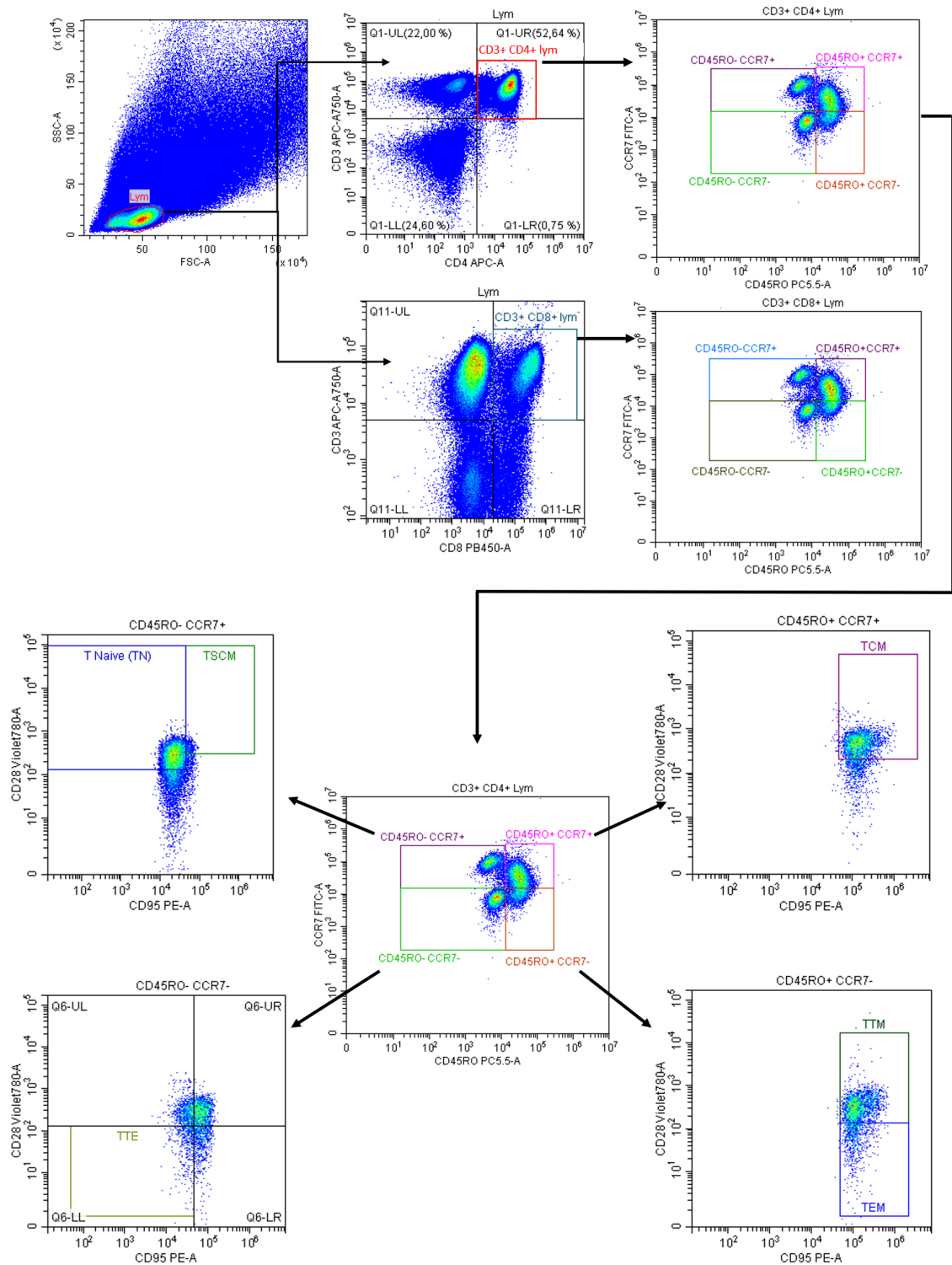
A CD28 és a CD57 sejtfelszíni markerek alapján négy különböző funkcionális alcsoportra bontható mind a CD3+CD4+, mind a CD3+CD8+ T sejtek csoportja a teljes limfocita kapun belül. Ezek a nem/korai aktivált (CD28+CD57-), aktivált (CD28+CD57+), aktivált/korai szeneszscens (CD28-CD57-) és a véglegesen differenciálódott szeneszscens T sejtek (CD28-CD57+) csoportja (10. ábra). T sejtek. A Tim3 és KLRG1 gátló receptorok expresszióját a CD3+CD4+ T sejtek csoportján belül vizsgáltuk.



10. ábra: Aktivált és szeneszicens T limfociták kapuzása. Négy különböző funkcionális alsopontra bontható mind a CD3+CD4+, mind a CD3+CD8+ T sejtek csoportja a teljes limfocita kapun belül. Ezek a nem/korai aktivált (CD28+CD57-), aktivált (CD28+CD57+), aktivált/korai szeneszicens (CD28-CD57-) és a véglegesen differenciálódott szeneszicens T sejtek (CD28-CD57+). Forrás: saját ábra.

3.6.6.10. Naiv és memória T limfociták kapuzása

A naiv és memória T sejtek beazonosítását a teljes limfocita csoporton belül végeztük. Először beazonosítottuk a CD45RO memória T sejt markert és a CCR7 kemokin receptort expresszáló és nem expresszáló alsoportokat (CD45RO-CCR7+, CD45RO+CCR7+, CD45RO-CCR7-, CD45RO+CCR7-) mind a CD3+CD4+, mind a CD3+CD8+ T limfocitákon belül. Ezt követően a négy frakción belül a CD95 és CD28 sejt felszíni markerek segítségével azonosítottuk be az alábbi funkcionális csoportokat: naiv T sejtek (TN: CD45RO-CCR7+CD95-CD28+), memória T őssejtek (TSCM: CD45RO-CCR7+, CD95+CD28^{magas}), centrális memória T sejtek (TCM: CD45RO+CCR7+CD95+CD28+), terminális memória T sejtek (CD45RO+CCR7-CD95+CD28+), effektor memória T sejtek (TTM: CD45RO+CCR7-CD95+CD28-) és a terminálisan effektor T sejtek (TTE: CD45RO-CCR7-CD95-CD28-) (11. ábra).

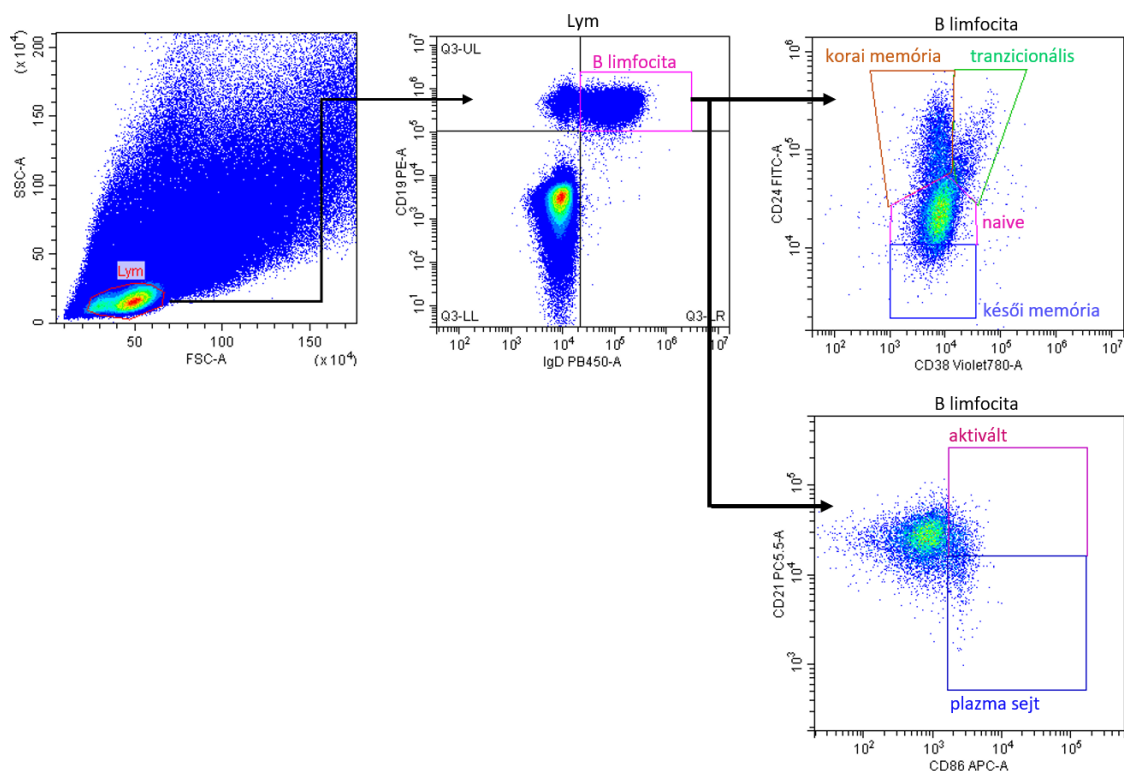


11. ábra: Naiv és memória T limfociták kapuzása a teljes limfocita csoporton belül. Az egyes alcsoportok beazonosítása mind a CD3+CD4+, mind a CD3+CD8+ T limfociták esetében azonos kapuzási stratégia szerint történt, így csak a CD3+CD4+ vonalat ábrázoljuk. A beazonosított csoportok a naiv T sejtek (TN: CD45RO-CCR7+CD95-CD28+), memória T őssejtek (TSCM: CD45RO-CCR7+, CD95+CD28^{magas}), centrális

memória T sejtek (TCM: CD4RO+CCR7+CD95+CD28+), terminális memória T sejtek (TTM: CD45RO+CCR7-CD95+CD28+), effektor memória T sejtek (TEM: CD45RO+CCR7-CD95+CD28-) és a terminálisan effektor T sejtek (TTE: CD45RO-CCR7-CD95-CD28-). Forrás: saját ábra.

3.6.6.11. B limfociták és funkcionális alcsoportjainak kapuzása

A B limfocitákat CD19+IgD+ dupla pozitív fenotípussal azonosítottuk be a teljes limfocita kapun belül. Az így kikapuzott B limfocitákat két marker páros segítségével hat különböző érési és funkcionális alcsoportra osztottuk. A CD24 és CD38 markerekkel azonosítottuk be az éretlen/tranzicionális B sejteket (CD19+IgD+CD24^{magas}CD38^{magas}), érett, naiv B sejteket (CD19+IgD+CD24+CD38+), illetve a memória B limfocitákat (korai formák: CD19+IgD+CD24^{+/magas}CD38-, késői formák: CD19+IgD+CD24-CD38-). A CD21 és CD86 markerekkel pedig az aktivált B sejteket (CD19+IgD+CD21+CD86+) és az ellenanyagtermelő plazma sejteket (CD19+IgD+CD21^{alacsony}CD86+) frakciója kerültek meghatározásra (12. ábra).

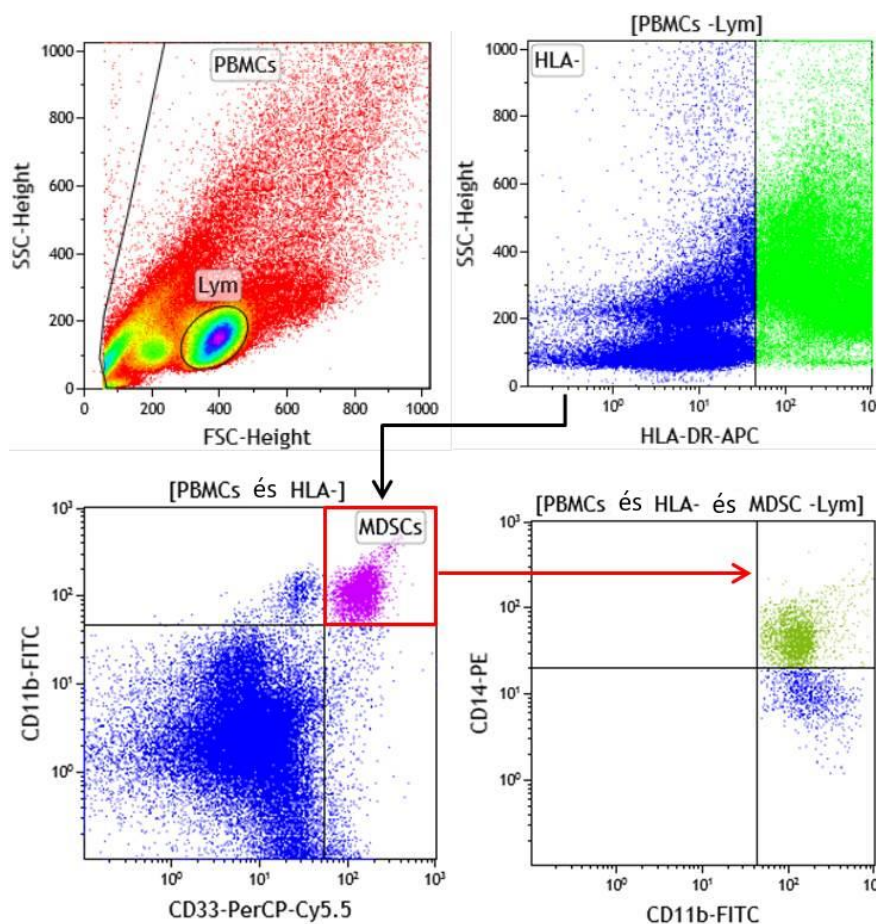


12. ábra: B limfociták (CD19+IgD+) érési és funkcionális alcsoportjainak kapuzását a teljes limfocita csoporton belül végeztük. Ezek az éretlen/tranzicionális B sejtek (CD19+IgD+CD24^{magas}CD38^{magas}), érett, naiv B sejtek (CD19+IgD+CD24+CD38+),

aktivált B sejtek (CD19+IgD+CD21+CD86+), plazma sejtek (CD19+IgD+CD21^{alacsony}CD86+) és a memória B sejtek (korai: CD19+IgD+CD24^{+/magas}CD38-, késői: CD19+IgD+CD24-CD38-). Forrás: saját ábra.

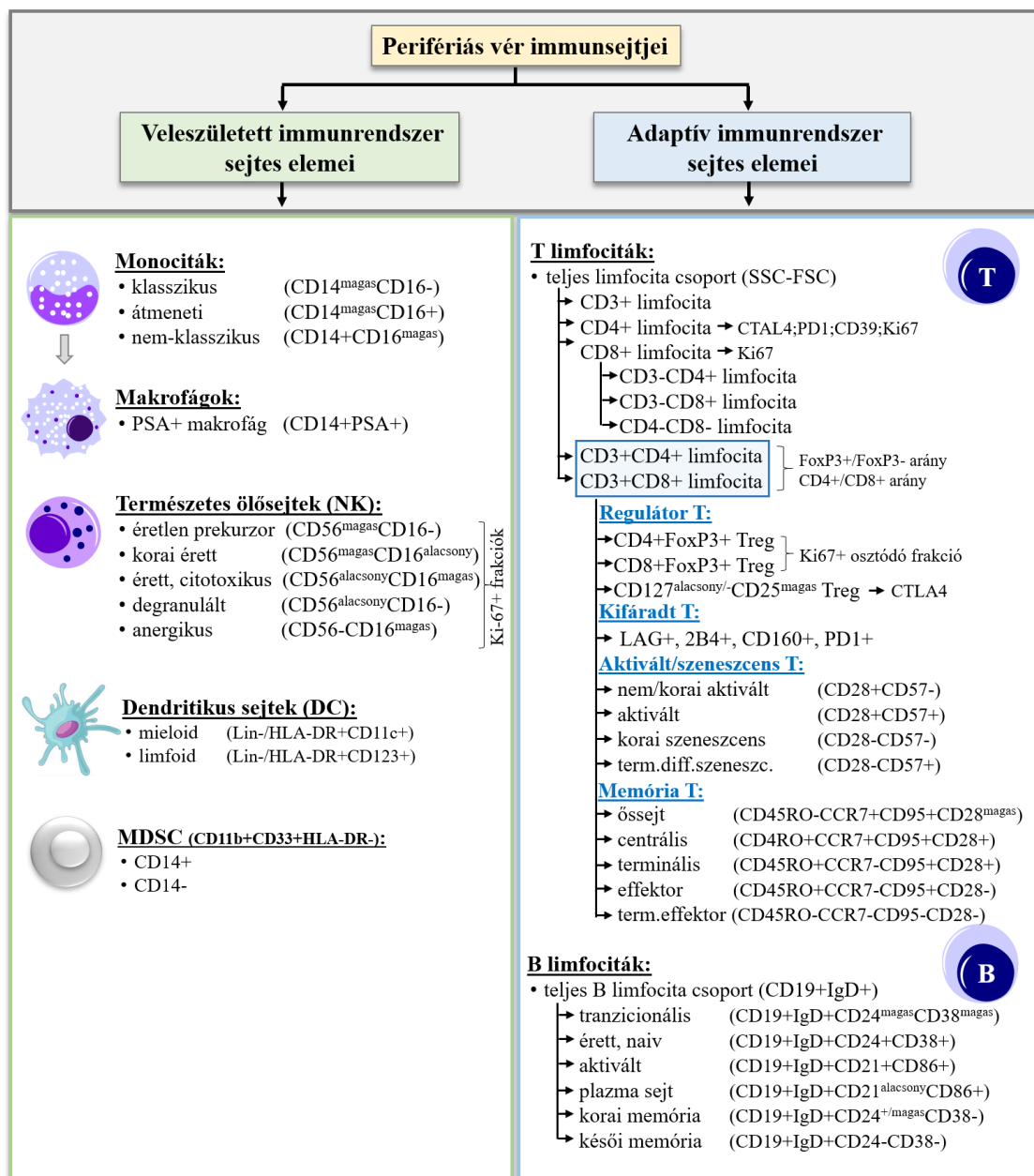
3.6.6.12. Mieloid eredetű szuppresszor sejtek kapuzása

A CD11b+CD33+HLA-DR- mieloid eredetű szuppresszor sejteket a teljes PBMC tartományon belül vizsgáltuk, amelyből levontuk a limfociták csoportját. A CD14 markert expresszáló, és nem expresszáló alcsoportját a CD11b+CD33+HLA-DR-MDSC csoporton belül határoztuk meg (13. ábra).



13. ábra: Mieloid eredetű szuppresszor sejtek kapuzását a limfocitákat nem tartalmazó PBMC-k csoportján belül határoztuk meg. CD11b+CD33+HLA-DR- fenotípusú MDSC-k CD14 markert expresszáló, és nem expresszáló alcsoportjait is elkülönítettük. Forrás: (Balazs, Kis et al. 2019).

Az alábbi ábra foglalja össze a tanulmányban vizsgált veleszületett, és adaptív immunrendszer sejtjeit, és azok beazonosításához használt markereket (14. ábra).



14. ábra: A tanulmányban vizsgált veleszületett, és adaptív immunrendszer sejtjes elemeit, és azok beazonosításához használt markereket tartalmazó összefoglaló ábra. Forrás: saját ábra.

3.6.7. Statisztikai vizsgálatok

A vizsgált gének expressziós szintjének változását párosított t-teszttel vizsgáltuk a terápia előtti, közvetlenül terápia utáni, és egy hónappal későbbi időpontok között. A statisztikai vizsgálatok elkészítéséhez és az eredmények ábrázolásához GraphPad Prism 6.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verziójú szoftvert használtuk. A

grafikonokon függőleges vonal jelzi a szórást (standard deviation: SD). Az áramlási citometriás és ELISA eredmények esetében a csoportok közötti változások vizsgálatához felhasznált statisztikai próba szintén t-teszt volt (páros és párosítatlan), illetve az adatsorok közötti összefüggések vizsgálatához Pearson és Spearman-féle korrelációt használtunk. A statisztikai vizsgálatokat és az eredmények ábrázolását szintén GraphPad Prism 6.00 szoftver segítségével végeztük. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a „p”-érték kisebb volt, mint 0,05 (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). A t-tesztek esetében 95%-os konfidencia intervallumot alkalmaztunk minden esetben.

A négy prosztata daganatos betegcsoport áramlási citometriás eredményeit összehasonlító oszlopdiagramokon az egyes oszlopok a sejtpopulációk százalékos arányának átlagát jelentik. Ezt a fajta ábrázolási módot a nagy mennyiségű adat könnyebb értelmezhetősége és vizualizálhatósága indokolta. Az változásokat a piros oszloppal jelzett, korban-nemben illesztett kontroll csoporthoz, és a kezelés előtti értékekhez egyaránt viszonyítottuk párosítatlan t-teszttel. Az oszlop diagrammokon piros csillag a kontroll csoporthoz, míg a fekete csillag a kezelés előtti értékhez viszonyított szignifikáns változást jelöli. A vízszintes irányú kapocs jelzi a csoportok közötti szignifikáns különbséget, illetve az oszlopokon látható függőleges vonal jelzi az adatsorok szórását (ezeket az információkat nem tüntettük fel minden ábra alatt).

Továbbá vizsgáltuk az egyes markerek medián fluoreszcencia intenzitását (MFI) is, hogy megállapíthassuk az adott marker expressziós szintjét és változását.

3.6.8. Etikai engedélyek

A fej-nyaki daganatos betegek vizsgálatához az etikai engedélyt a Maria Sklodowska-Curie Itézet Etikai Bizottsága (27/2015-18/08/2015), és a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács Etikai Bizottsága (16738-2/2015/EKU) adta. A prosztata daganatos betegek vizsgálatát pedig a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács Etikai Bizottsága (16738-2/2015, 20042-4/2016, 20542-2/2019) engedélyezte.

4. Eredmények

4.1. A fej-nyaki daganatos betegek eredményei

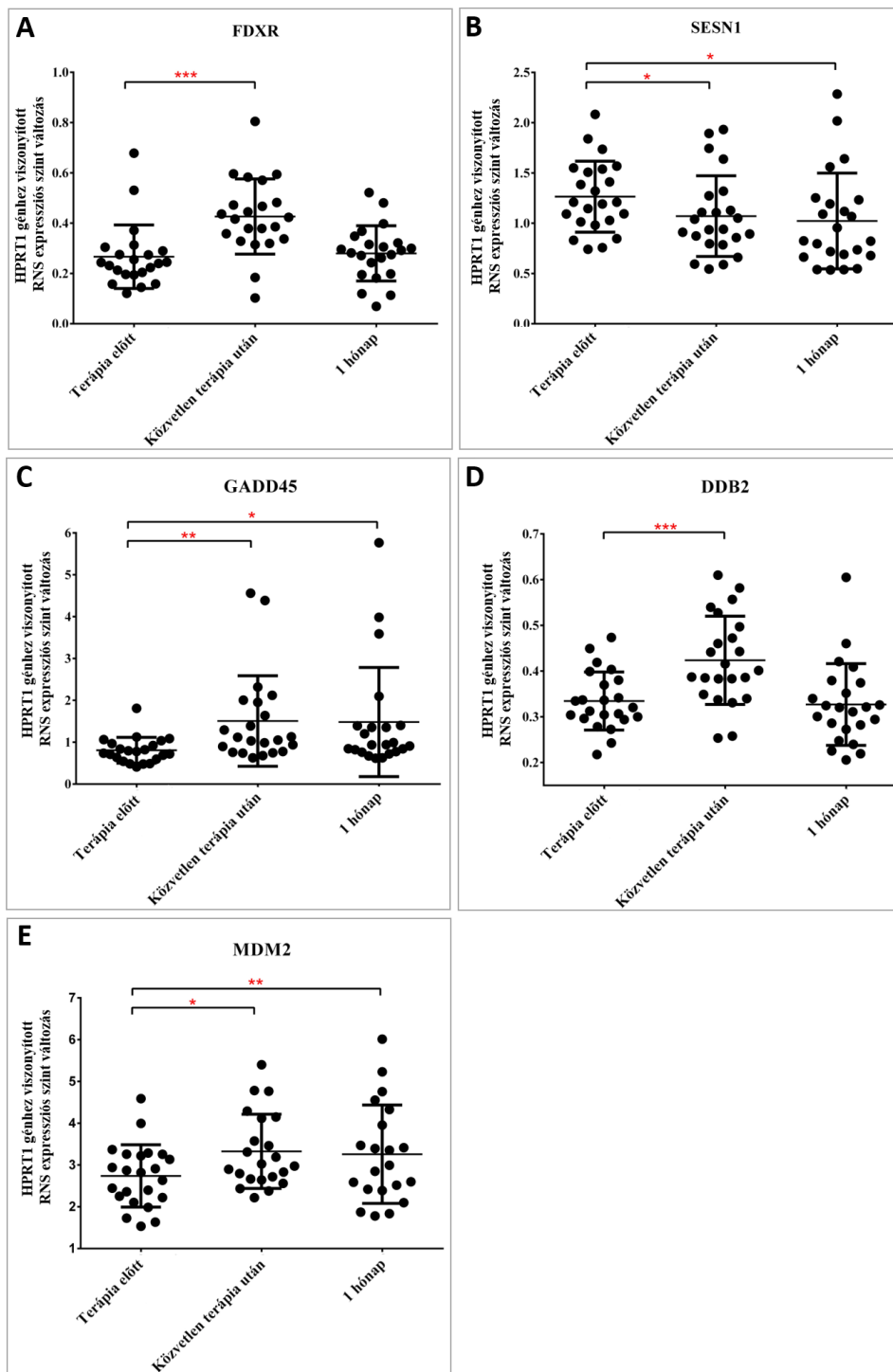
4.1.1. A betegek klinikai paraméterei

Az intenzitás modulált sugárterápiában részesült 23 fej-nyaki daganatos beteg (életkor: 43-79) klinikai adatait, beleértve a tumor lokalizációját, TNM klasszifikációt, AMR besorolást, a leadott teljes dózist, a frakciók számát és a frakciónként leadott dózis nagyságát, valamint a terápiára adott választ a függelék 5. táblázat foglalja össze. A fej-nyaki daganatos csoport már lepublikált eredményeit (Balazs, Kis et al. 2019) a következő alfejezetekben szeretném bemutatni.

A kapott teljes dózis nagysága alapján három csoportba sorolhatók a betegek: 51–52,8 Gy (n=7); 57,6–60 Gy (n=7); 64,8–74 Gy (n=9). A betegcsoport kisebb része (n=5) 3 Gy dózist kapott frakcióként, összesen 17 alkalommal, míg a csoport nagyobb része (n=18) kisebb dózisokat kapott (1,6-2,2 Gy), de több frakcióban (30-40). A sugárzás indukálta akut mukozális reakció (AMR) mértékének nyomon követése is megvalósult a betegeken. A páciensek közel felénél (48%) a legsúlyosabb (AMR=3) reakciók jelentkeztek, például lassabban gyógyuló nyálkahártya fekélyesedés és gyulladásoos reakciók. AMR=2 tünetek 39%-ban, míg a legenyhébb AMR=1 tünetek 9%-ban jelentkeztek. Egyetlen egy betegnél nem jelentkeztek nyálkahártyát érintő panaszok (AMR=0). A terápiára adott korai választ egy hónappal a kezelést követően 0-tól 6-ig terjedő skálán értékeltük (0: nincs adat, 1: komplett tumor választ, 2: részleges tumor válasz, 3: nincs tumor válasz, 4: helyi kiújulás, 5: nyirokcsomói kiújulás, 6: teljes kiújulás gyanúja). A betegcsoport nagy részében (n=18) komplett tumor választ detektáltak, azaz a daganat tünetei eltűntek a sugárkezelés hatására. Egy beteg esetében nem volt detektálható tumorválasz, két betegnél helyi kiújulás lépett fel, egy beteg esetében nyirokcsomói kiújulást azonosítottak, míg egy másik betegnél a teljes kiújulás gyanúja állt fent egy hónappal a terápia után. Az elsődleges tumor méretet a TNM besorolás alapján határoztuk meg: a betegek 30%-a T1, 39%-a T2, 13%-a T3 és 17%-a T4 stádiumban volt a terápia előtt. Gyenge pozitív korrelációt találtunk az AMR súlyossága és a teljes leadott dózis nagysága ($r=0,2652$), és az AMR és a frakciónként leadott dózis nagysága között ($r=0,3368$).

4.1.2. Perifériás vérsejtek gén expressziós profiljának vizsgálati eredményei

A vizsgált gének (DDB2, GADD45, SESN1, FDXR, MDM2) a sugárérzékenységgel összefüggésbe hozható gének. Expressziós szintjüket qRT-PCR segítségével vizsgáltuk a sugárterápia megkezdése előtt, közvetlenül az utolsó frakció leadása után, majd egy hónappal a terápia végét követően. Mindegyik gén expressziós szintje szignifikáns változást mutatott közvetlenül a terápia után (az utolsó frakció után körülbelül 6 órán belül). Az FDXR, GADD45, DDB2 és az MDM2 gének expressziója megnőtt, míg a SESN1 gén expressziója lecsökkent kezelés után a kezelés előtti értékhez képest. Egy hónappal a terápia után az FDXR és a DDB2 gének expressziója a kezelés előtti szintre csökkent vissza, azonban a három másik gén expressziós szintje a megváltozott szinten maradt, amely egy hosszan tartó, sugárzás indukálta gén expressziós szabályozási zavarra utalhat (15. ábra).



15. ábra: Intenzitás modulált sugárterápiával kezelt fej-nyaki daganatos betegek (n=23) perifériás vérséjtjeiben vizsgált FDXR, SESN1, GADD45, DDB2 és MDM2 gének expressziós szintjének relatív (HPRT1 génhez viszonyított) változása terápia előtt, közvetlen terápia után, és egy hónappal a kezelést követően. Minden pont egy adott beteg értékét jelöli. Szignifikáns változásokat a piros csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: p

< 0,01; ***: $p < 0,001$). A vízszintes vonal a csoport átlagát, míg a függőleges vonal az adatsor szórását jelzi. Forrás: (Balazs, Kis et al. 2019).

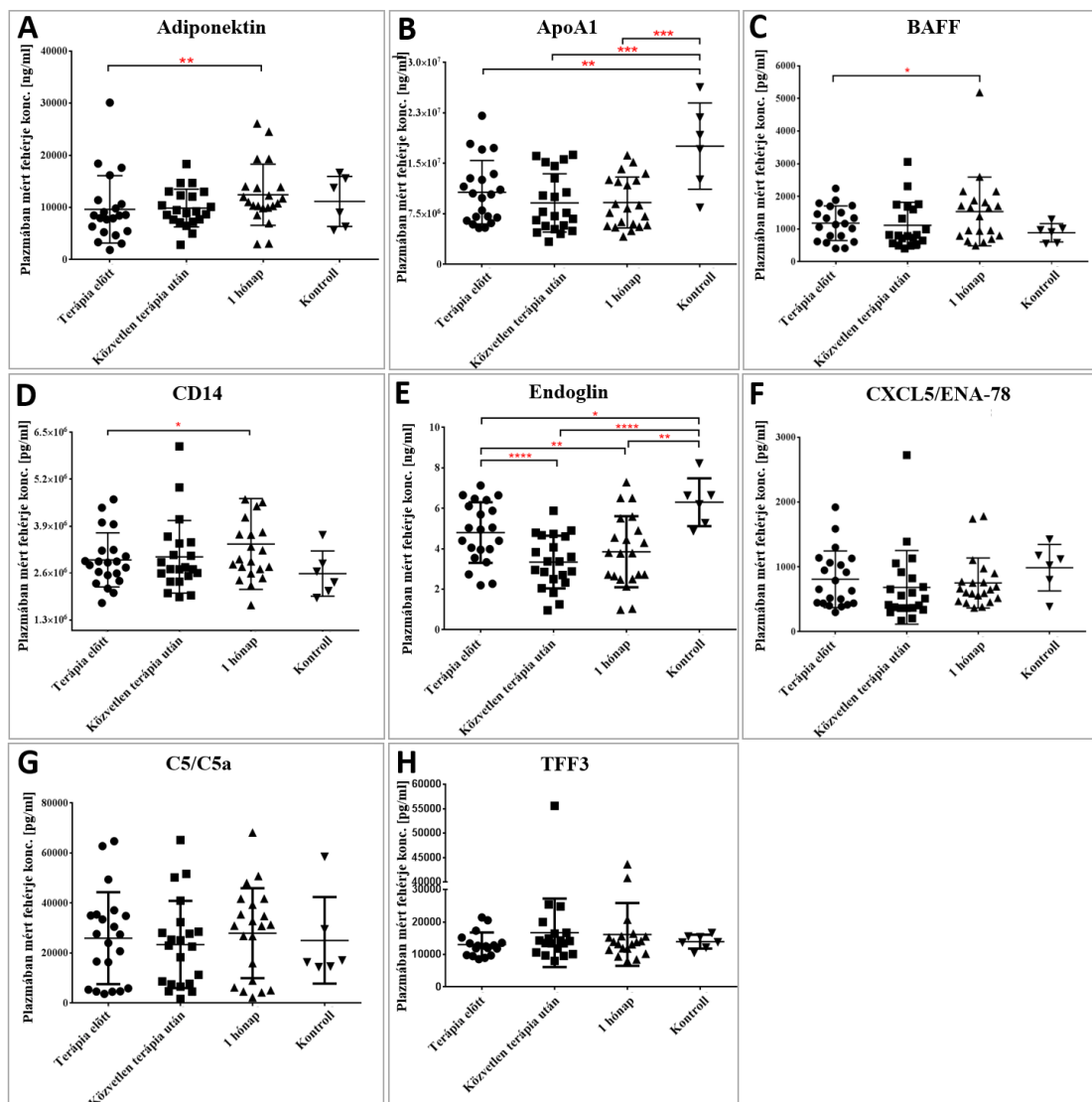
4.1.3. A vérplazma fehérjeprofil vizsgálatának eredménye protein array technikával

A nagy áteresztő képességű plazma fehérje profil vizsgálat során 105 gyulladáshoz kapcsolódó fehérje változását vizsgáltuk a fej-nyaki daganatos betegek egy kisebb csoportjában (n=11) kezelés előtt, közvetlen és egy hónappal a terápia utáni időpontokból származó mintákban. A vizsgálat célja egy szemi-kvantitatív előszűrés volt, amelynek során megvizsgáltuk, hogy mely fehérjék szintje változik szignifikánsan a sugárterápia hatására. A terápia utáni időpontokban a kezelés előtti értékekhez képest szignifikáns változást nyolc fehérje esetében találtunk; az Acrp3, BAFF, ENA-78, C5a növekvő, míg az ApoA1, CD105 és TFF3 csökkenő tendenciát mutat a terápia utáni időpontokban. A szignifikánsan változott fehérjék nevét rövidítésükkel együtt, illetve a változás irányát a függelék 9. táblázat foglalja össze. A TFF3 fehérje esetében a változás közel szignifikáns volt közvetlen a terápia utáni időpontban.

4.1.4. A protein array validálása ELISA technikával

A protein-array eredmények alapján a fej-nyaki daganatos betegek (n=23) vérplazmájában szignifikánsan változott fehérjéket szendvics ELISA technika segítségével validáltuk (16. ábra). A kezelés előtti időpontban az ApoA1 és az endoglin fehérje szintje alacsonyabb értéket mutat a kontroll csoporthoz képest (előbbi 1,6-szoros, míg utóbbi 1,3-szoros csökkenést mutatott), amely feltételezhetően a tumoros státusszal összefüggő változás. A sugárterápia nem befolyásolta az ApoA1 szintjét, amely szignifikánsan alacsony maradt kezelés után egy hónappal is, míg az endoglin fehérje szintje még tovább csökkent sugárterápia után a kezelés előtti szinthez képest, és ezen a szignifikánsan alacsonyabb szinten maradt egy hónappal később is. Az Adiponektin és a BAFF fehérje szintje nem változott a betegekben kezelés előtt a kontrollhoz képest, azonban egy hónappal a terápia után szintjük megemelkedett (előbbi 1,3-szoros, míg utóbbi 1,65-szörös növekedést mutatott) a kezelés előtti értékhez képest. Ezekhez hasonló tendenciát mutatott a CD14 fehérje változása. Az ENA-78, a C5a és TFF3 fehérjék nem mutattak szignifikáns változást sem a kontroll, sem a kezelés

előtti értékhez képest. Az ELISA módszerrel kapott eredményeket összehasonlítva a fehérje array technikával kapott eredményekkel elmondható, hogy az Acrp3, ApoA1, BAFF, CD14, és az endoglin fehérje mennyiségi változását az ELISA technikával sikerült megerősíteni, míg az C5a esetében kapott szignifikáns változást nem tudtuk validálni ELISA-val. Az ENA-78 és TFF3 fehérjék esetében pedig egyik technikával sem kaptunk szignifikáns változást sem a kontroll, sem a kezelés előtti szinthez képest sem.



16. ábra: Intenzitás modulált sugárterápiával kezelt fej-nyaki daganatos betegek (n=23) plazmájában ELISA technikával vizsgált, különböző immunológiai és gyulladásos folyamatokhoz kapcsolódó fehérjék változása kezelés előtti és utáni időpontokban. A betegekben mért koncentrációkat kontroll csoport (n=6) értékeihez is viszonyítottuk.

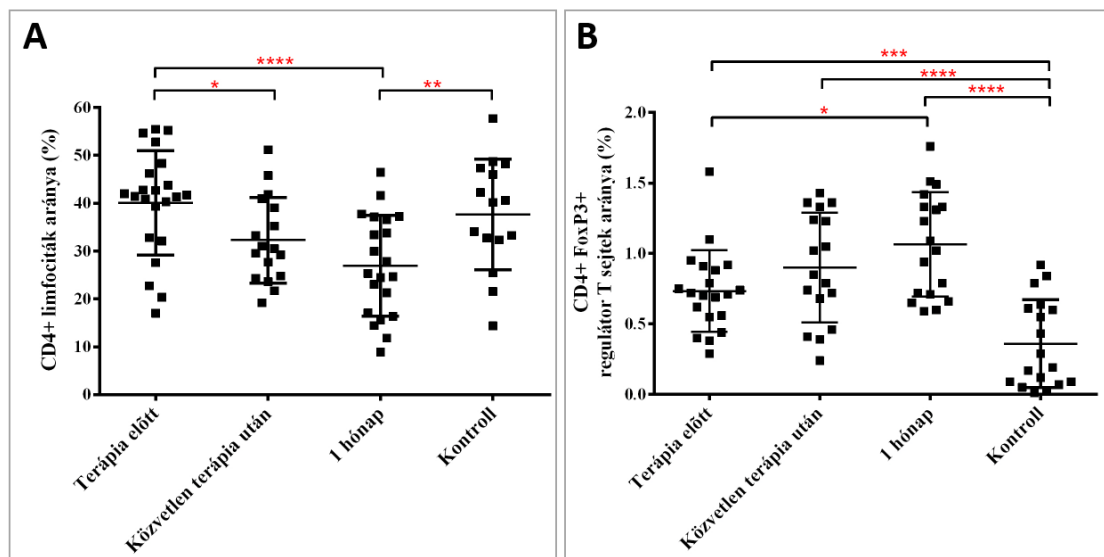
Minden pont egy adott beteg értékét jelöli. Szignifikáns változásokat a piros csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). A vízszintes vonal a csoport átlagát, míg a függőleges vonal az adatsor szórását jelzi. Forrás: (Balazs, Kis et al. 2019).

4.1.5. A veleszületett és adaptív immunrendszer sejtjes elemeinek változása

Vizsgáltuk a fej-nyaki daganatos betegek ($n=23$) perifériás vér mononukleáris sejtjeinek fenotipikus változásait a sugárterápia megkezdése előtti, közvetlenül azutáni, illetve egy hónappal későbbi időpontból származó mintákban egyaránt áramlási citometriás módszerrel. A betegek különböző időpontjaiban mért változásait egészséges kontroll csoporthoz ($n=18$) viszonyítottuk, továbbá vizsgáltuk a betegek egyes időpontjai közötti változás mértékét is. A felhasznált fenotipizálási panelok (függelék 3-4. táblázat) segítségével vizsgáltuk a $CD4^+$ limfocitákat, a $FoxP3^+$ Treg sejteket, továbbá T sejt aktivációs markereket, a T sejtek proliferációs státuszát, dendritikus sejteket és a mieloid eredetű szuppresszor sejteket csoportját.

4.1.5.1. $CD4^+$ T limfociták és $FoxP3^+$ regulátor T limfociták változása

A $CD4^+$ limfociták szintje nem változott szignifikánsan a betegekben a kezelés előtt a kontroll csoporthoz képest, azonban közvetlenül a terápia után 20%-kal lecsökkent a szintje a kezelés előtti értékekhez képest, majd egy hónappal később további szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a szintjében. Sugárzás hatására tehát a cirkuláló $CD4^+$ limfociták homeosztázisa károsodott, amely egy hónappal a terápia után sem normalizálódott (17A ábra). A $CD4^+FoxP3^+$ Treg sejtek frakciója a kontroll csoportban alacsony volt (átlagosan 0,36%), és magas volt az egyének közötti variáció. A betegekben mért Treg arány duplája volt a kezelés előtt a kontroll csoporthoz képest, majd a sugárterápia további progresszív növekedést eredményezett a szintjében minkét terápia utáni időpontban (17B ábra).



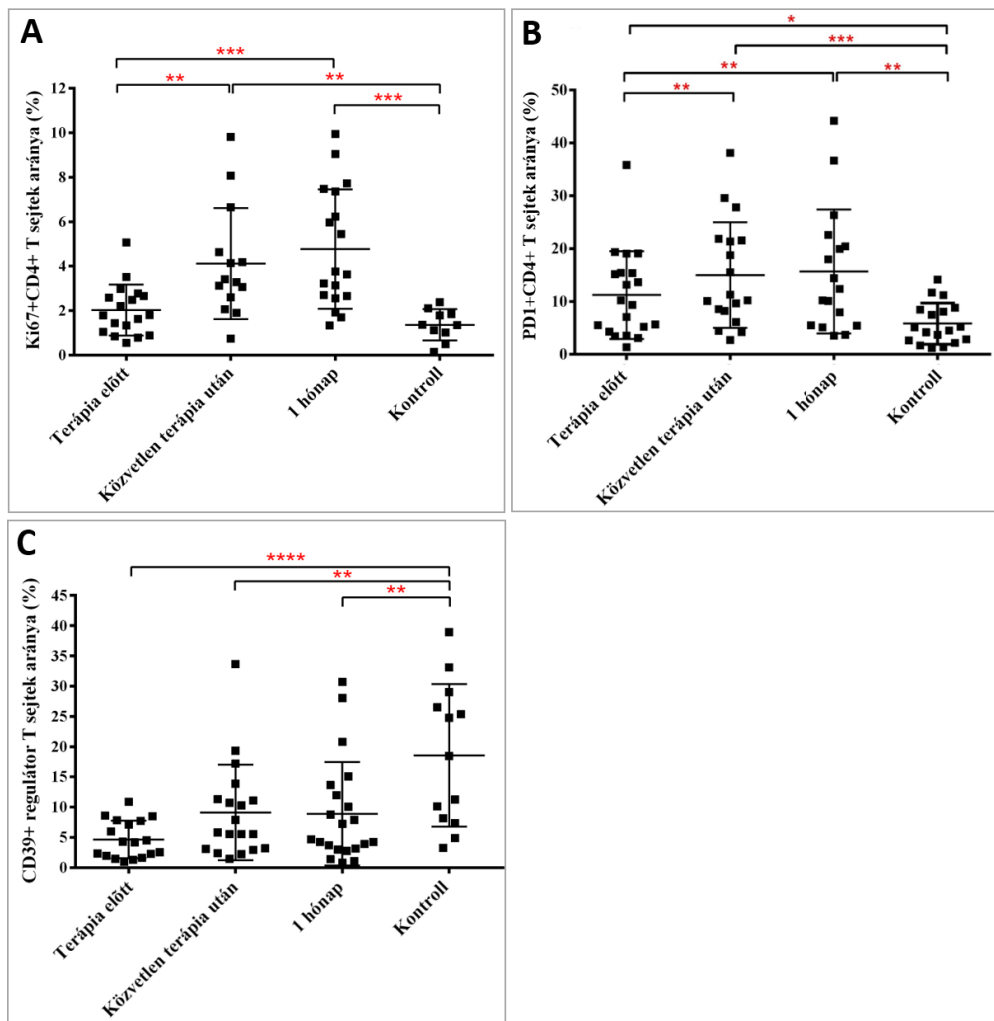
17. ábra: Intenzitás modulált sugárterápiával kezelt fej-nyaki daganatos betegekben (n=23) a sugárterápia szignifikánsan csökkentette a CD4+ limfociták arányát (A), azonban a FoxP3+ regulátor T sejt frakció szignifikánsan megnőtt a betegekben, amely a terápia hatására tovább emelkedett (B). A betegekben mért változásokat kontroll csoport (n=15) értékeihez is viszonyítottuk. Szignifikáns változásokat a piros csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). A vízszintes vonal a csoport átlagát, míg a függőleges vonal az adatsor szórását jelzi. Forrás: (Balazs, Kis et al. 2019).

4.1.5.2. T limfociták funkcionális integritásának és proliferációs kapacitásának változása

Vizsgáltuk a T limfociták proliferációs képességének és aktivációs státuszuknak a változását a fej-nyaki daganatos betegekben (n=23), és a kontroll csoportban (n=15) egyaránt. A sejtek osztódási képességét a Ki67 sejtmagi marker expressziójával vizsgáltuk, amelynek expresszója a CD4+ T limfocitákban nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll és a beteg csoportban kezelés előtt. Ugyanakkor a sugárterápia hatására 2-szeresére megnőtt az osztódó T limfociták frakciója kezelés után, majd további növekedést tapasztaltunk egy hónappal később is (18A ábra). Érdekesképpen kiemelendő, hogy egy hónappal a kezelést követően ketté válik az osztódó CD4+ limfociták csoportja: a beteg egy részében kisebb mértékű - a kontrollhoz viszonyított 1,4-szeres növekedést, míg a csoport másik felében nagyobb mértékű - a kezelés előtti értékhez viszonyított 3,6-szoros növekedést tapasztaltunk. A

két eltérő mértékben osztódó T limfocitákkal rendelkező betegcsoport között szignifikáns eltérést ($p=0,0196$) tudtunk kimutatni.

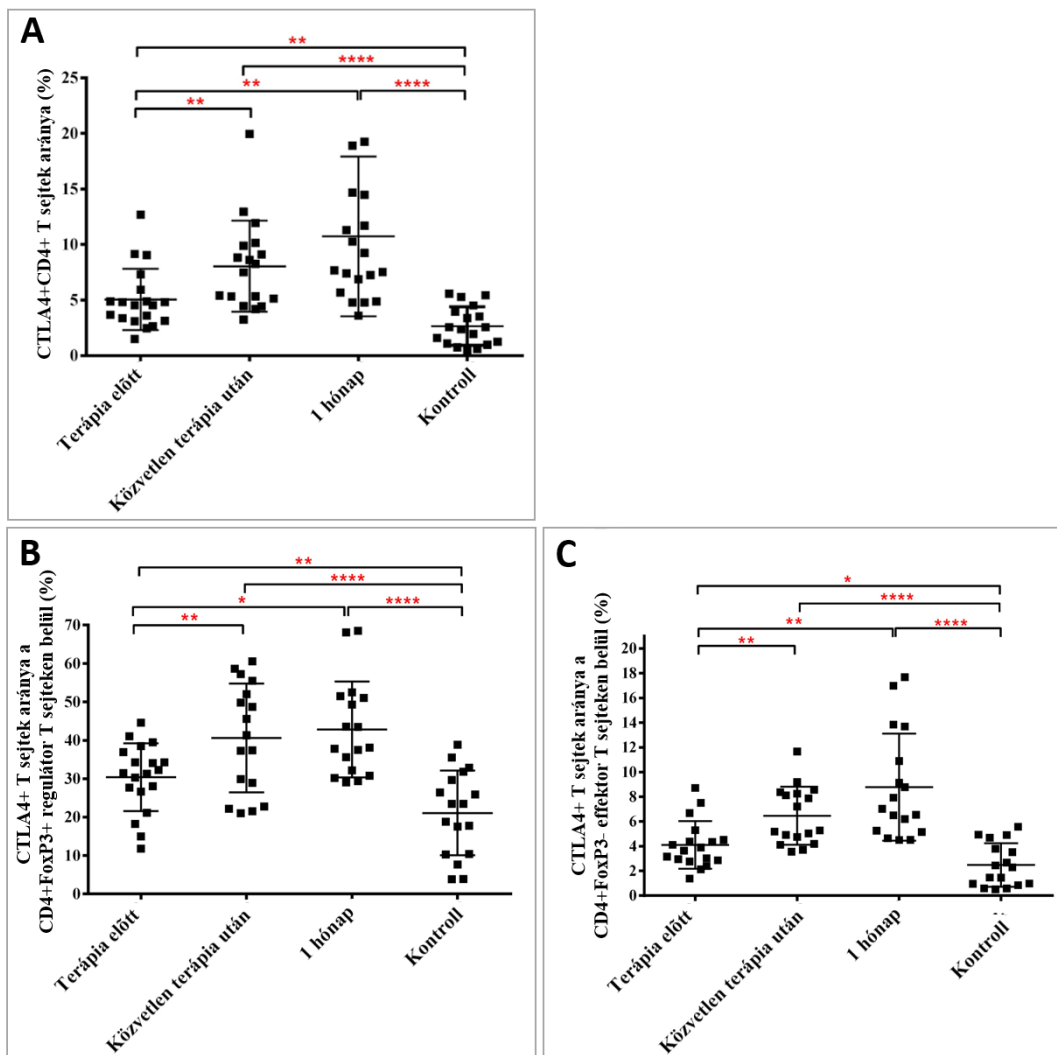
PD1 marker emelkedett expressziója a T limfociták anergikus állapotba kerülésére utal, amely állapotban lecsökken az aktivációs stimulusokra való válaszképességük. A CD4+ T limfociták PD1 expressziója már a kezelés előtt szignifikánsan megemelkedett a betegekben a kontrollhoz képest, majd a terápia után további szignifikáns emelkedést mutattunk ki. Azokban a betegekben, akik CD4+ limfocitái magasabban expresszálták a Ki67 markert, a PD1 marker expressziója is magasabb szintet mutatott (2,1-szeres növekedés) egy hónappal a kezelést követően, mint azokban a betegekben, akikben alacsonyabb Ki67 expressziót mértünk ki (1,4-szeres növekedés), azonban a két alcsoport PD1 expressziója között nem kaptunk szignifikáns eltérést (18B ábra). A PD1 markert nemcsak a CD4+ limfocitákon, hanem a FoxP3+ Treg sejtek felszínén is vizsgáltuk, azonban expresszióját sem a daganatos státusz, sem a sugárterápia nem befolyásolta (nincs ábrázolva). A CD39 sejt felszíni marker a Treg sejtekre jellemző funkcionális marker, amellyel az effektor T sejtek apoptózisát képesek indukálni. Szintje szignifikánsan lecsökkent a betegekben már terápia előtti időpontban a kontrollhoz képest, majd a terápia hatására enyhé, nem szignifikáns növekedést mértünk, de egy hónappal a kezelést követően is szignifikánsan alacsony maradt a kontroll csoporthoz képest (18C ábra).



18. ábra: Intenzitás modulált sugárterápiával kezelt fej-nyaki daganatos betegekben (n=23) a sugárterápia előtt szignifikánsan megnőtt a PD1+ T limfociták (B), és szignifikánsan lecsökkent a CD39+ Treg sejtek frakciója (C) a kontrollhoz viszonyítva, míg az osztódó CD4+ T limfociták aránya nem változott kezelés előtt a kontrollhoz képest, azonban terápia hatására szignifikánsan megemelkedett a szintje (A). A betegekben mért változásokat kontroll csoport (n=15) értékeihez is viszonyítottuk. Szignifikáns változásokat a piros csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). A vízszintes vonal a csoport átlagát, míg a függőleges vonal az adatsor szórását jelzi. Forrás: (Balazs, Kis et al. 2019).

A CTLA4 marker alacsony szinten, de folyamatosan kifejeződik a Treg sejtek felszínén, azonban megemelkedett szintje a Treg sejtek fokozott aktivációjára utal. Összehasonlítottuk a CTLA4+ sejtek arányát a teljes CD4+ T limfociták csoportjában (19A ábra), illetve a FoxP3+ regulátor (19B ábra), és a FoxP3- effektor T sejtek (19C

ábra) csoportján belül egyaránt. Mind a három csoport esetében nagyon hasonló tendenciát kaptunk: a CTLA4+ arány szignifikánsan nagyobb volt a betegekben kezelés előtt a kontroll csoporthoz képest, majd a terápia hatására további erőteljes növekedést mutattunk ki mind a három T sejt csoportban. Az eredmények alapján a CD4+ T limfocitákban egy immunszuppresszív fenotípus irányába történő eltolódását figyelhetünk meg, amely egy hónappal a kezelést követően is fent marad. A PD1 markerhez hasonlóan a CTLA4 aránya magasabb volt a Ki67-et magasabban expresszáló betegekben, mint az alacsonyabb osztódási kapacitású T limfocitákkal rendelkező betegcsoportban, azonban a két betegcsoport között itt sem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni. Az összehasonlítás eredményeképpen elmondható, hogy a CTLA4+ sejtek aránya a FoxP3+ Treg csoporton belül magasabb - átlagosan 20% a kontroll csoportban, és 30% a betegcsoportban (kezelés előtt), míg az effektor T sejteken belül alacsonyabb - átlagosan 2% a kontroll csoportban, és 4% beteg csoportban (kezelés előtt), és ez a nagyságrendbeli különbség kezelést követően is megmarad a két T sejt csoport között.



19. ábra: Intenzitás modulált sugárterápiával kezelt fej-nyaki daganatos betegekben (n=23) a sugárterápia előtt szignifikánsan megnőtt, majd a terápiát követően további szignifikáns növekedést mutatott a CTLA4+CD4+ T sejtek (A), illetve a CTLA4+ regulátor (B) és CTLA4+ effektor T sejtek (C) aránya. A betegekben mért változásokat kontroll csoport (n=15) értékeihez is viszonyítottuk. Szignifikáns változásokat a piros csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$). A vízszintes vonal a csoport átlagát, míg a függőleges vonal az adatsor szórását jelzi. Forrás: saját ábra.

4.1.5.3. Mieloid és limfoid eredetű dendritikus sejtek változása

A dendritikus sejtek két funkcionális alcsoportját különítettük el. Mind a CD123+ limfoid, mind a CD11c+ mieloid eredetű DC-k frakciója szignifikánsan megemelkedett már a terápia előtt a kontroll csoporthoz képest. Átmeneti szignifikáns csökkenés mindkét csoportban mutatkozott közvetlenül a terápia után, azonban egy hónappal a

kezelést követően is magasan kontroll szint felett maradt mindkét DC csoport aránya (függelék 4. ábra).

4.1.5.4. Mieloid eredetű szuppresszor sejtek változása

Vizsgáltuk a mieloid eredetű szuppresszor sejtek arányát, illetve a CD14+ és CD14- alcsoportját mind a kontroll, mind pedig a betegcsoportban kezelés előtti és utáni időpontokban. Az MDSC-k aránya szignifikánsan alacsonyabb volt a betegekben kezelés előtt a kontroll csoporthoz képest, amelyet a sugárterápia szignifikánsan nem befolyásolt, szintje kontroll közeli maradt egy hónappal később. Ugyanakkor a CD14+ MDSC-k aránya szignifikánsan megnőtt a kezelés előtt a betegekben a kontroll csoporthoz képest, azonban egy hónappal a sugárterápia után szignifikánsan lecsökkent. A CD14- MDSC-k pedig csökkenő tendenciát mutattak a betegekben a kontroll csoporthoz képest a kezelést követő időpontokban (függelék 5. ábra).

4.2. Prostatata daganatos betegek eredményei

4.2.1. A betegek klinikai adatai

A vizsgálatba bevont összes prostatata daganatos beteg klinikai adatainak százalékos megoszlásait a függelék 6. táblázat foglalja össze. Átlagos életkor alapján a betegek azonos korcsoportba tartoztak (65-75 év). Az LDR és HDR csoportban azonos arányban voltak kis (~30%) és közepes (~70%) kockázatú betegek, amely arány a Kiber-kés terápia csoportban is hasonló volt (20%-80%). A teleterápiás kezelésben részesült betegeknél voltak csak a legmagasabb (3) kockázati besorolással rendelkező páciensek (50%), a többi teleterápiás beteg egyharmada (15%) kis, hétharmada (35%) közepes kockázatú volt. TNM klasszifikáció alapján a legelőrehaladottabb T3-as besorolású daganat csak a teleterápiás betegcsoportban fordult elő (30%) A többi csoportban csak T1 és T2 besorolású tumor volt jellemző, és arányuk hasonló volt mindhárom csoportban (T1: ~20-30%; T2: ~70-80%). A Gleason pontszámok megoszlása a négy betegcsoportban közel azonos volt, kiemelő, hogy 4-es és 5-ös összpontszám legnagyobb arányban az LDR csoportban volt, míg a Kiber-kés terápiaiban részesülő csoportban csak 6-os összpontszámú, vagy afeletti értékek voltak jellemzőek. A brachyterápiások közel fele, míg a Kiber-kés terápia betegek 80%-a nem részesült semmilyen hormonterápiaiban a sugárterápia megkezdése előtt. Legnagyobb arányban (85%) a teleterápiás betegek kaptak hormon kezelést, közülük pedig 60%-ban

LHRH antagonist típusú terápiában részesültek a teleterápia megkezdése előtt. A hormonterápiában részesülő betegek kétharmada maximum 3 hónapig kapta a kezelést, míg egyharmaduk 3 hónapnál tovább részesült a hormonkezelésben.

4.2.2. A betegek akut és krónikus GI és GU mellékhatásai, IPSS és QoL tesztek eredményei

A vizsgálatba bevont prosztatata daganatos betegek akut és krónikus gasztrointesztinális és genitourinális mellékhatásait a függelék 7. táblázat foglalja össze. Grade 2-es (2-es fokú) akut GU mellékhatások minden csoportban a betegek ~60%-ában jelentkeztek 3 hónappal a kezelés után, azonban meglepő módon a HDR csoportban a betegek több, mint felénél (62%) nem jelentkeztek akut genitourinális mellékhatások, míg grade 2-es fokozatú tünetek mindössze 16%-ban jelentkeztek. Akut gasztrointesztinális mellékhatások a két brachyterápiás csoportban szinte egyáltalán nem jelentkeztek, míg a teleterápiás és Kiber-kés terápiás csoport több mint felénél grade 1-es vagy magasabb fokozatú mellékhatások léptek fel.

A krónikus mellékhatásokat tekintve grade 1-es és 2-es GU mellékhatások a HDR és Kiber-kés terápis csoportokban ~35%-ban, míg a másik két csoportban több, mint 60%-ban maradtak meg késői időpontokban is. Grade 1-es és 2-es GI mellékhatások kisebb arányban, a betegek egyharmadánál maradtak csak fent 6 hónapnál későbbi időpontokban. Négyes és ötös fokú mellékhatások egyik betegnél sem jelentkeztek.

A GU és GI mellékhatások pontozása mellett a betegek saját maguk is pontozzák a mellékhatásaikat a Nemzetközi Prostatata Tünetek Pontszám (IPSS) rendszere segítségével. Továbbá a vizeletürítés tüneteinek alapján is pontozzák életminőségüket (QoL). Az összesített adatok alapján elmondható, hogy a kezelés előtti időpontban a két brachyterápiás betegcsoport legalább felének enyhe, míg a két külső terápiás betegcsoport felének mérsékelt erősségű tüneteinek voltak. Három évvel a kezelést követően az arány hasonló maradt a brachyterápiás csoportokban, azonban a külső terápiában részesült betegek esetében ez az arány javult; a teleterápiás csoportnál 25%-ról 50%-ra, míg a Kiber-kés terápiás csoportban 40%-ról 60%-ra nőtt az enyhe tünetekkel rendelkező betegek aránya. A teleterápiás csoport 10%-ának súlyos tüneteinek maradtak 36 hónappal a kezelés után. A terápia megkezdése előtti életminőségüket kiválóan értékelte a csoportok fele, kivéve a teleterápiás csoport (40%), majd három évvel később jelentős változás csak a Kiber-kés terápiás csoportban történt (60%-ról

73%-ra nőtt a kiváló életminőségű betegek aránya). A terápia után 36 hónappal a teleterápiás csoportban volt a legnagyobb arányú (50%) a kielégítő/elégedetlen életminőségű beteg, a többi csoportban 30% alatti maradt (függelék 8. táblázat).

4.2.3. Az alacsony dózisirátájú brachyterápiában (LDR) részesült prosztatata daganatos betegek első eredményei

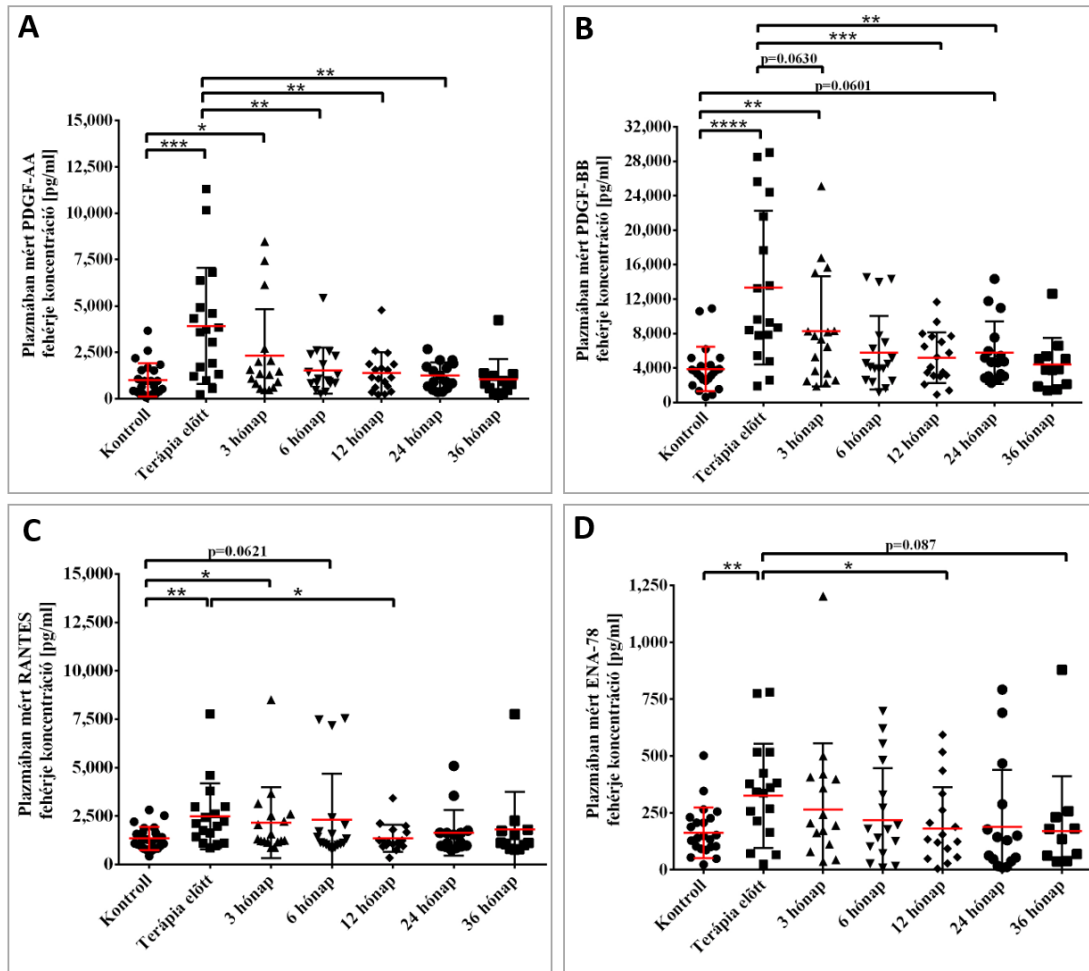
Az LDR kezelésben részesült prosztatata daganatos betegek egy csoportjában (n=21) a fej-nyaki daganatos betegek esetében bemutatott fenotipizálási rendszert alkalmaztuk, amelynek már lepublikált eredményeit (Balazs, Kocsis et al. 2022) ebben az alfejeztben szeretném bemutatni.

4.2.3.1. A vérplazma fehérjeprofili vizsgálatának eredménye LegendPlex technikával

LDR brachyterápiában részesült prosztatata daganatos betegek (n=18) plazmájából gyöngy alapú fehérje vizsgálatot végeztünk a sugárterápia előtti és utáni időpontokból származó mintákból. A vizsgálatból kizártuk azokat a betegeket, akiknek a 36 hónapig tartó nyomon követése nem valósult meg (n=3). Kontroll csoportként korban és nemben illesztett páciensek (n=24) plazmáját használtuk fel. Elsősorban sugárzás indukálta fibrózis és endotéliális diszfunkció folyamataiban kulcsfontosságú növekedési faktorok, illetve a szisztémás gyulladás folyamataiban szerepet játszó proinflammatorikus kemokinek vizsgálatára fókuszáltunk. A 23 vizsgált fehérje közül négynek szignifikánsan változott a szintje a betegekben (PDGF-AA, PDGF-BB, RANTES, ENA-78), 14 fehérje szintje (FGF-b, EGF, EPO, Angiopoietin-2, VEGF, SCF, HGF, MCP-1, TARC, Eotaxin, IP-10, MIP-1 β , I-TAC, GRO- α) nem változott szignifikánsan a betegekben a nyomon követés ideje alatt, öt fehérjének (M-CSF, G-CSF, GM-CSF, TGF- α és az IL-8) a mennyisége pedig a detektálhatósági határon mozgott.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a PDGF-AA és PDGF-BB növekedési faktorok szintje szignifikánsan magasabb volt a daganatos betegekben a terápia előtt (előbbi 3,4-szeres, míg utóbbi 3,7-szoros átlagos növekedést mutatott) a kontroll csoport átlagához képest. Koncentrációjuk azonban hamar normalizálódott, 6 hónappal a kezelést követően már kontroll szintre visszacsökkent mennyiségük (20. ábra). A RANTES/CCL5 és az ENA-78/CXCL5 kemokinek szintje a növekedési faktorokhoz hasonlóan, de kisebb mértékben változott meg a betegekben. Kezelés előtt a RANTES 2,7-szeres, míg az ENA-78 2-szeres átlag növekedést mutatott a kontroll csoport

átlagához képest, majd 6 hónappal később a koncentrációjuk szintén kontroll szintre csökkent. A daganatos státusszal összefüggő fehérje koncentráció növekedést a tumor regresszió tehát normalizálta mind a négy fehérje esetében (20. ábra). A fehérjék szintje nem korrelált a kezelés előtt mért plazma PSA szinttel (nincs ábrázolva).



20. ábra: Az alacsony dózisirátájú brachyterápiában (LDR) részesült prosztata daganatos betegek egy csoportjában (n=21) szignifikánsan megemelkedett a PDGF-AA (A), PDGF-BB (B), RANTES/CCL5 (C) és ENA-78/CXCL5 (D) fehérjék koncentrációja a terápia előtti időpontban a kontrollhoz képest, amely a tumor kialakulásával függ össze. Szintjük 6 hónappal a kezelést követően normalizálódott. A betegekben mért változásokat kontroll csoport (n=24) értékeihez is viszonyítottuk. Az eredményeket LegendPlex technika segítségével kaptuk. Szignifikáns változásokat a csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). A piros vízszintes vonal a csoport átlagát, míg a függőleges vonal az adatsor szórását jelzi. Forrás: (Balazs, Kocsis et al. 2022).

Itt szeretném megemlíteni, hogy a HDR betegcsoportban (n=18) is megvizsgáltuk ezeknek a fehérjéknek a változását kezelés előtti és utáni időpontokban ELISA technika segítségével. A változásokat kezelés előtti szinthez és kontroll csoporthoz (n=22) egyaránt hasonlítottuk. A PDGF-AA, a RANTES és az ENA-78 fehérjék szintje szignifikánsan megnőtt a HDR csoportban is a terápia előtt a kontroll csoporthoz képest. A PDGF-AA és az ENA-78 fehérjék szintje átmeneti normalizálódás után enyhe, nem szignifikáns mértékű növekedést mutatott 24, illetve 36 hónappal a terápia után. A RANTES szintje pedig szignifikánsan magas szinten maradt a kontrollhoz képest a nyomon követés teljes ideje alatt. A PDGF-BB az LDR csoporttal ellentétben a HDR kezelésben részesült betegekben nem nőtt meg szignifikánsan a szintje kezelés előtt, kontroll szint közelében mozgott a nyomon követés ideje alatt (függelék 6. ábra).

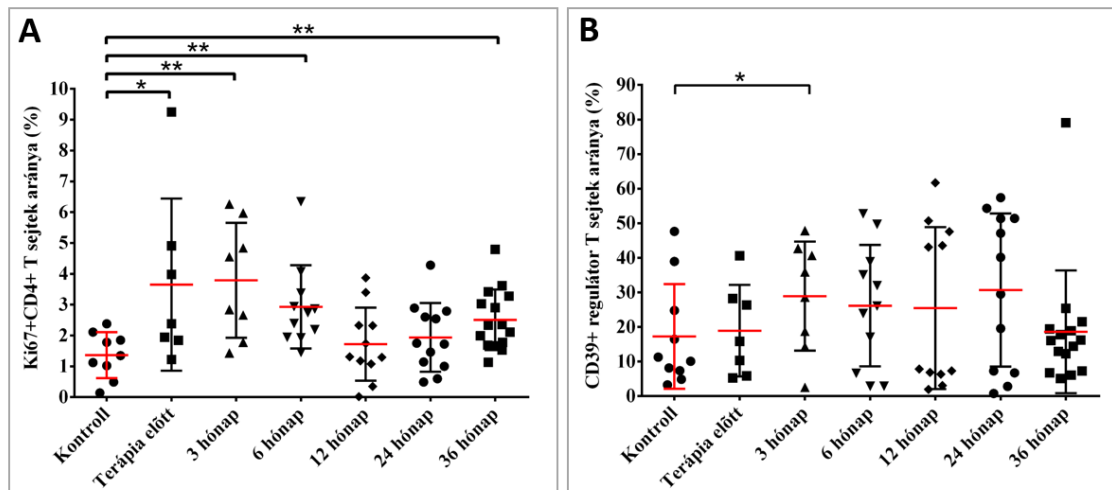
4.2.3.2. A CD4+ T limfociták és FoxP3+ regulátor T limfociták változása

Vizsgáltuk a veleszületett és az adaptív immunrendszer sejtjes elemeinek változását kezelés előtti és utáni időpontokban az LDR brachyterápiában részesült prosztata daganatos betegek (n=18) PBMC frakcióiban (a néhol hiányos adatsor oka az alacsony hatékonyságú PBMC izolálás volt). Kontroll csoportként korban és nemben illesztett páciensek (n=24) mintáit használtuk fel. Vizsgáltuk a CD4+ T sejtek arányát a teljes limfocita csoportban, amely közel szignifikánsan alacsonyabb volt a betegekben a terápia előtt, és közvetlen a beavatkozás után a kontroll csoporthoz képest. Mennyiségük a nyomon követés ideje alatt végig kontroll szint alatt maradt, szignifikánsan 6 hónappal a beavatkozást követően csökkent le frakciójuk a kontrollhoz képest. A CD4+FoxP3+ Treg sejtek aránya folyamatos enyhe növekedést mutat a betegekben, de szintje szignifikánsan csak 36 hónappal a kezelést követően nőtt meg mind a kontroll, mind a kezelés előtti értékhez képest (függelék 7. ábra).

4.2.3.3. T limfociták funkcionális integritásának és proliferációs kapacitásának változása

Az osztódó CD4+ T limfociták frakcióját a Ki67 sejtmagi marker expressziójával vizsgáltuk. A proliferáló CD4+ T limfociták aránya 2,8-szoros mértékben megemelkedett a betegekben a kontroll csoporthoz képest, amely emelkedett szint 6 hónappal a kezelést követően is fentállt. Frakciójuk átmeneti csökkenés után 3 évvel

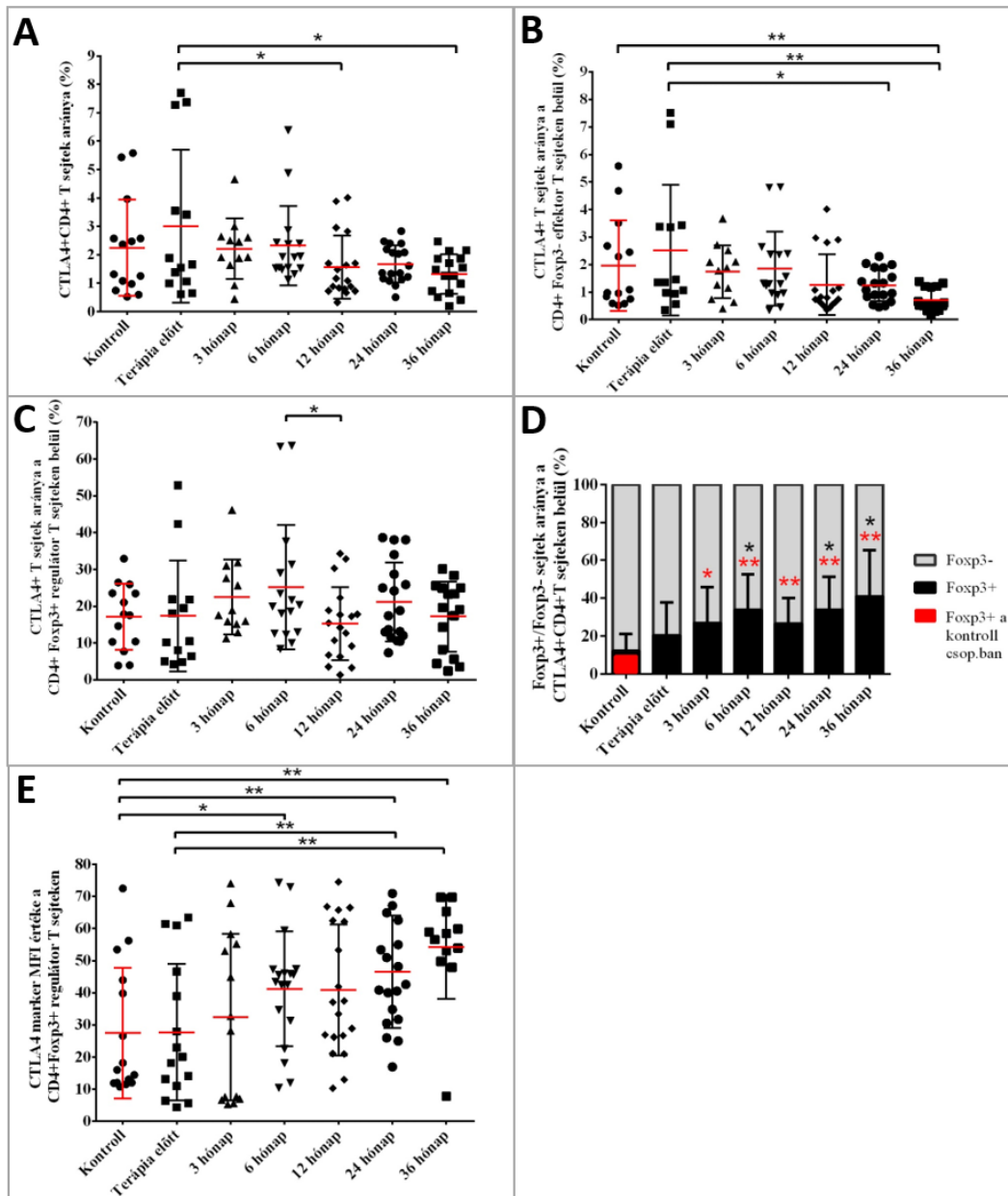
később újra szignifikánsan megemelkedett a kontroll szinthez képest (21A ábra). A Treg sejtekre jellemző, apoptózist indukáló CD39 sejtfelszíni markert expresszáló Treg sejtek arányát is vizsgáltuk, melynek szintje 3 hónappal a terápia után nőtt meg szignifikánsan, 24 hónapig emelkedett szintet mutatott, majd 3 évvel a kezelést követően normalizálódott (21B ábra).



21. ábra: Az alacsony dózisirátájú brachyterápiában (LDR) részesült prosztata daganatos betegek egy csoportjában (n=21) szignifikánsan megnőtt az osztódó CD4+ T limfociták frakciója, amely átmeneti csökkenés után, 3 évvel a kezelést követően is szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest (A). A CD39+ Treg sejtek aránya 3 hónappal a terápia után szignifikánsan megnőtt a betegekben a kontroll csoporthoz képest, majd 3 évvel később normalizálódott szintjük (B). A betegekben mért változásokat kontroll csoport (n=24) értékeihez is viszonyítottuk. Szignifikáns változásokat a csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). A piros vízszintes vonal a csoport átlagát, míg a függőleges vonal az adatsor szórását jelzi. Forrás: saját ábra.

Az immungátló hatású CTLA4 markert expresszáló T limfociták szintjét is meghatároztuk az LDR brachyterápiában részesült prosztata daganatos betegekben és a kontroll csoportban egyaránt. A CTLA+CD4+ T limfociták aránya nem különbözött szignifikánsan a betegekben kezelés előtt a kontroll csoporthoz képest. Azonban kezelést követően a betegekben fokozatos csökkenést tapasztaltunk, egy évvel a kezelést követően szignifikánsan lecsökkent a szintjük a kezelés előtti szinthez képest, amely 3 évvel a terápia végét követően sem normalizálódott (22A ábra). Ehhez nagyon hasonló tendenciát mutat a CTLA4+ effektor T sejtek aránya, amely a betegekben

folyamatos csökkenést mutat, majd ez a csökkenés 24 és 36 hónappal a terápia után szignifikáns mértékű lett a kezelés előtti szinthez, és a kontroll csoporthoz képest (22B ábra). A CTLA4+ Treg sejtek frakciója azonban nem mutat szignifikáns eltérést a betegekben a kontroll csoporthoz képest, a betegek értékei a nyomon követés ideje alatt a kontroll szórásán belül mozogtak (22C ábra). Továbbá vizsgáltuk a FoxP3+/FoxP3- arányt a CTLA4+CD4+ T sejtek csoportján belül. A FoxP3+ sejtek aránya 1,68-szoros növekedést mutatott a betegekben kezelés előtt a kontrollhoz viszonyítva, majd a FoxP3+ irányú eltolódás mértéke folyamatos, szignifikáns növekedést mutatott a nyomon követés teljes időtartama alatt (22D ábra). Végül meghatároztuk a CTLA4 marker expressziós szintjét (MFI értékét) a CD4+FoxP3+ Treg sejtek felszínén, amelynek terápia előtti szintje a kontroll szinttel megegyezett, majd terápia után folyamatos növekedést mutatott. Hat hónappal a terápia után szignifikánsan megemelkedett, amely 36 hónappal később is ezen az emelkedett szinten maradt, nem normalizálódott (22E ábra).



22. ábra: Az alacsony dózsrátájú brachyterápiában (LDR) részesült prosztata daganatos betegek egy csoportjában (n=21) szignifikánsan lecsökkent a CTLA4+CD4+ T sejtek aránya 12, illetve 36 hónappal a kezelést követően (A) Ehhez hasonló csökkenő tendenciát mutatott a CTLA4+ effektor T sejtek aránya (B), míg a CTLA4+ Treg sejtek szintje nem változott szignifikánsan (C) a betegekben. A FoxP3+ T sejtek aránya a CTLA4+CD4+ T sejtek csoportján belül folyamatos szignifikáns növekedést mutatott a betegekben (D), amelyet a CTLA4 marker folyamatosan emelkedő expressziós szintje (MFI) is alátámaszt (E). A betegekben mért változásokat kontroll csoport (n=24) értékeihez is viszonyítottuk. Szignifikáns változásokat a csillagok jelölik (*: $p < 0,05$;

** $p < 0,01$). A piros vízszintes vonal a csoport átlagát, míg a függőleges vonal az adatsor szórását jelzi. Forrás: (Balazs, Kocsis et al. 2022).

A T limfociták sejtfelszínén expresszáldó, kifáradt és anergikus állapotba kerülésüket jelző markert is vizsgáltuk mind a CD4+ T sejtek teljes csoportjában, mind az effektor és Treg sejtek frakciójában, azonban egyik PD1+ alcsoport szintje sem változott szignifikánsan a betegekben a kontroll szinthez képest. Szintén meghatároztuk a FoxP3+/FoxP3- sejtek arányát a PD1+CD4+ T sejtek csoportjában, azonban csak enyhe, nem szignifikáns mértékű növekedést tapasztaltunk a FoxP3+ frakcióban a kontroll csoporthoz képest. Ugyanakkor a PD1 marker expressziós szintje (MFI) a 6. hónaptól kezdve szignifikáns emelkedést mutatott a betegekben a kontrollhoz képest, amely egészen 36 hóig ezen az emelkedett szinten maradt, nem normalizálódott a Treg sejtek felszínén (függelék 8. ábra).

4.2.4. A négy prosztata daganatos betegcsoport veleszületett és adaptív immunstátuszának összehasonlítása

Végül pedig a legbővebb fenotipizálási rendszert alkalmazva a négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) hasonlítottuk össze a veleszületett és az adaptív immunrendszer sejtsejtes elemeinek változásait a terápia előtti és utáni időpontokban, amelynek eredményeit a következő alfejezetek tartalmazzák.

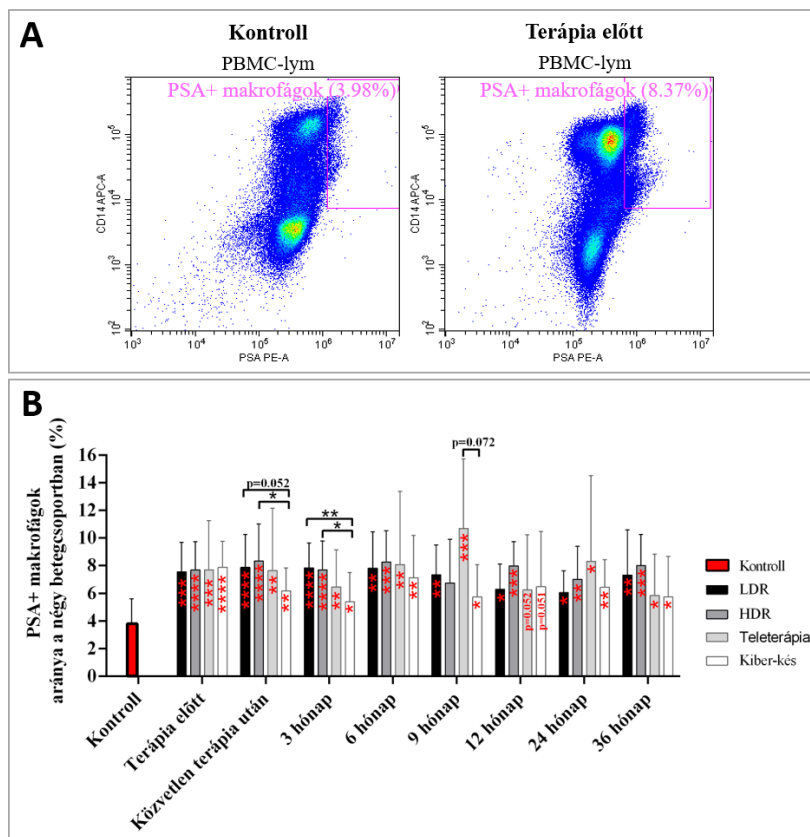
4.2.4.1. Monocita alcsoportok változása

Vizsgáltuk a perifériás vérben keringő monociták három különböző funkcionális alcsoportját. A teljes monocita csoporton belül irodalmi adatok alapján a legnagyobb arányban a klasszikus monociták fordulnak elő, majd a nem-klasszikus csoport, és a legkisebb arányban az intermediált típus. Ezt a megoszlást követi a mi kontroll csoportunkban kimutatott arány is: klasszikus: ~70%, nem-klasszikus: ~20%, átmeneti: ~10%. Az IL-10, G-CSF, CCL2, RANTES, IL-6, IL-8 kemokinek nagy mennyiségben expresszálni képes klasszikus monociták szintje mind a négy betegcsoportban enyhe csökkenő tendenciát mutat a kontroll csoporthoz képest, amely csökkenés három évvel a kezelést követően már szignifikáns mértékű lett a két brachyterápiás csoportban a

kontroll és a kezelés előtti értékhez képest. A gyulladásos stimulusokra elsősorban TNF-a, IL-1b, IL-6 és IL-8 kemokineket expresszáló nem-klasszikus monociták szintje a korai időpontokban mutat csökkenő tendenciát a betegekben a kontroll szinthez képest (a HDR csoportban szintjük szignifikánsan lecsökkent közvetlen a kezelés után), majd 9 hónap után szintje minden csoportban kontroll szinthez tért vissza. Az átmenetei/intermediált monociták szintje a másik két altípus „rovására” szignifikánsan megemelkedett mind a négy csoportban már a kezelés előtt a kontroll csoporthoz képest, amely a teleterápiás csoportot leszámítva minden betegnél ezen az a megemelkedett szinten maradt 3 évvel a kezelést követően is. A teleterápiás csoportban közvetlen a kezelést követően kontroll szintre tért vissza, és egyben szignifikánsan lecsökkent a kezelés előtti értékhez képest, és ezen a szinten maradt a nyomon követés teljes időtartama alatt (függelék 9. ábra).

4.2.4.2. PSA+ makrofágok változása

Vizsgáltuk a makrofágokba aktív fagocitózissal bekerülő PSA szintjét is. A változást jól szemléltetik a kontroll és beteg minták áramlási citometriás grafikonjai, ahol a jelölt kapuban vizsgáltuk a CD14+PSA+ dupla pozitív események számát (23A ábra). A makrofágok PSA szintje mind a négy betegcsoportban 2-szeres mértékben megemelkedett már terápia előtt (~7,6%) a kontroll csoporthoz képest (3,83% ± 3,01%). Három évvel a kezelést követően ugyan csökkent a makrofágok PSA szintje a két külső terápiás csoportban (teleterápia: 5,83 ± 3,02%; Kiber-kés: 5,74 ± 2,93%), azonban továbbra is szignifikánsan magasabb szinten maradt minden csoportban a kontrollhoz képest. A Kiber-kés terápiás csoportban mért szint szignifikánsan alacsonyabb volt a másik két brachyterápiás csoporthoz képest közvetlenül, illetve 3 hónappal a kezelés után, majd a szignifikáns mértékű különbség eltűnt a későbbi időpontokban (23B ábra).

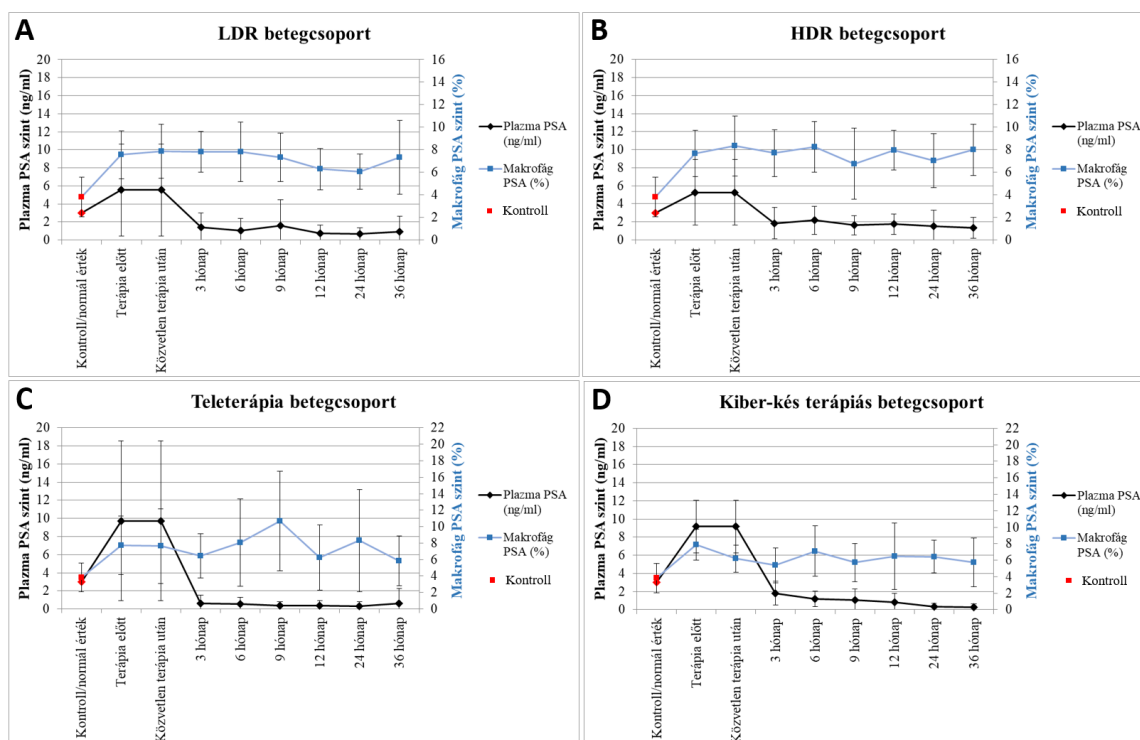


23. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) szignifikánsan megnőtt a PSA+ makrofágok szintje már a kezelés előtt a kontrollhoz képest, majd ezen az emelkedett szinten maradt a nyomon követés ideje alatt (B). A változást jól szemléltetik a kontroll és beteg minták áramlási citometriás grafikonjai (A). Az oszlopok az adatsor átlagát jelzik és függőleges vonal jelzik az adatsorok szórását. A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Forrás: saját ábra.

4.2.4.3. Plazma PSA és a makrofág PSA szintjének összehasonlítása

Ezt követően összehasonlítottuk a vérplazmában monitorozott PSA szintet (ng/ml) és a PSA+ makrofágok szintjét (%), amelyeket két eltérő beosztású y-tengellyel rendelkező grafikonokon mutatunk be (24. ábra). A betegek kezelés előtti és utáni időpontokban meghatározott pontos plazma PSA értékeit betegcsoportonként egy-egy táblázat foglalja össze (függelék 10-13. táblázatok). A plazma PSA esetében a normál értéknek az OOI által alkalmazott 3 ng/ml határértéket vettük, míg a PSA+ makrofágok normál szintjét a korban és nemben illesztett kontroll csoportban

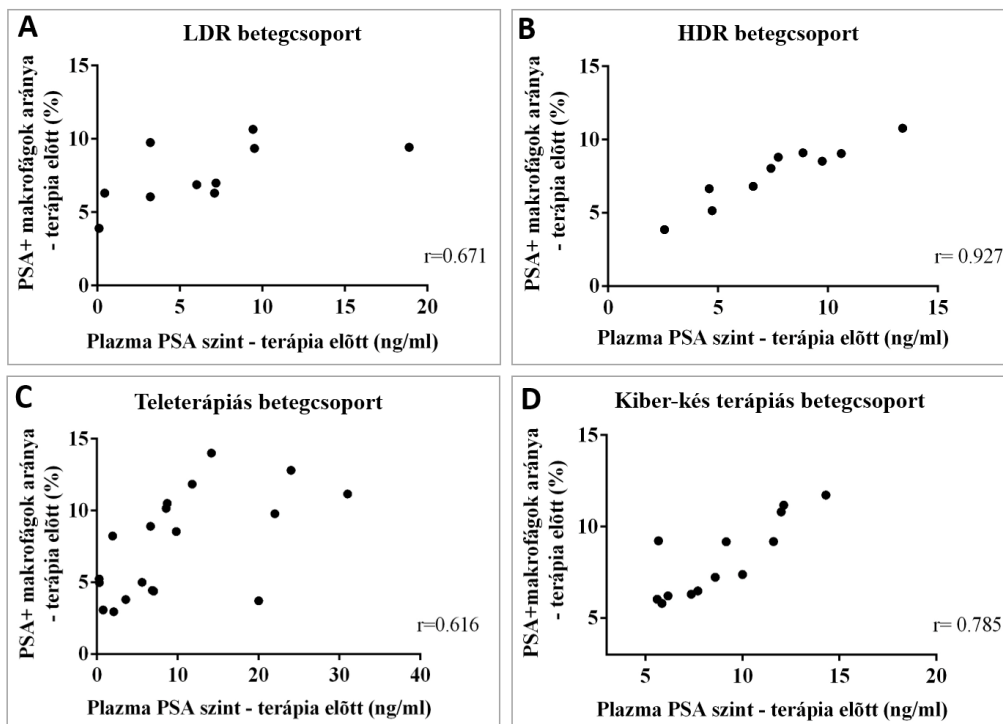
határoztuk meg, amely $3,83\% \pm 3,01\%$ volt. A korábban bemutatott grafikonon látható, hogy a PSA+ makrofágok szintje minden betegcsoportban szignifikánsan megnőtt, és hosszú távon magasan maradt. Ezzel összehasonlítva a plazmában mért PSA szint eltérően változott a betegekben. A két brachyterápiás csoportban a plazma PSA átlagos szintje terápia előtt $\sim 1,8$ -szoros növekedést mutatott a normál 3 ng/ml értékhez képest. Az LDR csoportban (24A ábra) $5,54 \pm 5,08\%$, míg a HDR csoportban (24B ábra) $5,27 \pm 3,64\%$ ng/ml volt kezelés előtt, amely 3 hónappal a terápia után normalizálódott. Az LDR csoportban 1,62 ng/ml, míg a HDR csoportban 2,17 ng/ml átlag értékek alatt maradt a nyomon követés teljes ideje alatt. A két külső terápiás csoportban (24C-D ábra) a plazma PSA átlagos szintje terápia előtt több, mint 3-szoros növekedést mutatott a normál értékhez képest, és közel 2-szer magasabb volt, mint a két brachyterápiás csoportban, szintén kezelés előtti időpontban (teleterápia: $9,74 \pm 8,81\%$; Kiber-kés: $9,16 \pm 2,90\%$). Azonban 3 hónappal a terápia után esetükben is normalizálódás következett be; 1,85 ng/ml átlag PSA szint fölé nem emelkedett egyik csoportban sem a plazma PSA szintje egészen 36 hónapig. Ugyanakkor a PSA+ makrofágok frakciója minden csoport esetében magasan kontroll szint felett maradt még 3 évvel a kezelést követően is.



24. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) monitorozott vérplazma PSA átlagolt szintjének (ng/ml), és a PSA+ makrofágok átlagolt arányának (%) időbeli összehasonlítása. A plazma PSA normál értékének az OOI által is alkalmazott 3 ng/ml határértéket vettük, míg a PSA+ makrofágok normál szintjét a korban és nemben illesztett kontroll csoportban határoztuk meg ($3,83\% \pm 3,01\%$).
 Forrás: saját ábra.

4.2.4.4. A plazma PSA és makrofág PSA szintje közötti korreláció

Ezután vizsgáltuk a kezelés előtti plazma PSA szint, és szintén kezelés előtti PSA+ makrofágok szintje közötti összefüggést Spearman-féle korrelációs teszt segítségével. Mind a négy betegcsoport esetében erős pozitív korrelációt ($r > 0,6$) kaptunk a két adatsor között, azaz magasabb plazma PSA szint esetén magasabb volt a PSA+ makrofágok aránya is (25. ábra).



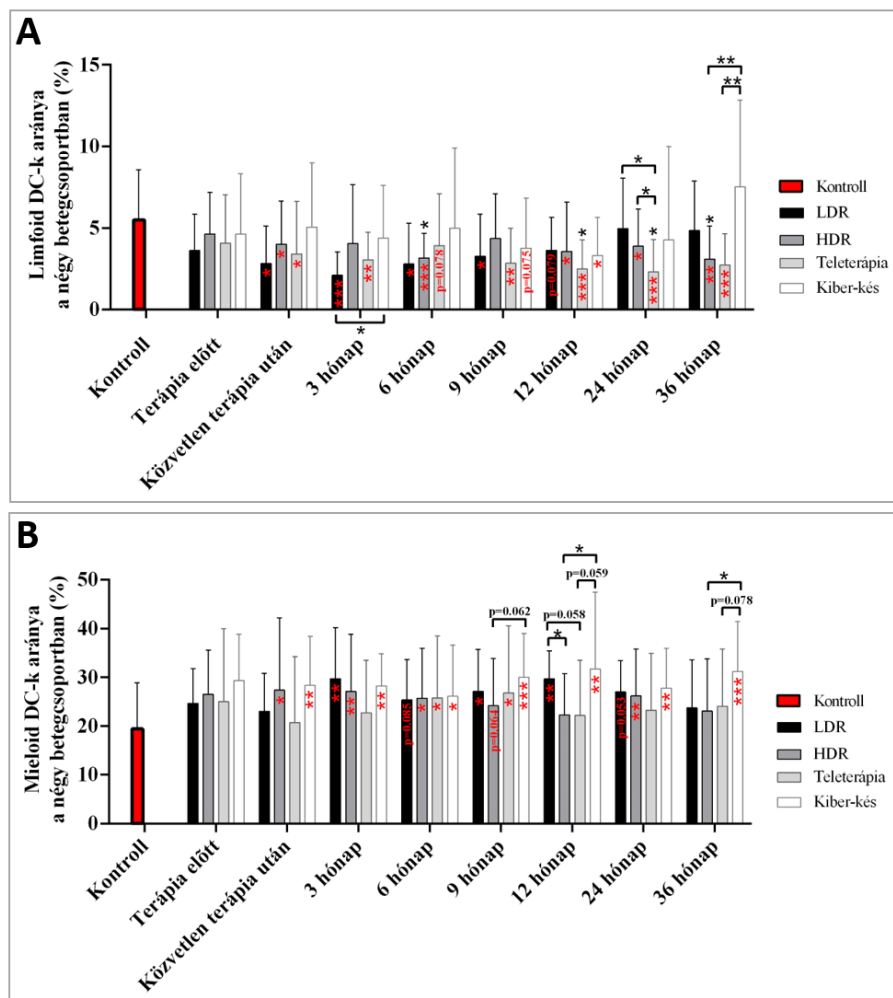
25. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) erős pozitív korrelációt ($r > 0,6$) kaptunk a kezelés előtti plazma PSA szint, és szintén kezelés előtti PSA+ makrofágok szintje között. Forrás: saját ábra.

Azonban ez az erős pozitív összefüggés a kezelést követő időpontokban már nem állt fent. Negatív összefüggést találtunk a kezelés utáni későbbi időpontokban mért plazma PSA, és az ugyan abban az időpontban mért PSA+ makrofágok szintje között mind a négy beteg csoportban. Érdekes, hogy a két külső terápiás csoport esetében 36 hónappal a kezelést követően újra pozitív irányú, azonban gyenge összefüggést kaptunk az adatsorok között (nincsenek ábrázolva).

4.2.4.5. Mieloid és limfoid eredetű DC-k változása

Vizsgáltuk a perifériás vérben keringő dendritikus sejtek két funkcionális alcsoportját, a CD11c+ mieloid, vagy „konvencionális” DC-eket, illetve a CD123+ limfoid, vagy „plazmacitoid” DC csoportját. Egyik alcsoport szintje sem mutatott szignifikáns változást a betegekben kezelés előtt, a kontroll csoporthoz viszonyítva. Azonban terápia után a limfoid DC-k aránya szignifikánsan lecsökkent (a Kiber-kés terápiás csoportot leszámítva), majd a HDR és teleterápiás csoport esetében szintjük 36 hónappal később is szignifikánsan alacsony szinten maradt. Az LDR csoportban 12 hónapig maradt szignifikánsan alacsony szinten a limfoid DC-k frakciója, majd azután normalizálódott. A Kiber-kés terápiás csoport esetében 12 hónapnál csökkent szignifikánsan a szintje, majd normalizálódott (26A ábra).

Ezzel szemben a mieloid DC-k aránya szignifikánsan megnőtt a HDR és a Kiber-kés terápiás csoportokban közvetlenül a terápia után a kontroll csoporthoz képest, és 24 hónappal a kezelés után is ezen az emelkedett szinten maradtak. Az LDR csoportban 3 hónappal, míg a teleterápiás csoportban 6 és 9 hónappal a terápia után nőtt meg szignifikánsan, majd 36 hónappal később minden betegben normalizálódott a mieloid DC-k szintje, kivéve a Kiber-kés terápiás csoportot, amely esetben szignifikánsan magas maradt mind a kontroll, mind pedig a teleterápiás és HDR csoporthoz viszonyítva is (26B ábra).



26. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) nem változott szignifikánsan sem a limfoid, sem a mieloid DC-k aránya a kezelés előtt a kontroll csoporthoz képest, azonban terápia után a limfoid DC-k frakciója szignifikánsan lecsökkent (A), míg a mieloid DC-k aránya szignifikánsan megnőtt, és hosszú távon ezen a megváltozott szinten maradt (B). A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Forrás: saját ábra.

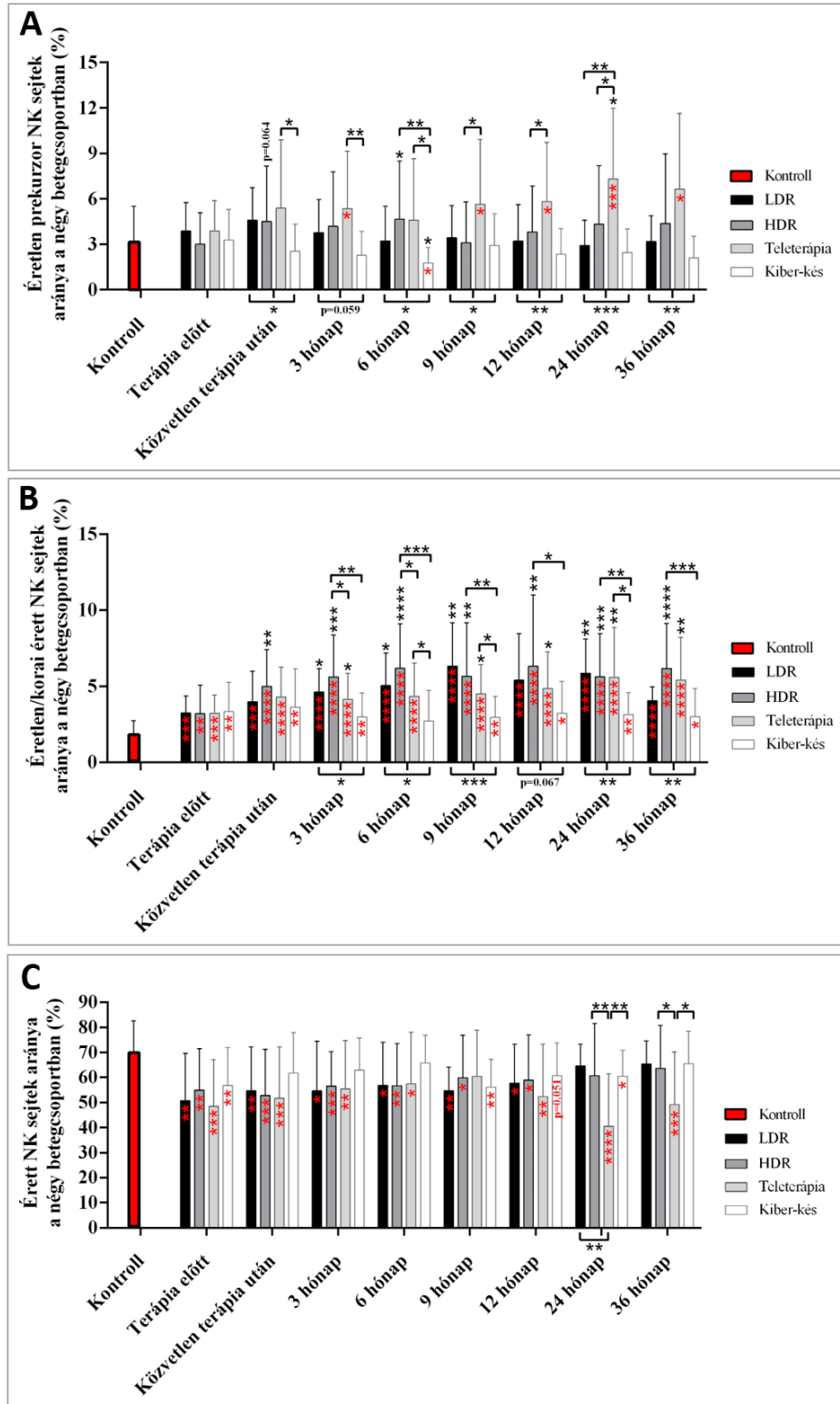
4.2.4.6. NK sejtek és alcsoportjaik változása

Meghatároztuk a perifériás vérben keringő, CD3-CD16+CD56+ NK sejtek szintjét is az illesztett kontroll és a beteg csoportokban kezelés előtti és utáni időpontokban egyaránt (függelék 10. ábra). Mind a négy csoportban csökkenő tendenciát mutatott a teljes NK sejtek csoportja a kontrollhoz képest (76,45% \pm 12,77%), azonban a legkisebb különbséget az LDR csoportban tapasztaltunk, szintjük

kontroll alá csökkent a kezelés előtt (68,03%±20,28), de nem szignifikáns mértékben ($p=0,162$), és a nyomon követés teljes ideje alatt kontroll közelében maradt. A másik három kezelésben részesült beteg csoportban az NK sejtek aránya már a kezelés megkezdése előtt ~20%-kal lecsökkent a kontrollhoz képest (HDR: 61,17% ± 15,48%; teleterápia: 62,10% ± 22,16%; Kiber-kés: 64,48% ± 12,70%), ezután szintje átmenetileg normalizálódott a betegekben, majd a Kiber-kés terápiás csoportban 24, a HDR-es csoportban 24 és 36 hónappal később újra szignifikánsan lecsökkent a szintje. Három évvel a kezelést követően csak a teleterápiás csoportban maradt szignifikánsan alacsonyan az NK sejtek frakciója (62,17% ± 20,44%), a többi betegben szintje normalizálódott.

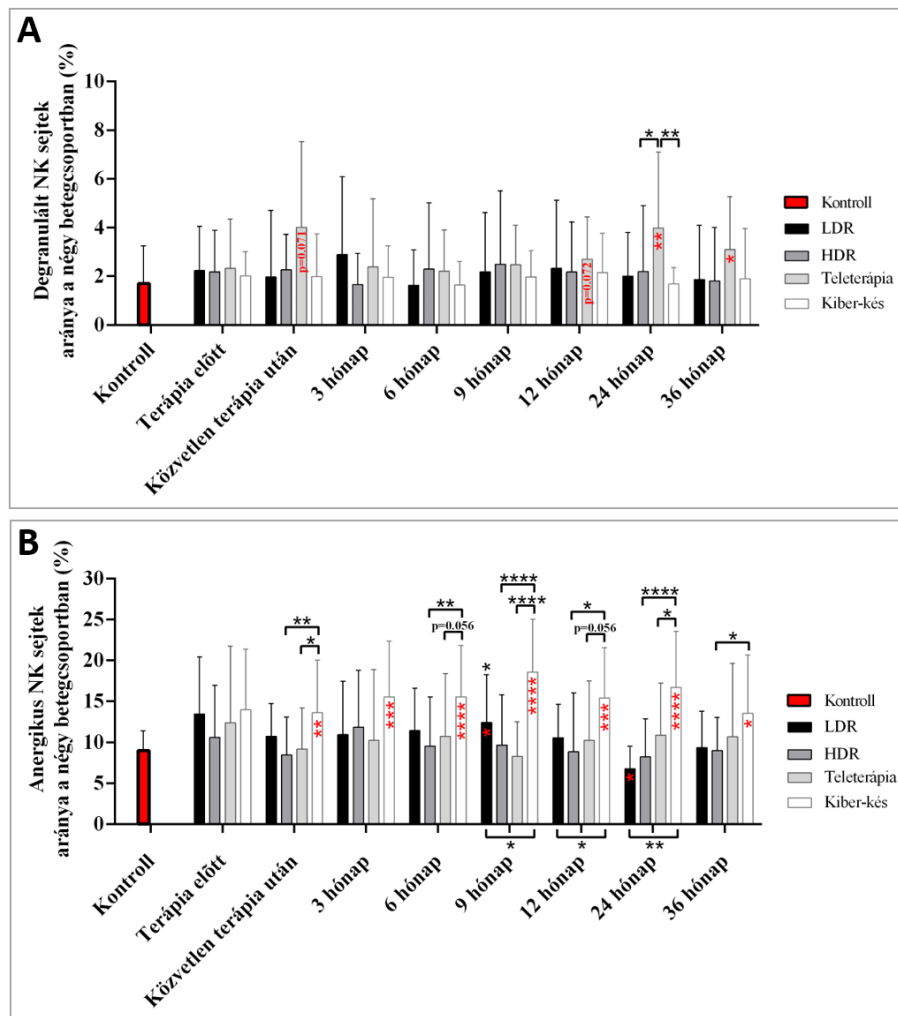
Ezután vizsgáltuk az NK sejtek különböző érési és funkcionális alcsoportjait, és összehasonlítottuk a változásokat a négy beteg csoportban. Az alcsoportokat a CD16 és a CD56 sejtfelszíni markerek különböző intenzitású expressziója segítségével határoztunk meg. Az éretlen prekursor NK sejtek aránya nem mutatott szignifikáns eltérést a betegekben a kezelés előtt a kontroll csoporthoz (3,21% ± 2,29) képest. A terápia után 3 hónappal a teleterápiás csoportban szignifikánsan megnőtt (5,35%±3,78), és 3 évvel később is emelkedett szinten detektáltuk a prekursorokat (6,65%±4,98), míg a két brachyterápiás csoportban arányuk enyhén, nem szignifikánsan emelkedett. A Kiber-kés terápiás csoportban átmenetileg szignifikánsan lecsökkent a szintje 6 hónappal a kezelés után (1,77% ± 1,01%), majd a későbbi időpontokban újra kontroll közelébe került (27A ábra). Ezzel szemben az éretlen/korai érett NK sejtek frakciója ~1,8-szorosán megemelkedett mind a négybeteg csoportban a kontroll csoport átlagához képest (1,83% ± 0,89%), amely még három évvel a kezelést követően is ezen az emelkedett szinten maradt minden betegben. Legmagasabb szinten a HDR-es csoportban detektáltuk az éretlen NK sejtek frakcióját 36 hónappal a kezelést követően (6,16% ± 2,97%), amely szignifikánsan magasabb volt, mint a Kiber-kés terápiás csoport mért éretlen NK frakció ($p=0,0009$) (27B ábra). Ugyanakkor az érett, citotoxikus NK sejtek frakciója ezzel párhuzamosan szignifikánsan lecsökkent minden beteg csoportban (LDR: 27,60%-kal; HDR: 21,70%-kal, teleterápia: 30,90%-kal, Kiber-kés: 19,16%-kal) már a kezelés megkezdése előtt a kontroll átlagához képest (70,18% ± 12,45%), azonban 36 hónappal a terápia után három beteg csoportban (LDR: 65,27% ± 9,32%; HDR: 63,63% ± 17,08%; Kiber-kés: 65,44% ± 13,02%) normalizálódott a

citotoxikus NK sejtek frakciója. A teleterápiás csoport tagjaiban az érett NK sejtek szintje nem normalizálódott 36 hónappal a terápia után sem, szignifikánsan alacsonyabb maradt a kontroll csoporthoz ($p=0,0003$), a HDR ($p=0,0150$) és a Kiber-kés terápiás csoport szintjéhez képest ($p=0,0153$) egyaránt (27C ábra).



27. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztatata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápia: n=15) enyhe csökkenő tendenciát mértünk az éretlen prekurzorok (A), és erős szignifikáns csökkenés az érett, citotoxikus NK sejtek frakciójában (C), míg az éretlen/korai érett NK sejtek aránya erős szignifikáns növekedést mutatott a betegekben a kontroll csoporthoz képest még 36 hónappal a kezelést követően is (B). A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Forrás: saját ábra.

A degranulált NK sejtek szintje nem mutatott szignifikáns eltérést a betegekben kezelés előtt a kontroll csoporthoz képest ($1,74\% \pm 1,50\%$), és arányuk egészen 36 hónapig kontroll körül mozgott a betegekben, csak a teleterápiás csoportban kezdett emelkedni 12 hónappal a terápia után ($p=0,072$), majd szignifikánsan megemelkedett 24 ($p=0,005$) és 36 hónappal ($p=0,025$) a terápia után (28A ábra). Az anergikus NK sejtek frakciója – hasonlóan a degranulált állapotú NK sejtek csoportjához – nem változott szignifikánsan a betegekben kezelés előtt a kontroll csoporthoz képest ($9,06\% \pm 2,32\%$). Közvetlenül a terápia után a Kiber-kés terápia csoportban emelkedett 1,5-szörös mértékben az arányuk ($13,60 \pm 6,45\%$), majd egészen 36 hónappal a terápia után is szignifikánsan magas maradt ($13,52\% \pm 7,15\%$) mind a kontroll csoporthoz ($p=0,010$), mind a HDR csoporthoz képest ($p=0,015$) (28B ábra).



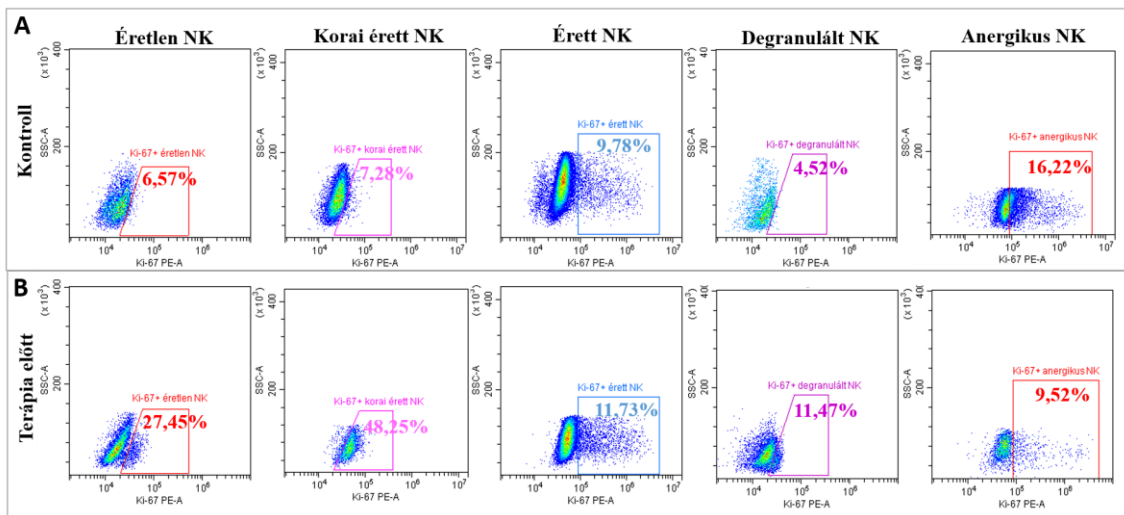
28. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) a degranulált NK sejtek frakciója kontroll körül mozgott (csak a teleterápiás csoportban nőtt meg szignifikánsan 24, illetve 36 hónappal a terápia után) (A), míg az anergikus NK sejtek aránya a Kiber-kés terápia csoportban nőtt meg szignifikánsan, a többi betegben kontroll szint körül változott (B). A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Forrás: saját ábra.

4.2.4.7. Osztódó NK sejtek változása

A Ki67 sejtmagi marker expressziójával vizsgáltuk a természetes ölüsejtek alcsoportjainak osztódási kinetikáját (függelék 11-12. ábra). Az osztódó Ki67+ éretlen prekurzorok ~3,5-szörös, míg a Ki67+ éretlen/korai érett NK sejtek aránya ~5-szörös növekedést mutatott a betegekben a kontroll csoporthoz képest a kezelés megkezdése előtt. Mindkét alcsoport osztódási kinetikája ezen a szignifikánsan magas szinten

maradt 36 hónappal a kezelés után is. Az osztódó érett NK sejtek aránya azonban nem változott szignifikánsan egyik beteg csoportban sem a nyomon követés ideje alatt. Vizsgáltuk továbbá a degranulált NK sejtek osztódási kinetikáját is, amely a kezelés előtt ~2-szer magasabb volt a betegekben a kontroll csoporthoz képest ($6,48\% \pm 7,985$). A HDR csoportban a kezelést követően 3 hónappal ($16,86\% \pm 5,88\%$), illetve 6 hónappal ($15,62\% \pm 5,78\%$) nőtt meg szignifikánsan a Ki67+ degranulált NK sejtek szintje, majd 9. hónaptól normalizálódott. A Kiber-kés terápiás csoportban a kezelés előtti időponttól ($14,04\% \pm 3,12\%$) kezdve szignifikánsan megnőtt az osztódó degranulált NK sejtek aránya, amely még 12 hónappal a terápia után is magas maradt ($17,82\% \pm 3,12\%$), majd azután normalizálódott. Három évvel a terápia vége után minden betegben kontroll szint köré csökkent a sejtek aránya. Az anergikus NK sejtek osztódási képessége a kontrollhoz képest ($18,89\% \pm 9,49\%$) szignifikánsan lecsökkent a betegekben kezelés előtt (LDR: $12,47\% \pm 2,14\%$; HDR: $11,89\% \pm 2,44\%$; teleterápia: $9,40\% \pm 4,68\%$; Kiber-kés: $10,38\% \pm 2,34\%$). Kezelés után (az LDR csoportot leszámítva) a három betegcsoportban szignifikánsan alacsonyan maradt az osztódó anergikus NK sejtek frakciója terápia után 6 hónapig, majd 9. hónaptól a HDR csoportban szintjük normalizálódott. Azonban 36 hónappal a terápia után a két külső terápiás csoportban szignifikánsan alacsonyabb szintet mértünk a kontrollhoz képest (teleterápia: $9,82\% \pm 5,38\%$; Kiber-kés: $5,43\% \pm 2,42\%$).

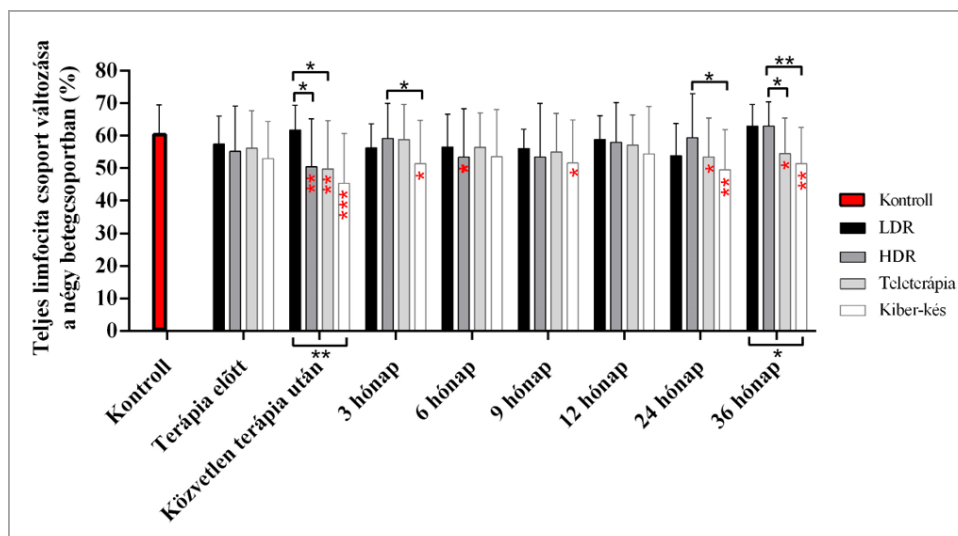
A Ki67 sejtmagi marker expressziójával vizsgáltuk az NK sejtek alcsoportjainak osztódási képességét és mértékét, amelynek alcsoportonkénti változását az alábbi áramlási citometriás grafikonok illusztrálják egy reprezentatív kontroll mintában (29A ábra), illetve egy kezelés előtti beteg mintában (29B ábra).



29. ábra: A Ki67 sejtmagi marker expressziójának változása az NK sejtek különböző alcsoportjaiban egy reprezentatív kontroll mintában (A), illetve egy kezelés előtti beteg mintában (B). Az éretlen prekursor, a korai érett és a degranulált NK sejtek Ki67 expressziója növekszik, az érett NK sejtek esetében nem változik, míg a Ki67+ anergikus NK sejtek frakciója csökken a beteg mintába a kontroll mintához képest. Forrás: saját ábra.

4.2.4.8. A teljes limfocita csoport, illetve a CD3+, CD4+ és CD8+ T limfocita alcsoportok változása

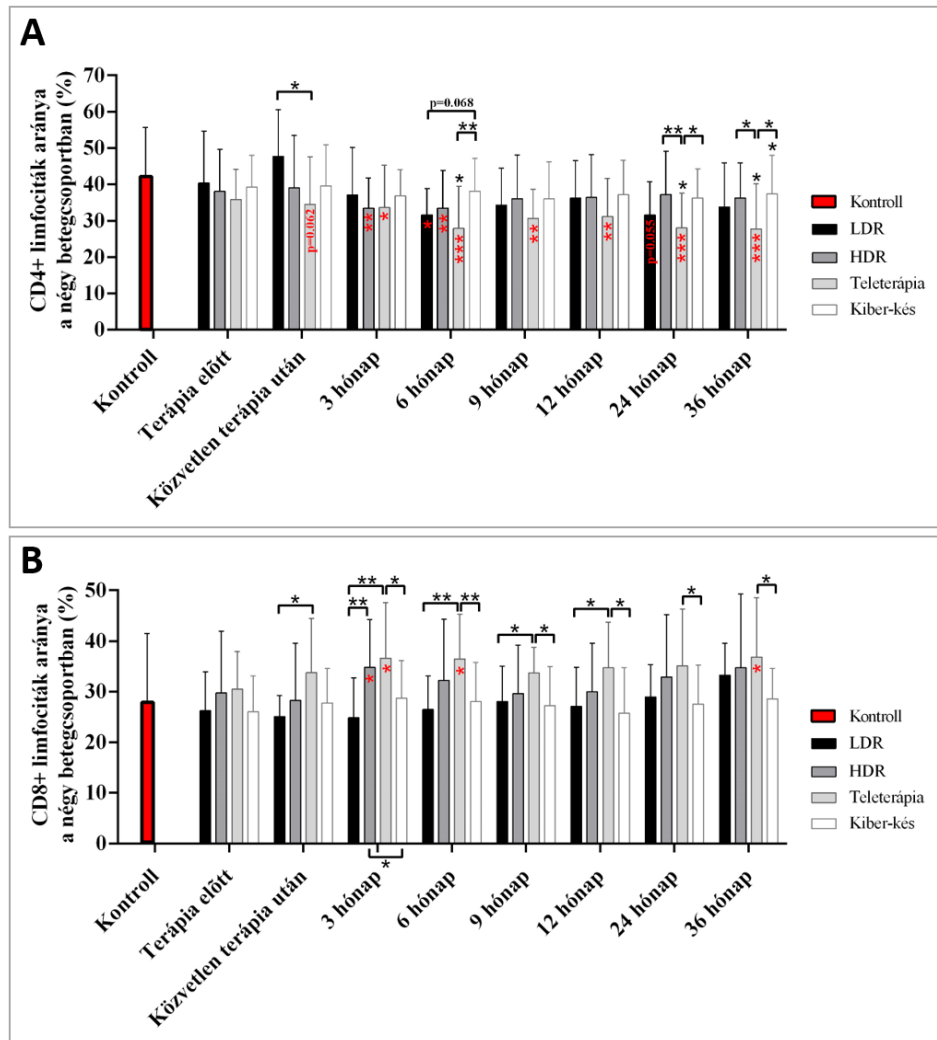
A perifériás vérben keringő limfociták csoportját fizikai paramétereik alapján, az SSC-FSC paraméterek alapján határoztuk meg a betegekben, hogy összehasonlíthassuk a változását mind a négy beteg csoportban. A limfociták mennyisége a kontroll csoporthoz képest ($60,63\% \pm 8,82\%$) nem változott szignifikánsan egyik beteg csoportban sem a terápia előtti időpontban (LDR: $57,46\% \pm 8,552\%$; HDR: $55,20\% \pm 13,90\%$; teleterápia: $56,22\% \pm 11,50\%$; $52,99\% \pm 11,33\%$). Közvetlenül a sugárterápia után azonban a HDR ($50,52\% \pm 14,68\%$), a teleterápiás ($49,79\% \pm 14,87\%$) és a Kiber-kés terápiás csoportban ($45,40\% \pm 15,27\%$) is szignifikánsan lecsökkent a limfociták aránya, míg az LDR brachyterápiában részesült betegekben nem változott a limfociták aránya ($61,71\% \pm 7,67\%$) a kontrollhoz képest. Kiemelendő, hogy a két külső terápiában részesülő beteg csoportban még 36 hónappal a terápia vége után is szignifikánsan alacsonyabb maradt a limfociták frakciója (teleterápia: $54,46\% \pm 10,97\%$; Kiber-kés: $51,37\% \pm 11,20\%$) (30. ábra).



30. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztatata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) nem változott a limfociták aránya a kezelés előtti időpontban a kontrollhoz képest, azonban közvetlen a terápia után (az LDR csoporton kívül) minden betegben szignifikánsan lecsökkent. A két külső terápiában részesülő beteg csoportban még 36 hónappal a terápia vége után is szignifikánsan alacsonyabb maradt a limfociták frakciója a kontroll szinthez képest. A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).
 Forrás: saját ábra.

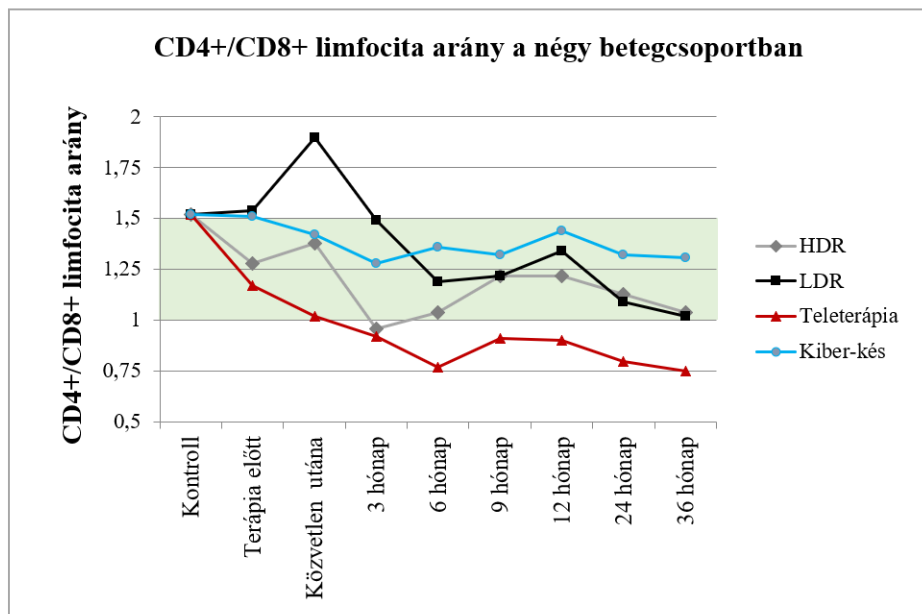
Ezután megvizsgáltuk a teljes limfocita csoporton belül a CD3+CD4+ és a CD3+CD8+ limfociták alcsoportját, amelyek egyike sem változott szignifikánsan a kezelés előtt a kontroll csoporthoz képest. A CD4+ limfociták aránya 6 hónappal a kezelés után szignifikánsan lecsökkent az LDR ($31,61\% \pm 7,20\%$), a HDR ($33,48\% \pm 10,34\%$) és a teleterápiás csoportban ($27,90\% \pm 11,60\%$) a kontroll csoporthoz képest ($42,41\% \pm 13,24\%$). Azonban a 9. hónaptól a két brachyterápiás kezelésben részesült csoportban a CD4+ limfociták szintje normalizálódott, és kontroll szint közelében maradt a nyomon követés teljes idejére. A teleterápiás csoportban a limfocita frakció a 6. hónapban szignifikánsan lecsökkent ($27,90\% \pm 11,60\%$), és hosszú távon, még három évvel a terápia vége után is szignifikánsan alacsony szinten maradt ($27,77\% \pm 12,43\%$). A Kiber-kés terápiás csoportban nem változott szignifikánsan a CD4+ limfociták frakciója sem terápia előtt, sem azutáni időpontokban (31A ábra). A CD8+ limfociták aránya 3 hónappal a kezelést követően szignifikánsan megnőtt a HDR ($34,80\% \pm 9,47\%$) és a teleterápiás csoportban ($36,61\% \pm 10,96\%$) a kontroll csoporthoz képest

(27,99% ± 13,53%), amely emelkedettebb szint a teleterápiás csoportban 6 hónappal a terápia után is kimutatható volt (36,45% ± 8,83%), majd átmeneti emelkedést követően 36 hónappal később szintén szignifikánsan megnőtt (36,84% ± 11,69%) az aránya. A többi beteg csoportban szintje normalizálódott (31B ábra).



31. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) vizsgáltuk a CD4+ és CD8+ limfociták változását. A CD4+ limfociták csoportja szignifikánsan lecsökkent a HDR és teleterápiás csoportokban a 3-dik hónaptól a kontrollhoz képest, majd szintje a teleterápiás csoportot leszámítva normalizálódott 3 évvel a kezelés után (A), míg a CD8+ limfociták frakciója a HDR és teleterápiás csoportban szignifikánsan megnőtt 3 hónappal a terápia után, majd normalizálódott (B). A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001). Forrás: saját ábra.

Ezt követően vizsgáltuk a helper és citotoxikus T limfocitáknak az arányát, amely arányszám nagyon fontos mutatója az immunrendszer állapotának és működésének. Az arányszám a kontroll csoportban megállapított 1,52 értéknél minden beteg csoportban és időpontban alacsonyabb volt. Csak az LDR csoportban közvetlenül a terápia utáni időpontban nőtt meg 1,90 értékre, majd 3. hónaptól ebben a csoportban is kontroll szint alá csökkent az arányuk. Fontos kiemelni, hogy tartósan 1 alá a teleterápiás kezelésben részesült betegekben csökkent le az arány kezelés után 3 hónappal, majd 1 alatt maradt a nyomon követés teljes időtartama alatt (32. ábra).

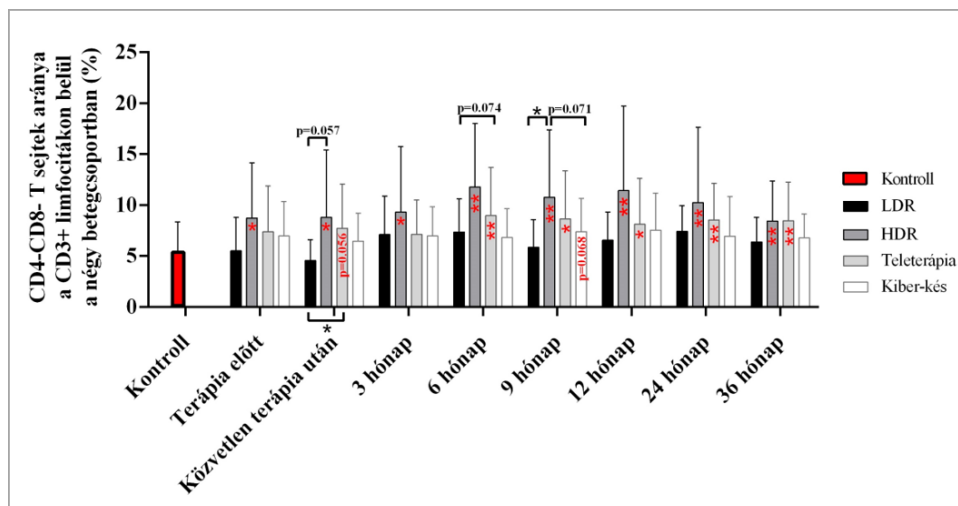


Kontroll	Terápia típusa	Terápia előtt	Közvetlen utána	3 hónap	6 hónap	9 hónap	12 hónap	24 hónap	36 hónap
1,52	HDR	1,28	1,38	0,96	1,04	1,22	1,22	1,13	1,04
	LDR	1,54	1,90	1,49	1,19	1,22	1,34	1,09	1,02
	Teleterápia	1,17	1,02	0,92	0,77	0,91	0,90	0,80	0,75
	Kiber-kés	1,51	1,42	1,28	1,36	1,32	1,44	1,32	1,31

32. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápia: n=15) vizsgáltuk a CD4+/CD8+ limfocita arányt, amely minden betegben a kontroll 1,52 érték alatt mozgott, és tartósan 1 érték alá a teleterápiás kezelésben részesült betegekben csökkent le, amely a nyomon követés teljes időtartama alatt ezen az alacsony szinten maradt. A grafikonon minden pont az adott betegcsoportban és adott időpontban vett átlag CD4+ és átlag CD8+ limfociták aránya, amely értékeket a grafikon alatti táblázat tartalmaz. A zöld sáv jelzi az irodalom szerinti normál tartományt. Forrás: saját ábra.

4.2.4.9. CD4-CD8- dupla negatív T limfociták változása

Vizsgáltuk a T limfocitáknak egy kicsi, azonban annál jelentőségteljesebb alcsoportját, a CD3+CD4-CD8- dupla negatív T sejteket, melyek a Treg sejtekkel mutatnak hasonló funkciókat. Csak a HDR csoportban nőtt meg szignifikánsan a dupla negatív T sejtek frakciója a kontroll csoporthoz képest ($5,48\% \pm 2,86\%$), és a terápia utáni későbbi időpontokban továbbra is szignifikánsan magas maradt a szintje. A legmagasabb arányt 6 hónappal a terápia után mértünk ($11,77\% \pm 6,24\%$), és még 36 hónappal a terápia után is emelkedett szintet mutatott ($8,43\% \pm 3,93\%$). Hat hónappal a teleterápia után szignifikánsan megnőtt a CD4-CD8- T sejt frakció a betegekben ($8,97\% \pm 4,71\%$), amely tartósan, még 36 hónappal később is ezen a szinten maradt ($8,44\% \pm 3,79\%$). Az LDR és a Kiber-kés terápiás csoportban nem változott szignifikánsan a dupla negatív T sejtek aránya a nyomon követés ideje alatt (33. ábra).



33. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) vizsgáltuk a CD3+CD4-CD8- dupla negatív T sejtek arányát, amely szignifikánsan megnőtt a HDR beteg csoportban kezelés előtt, és ezen a szinten maradt a nyomon követés ideje alatt. A teleterápiás csoportban később, 6 hónappal a terápia után nőtt meg szignifikánsan a dupla negatív T sejtek frakciója, és szintén hosszú távon, három évvel később is magas szinten detektáltuk. A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). Forrás: saját ábra.

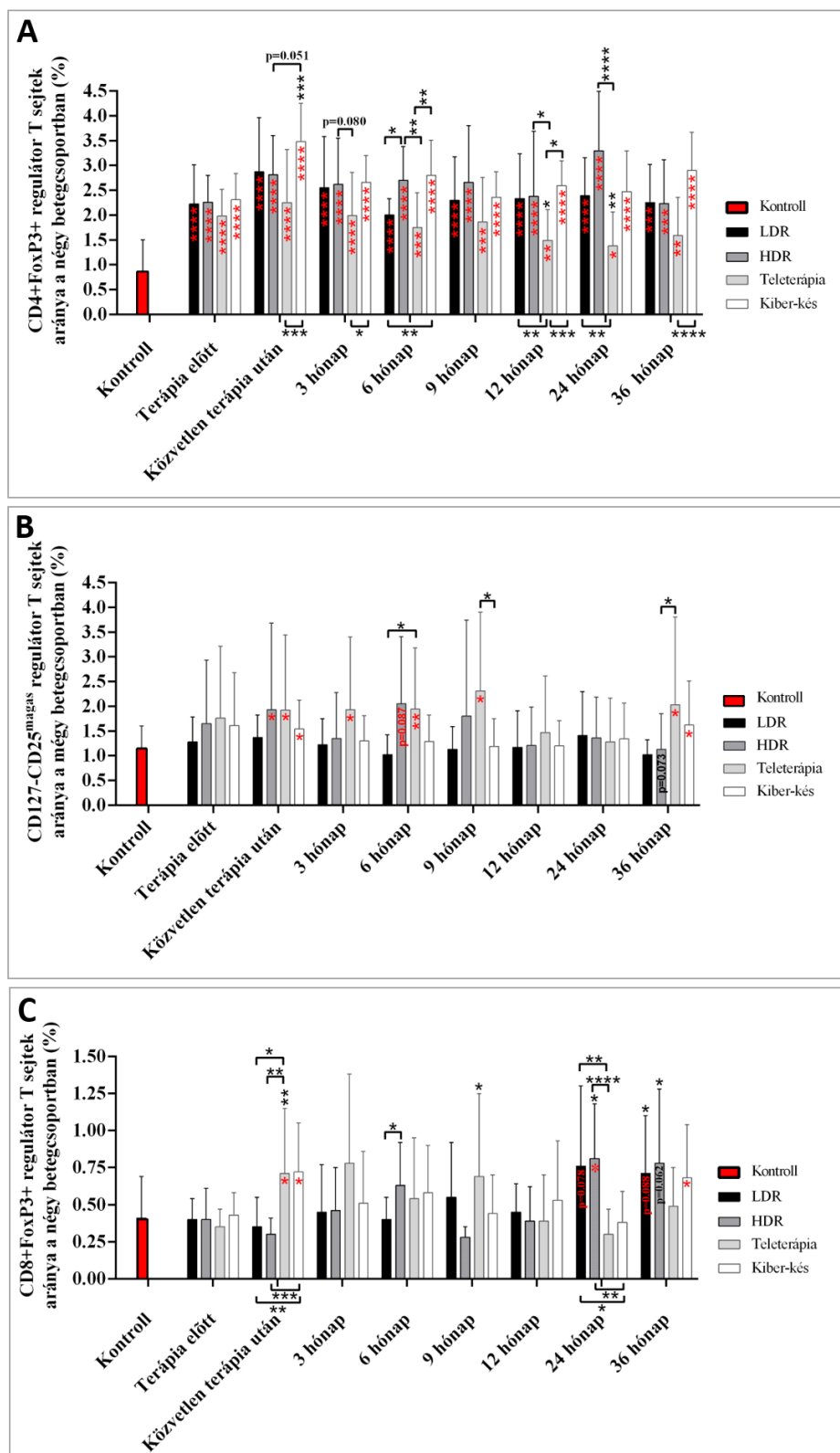
4.2.4.10. CD3+ és CD3- T limfociták arányának változása

Ezután vizsgáltuk a teljes CD3+ limfociták csoportjának változását is, majd a CD3 markert – a T limfociták normális működéséhez és sikeres antigén prezentáláshoz nélkülözhetetlen kostimulációs markert – nem expresszáló, aberráns CD4+ és CD8+ T limfociták változását mind a kontroll csoportban, mind pedig a négy beteg csoportban. A CD3+ limfociták aránya a kontroll csoportban mért átlagtól ($62,37\% \pm 13,72\%$) nem tért el szignifikánsan egyik beteg csoportban sem kezelés előtt (LDR: $58,45\% \pm 12,14\%$; HDR: $57,97\% \pm 14,49\%$; teleterápia: $59,94\% \pm 13,33\%$; Kiber-kés: $54,04 \pm 12,28\%$) és közvetlenül a kezelés után sem (LDR: $61,41\% \pm 13,49\%$; HDR: $55,55\% \pm 18,59\%$; teleterápia: $60,75\% \pm 13,64\%$; Kiber-kés: $57,61\% \pm 14,00\%$). Az LDR csoportban 3 hónappal a kezelés után közel szignifikáns mértékű csökkenés következett be ($p=0,0671$), majd 6, 9 és 12 hónappal a terápia után szignifikánsan alacsony szinten maradt, végül 24 hónap után normalizálódott a szintje. A HDR csoportban csak 6 hónappal a kezelést követően csökkent le szignifikánsan ($54,60\% \pm 12,40\%$), majd szintje normalizálódott a beteg csoportban. A Kiber-kés terápiás csoportban, az LDR-hez hasonlóan közel szignifikáns mértékben csökkent a szintje ($p=0,0766$) 3 hónappal a terápia után, és szintje 24 hónapig kontroll szint alatt maradt ($53,21\% \pm 11,15\%$). Három évvel a terápia után minden csoportban visszatért a CD3+ limfociták aránya a kezelés előtti szintre, a kontrolltól pedig egyik csoportban sem különbözött szignifikánsan. A CD3 markert nem expresszáló CD4+ és CD8+ limfociták aránya nagymértékben különbözött a kontroll csoportban (CD4+ limfocitákon belül: $2,44\% \pm 1,19\%$; CD8+ limfocitákon belül: $35,48\% \pm 20,52\%$). A betegekben azonban a CD4+ limfocitákon belül szignifikánsan megemelkedett az aberráns, CD3- sejtek aránya már a kezelés előtt (LDR: $5,44\% \pm 3,04\%$; HDR: $8,54\% \pm 8,71\%$; teleterápia: $8,49\% \pm 3,36\%$; Kiber-kés: $10,89\% \pm 10,56\%$), és egészen 3 éven át ezen az emelkedett szinten maradt, addig a CD8+ limfociták csoportjában nem tudtunk szignifikáns változást kimutatni a betegekben a kontroll csoporthoz képest sem kezelés előtt (LDR: $38,74\% \pm 14,34\%$; HDR: $31,22\% \pm 16,39\%$; teleterápia: $30,88\% \pm 20,43\%$; Kiber-kés: $34,66\% \pm 15,34\%$) (függelék 13. ábra).

4.2.4.11. CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺CD127^{alacsony/-}CD25^{magas} és a CD8⁺FoxP3⁺ fenotípusú regulátor T sejtek változásának összehasonlítása

Vizsgáltuk az immunhomeosztázis fenntartásában fontos szerepet játszó Treg sejtek arányát és változását a kontroll és a négy betegcsoportban sugárterápia előtti és utáni időpontokban. Nem csak a FoxP3⁺ csoportként beazonosított, hanem a CD127^{alacsony/-}CD25^{magas} fenotípussal rendelkező Treg sejtek csoportját is vizsgáltuk, és összehasonlítottuk változásukat. A CD4⁺FoxP3⁺ Treg sejtek aránya a kontroll csoporthoz (0,86% ± 0,64%) képest több, mint kétszeresen megemelkedett a betegekben kezelés előtt (LDR: 2,22% ± 0,79%; HDR: 2,26% ± 0,54%; teleterápia: 1,98% ± 0,54%; Kiber-kés: 2,31% ± 0,53%), és mind a négy csoportban szignifikánsan magas szinten maradt a nyomon követés teljes ideje alatt, még három évvel a kezelést követően is (LDR: 2,25% ± 0,77%; HDR: 2,23% ± 0,88%; teleterápia: 1,59% ± 0,76%; Kiber-kés: 2,90% ± 0,77%) (35A ábra). Ezzel szemben a CD127^{alacsony/-}CD25^{magas} fenotípusú Treg sejtek aránya kisebb mértékben, és közvetlenül a kezelés után nőtt meg a kontrollhoz képest (1,16% ± 0,44%) szignifikánsan a HDR (1,93% ± 1,75%), a teleterápiás (1,92% ± 1,52%) és a Kiber-kés terápiás csoportban (1,54% ± 0,58%). Három évvel a terápia után szintje a teleterápiás (2,03% ± 1,77%) és a Kiber-kés terápiás csoportban (1,62% ± 0,89%) maradt szignifikánsan magas. A két brachyterápiás csoportban szintje 9 hónappal a terápia után normalizálódott (35B ábra).

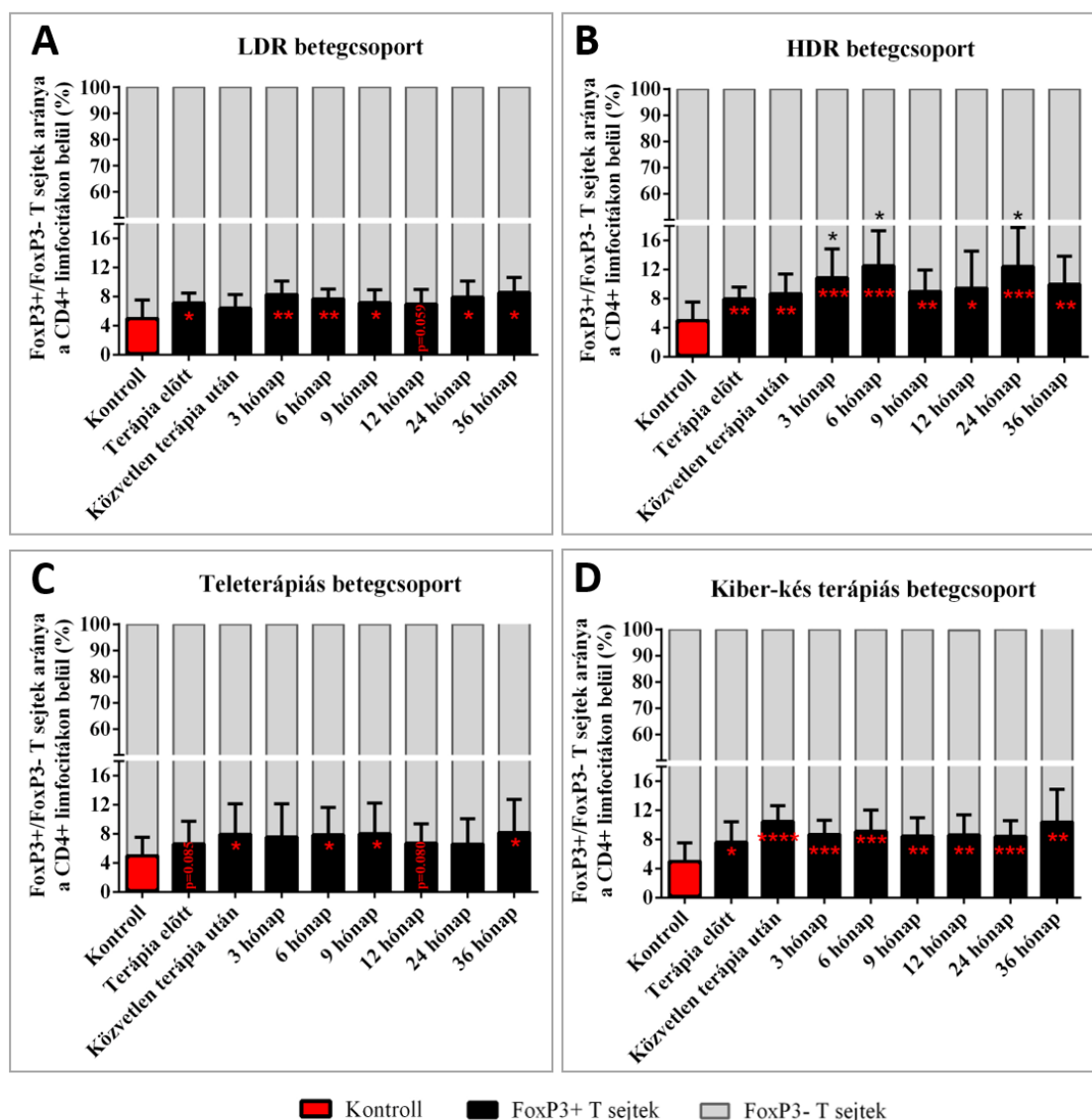
A CD4⁺ Treg sejtek mellett vizsgáltuk a CD8⁺FoxP3⁺ Treg sejtek frakcióját is, amelynek a szintje nem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest (0,41% ± 0,28%) a betegekben kezelés előtt (LDR: 0,40% ± 0,14%; HDR: 0,41% ± 0,21%; teleterápia: 0,35% ± 0,12%; Kiber-kés: 0,43% ± 0,15%). Közvetlenül a terápia után szignifikánsan megemelkedett a szintje a teleterápiás csoportban 1,73-szorosan, és a Kiber-kés terápiás csoportban 1,75-szörösen, majd szintjük ezekben a csoportokban fokozatosan, 24 óra kontroll szintre csökkent vissza. A két brachyterápiás csoportban a Treg sejtek frakciója kezelés előtt, és a kezelés után egy évig kontroll szint körül mozgott, majd 24 hónappal a terápia után az LDR csoportban közel szignifikánsan (p=0,078), míg a HDR csoportban szignifikánsan megemelkedett a szintje (p=0,016), amely 36 hónappal a kezelés után is hasonló szinten maradt mindkét csoportban (35C ábra).



35. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teletéripiás: n=20; Kiber-kés terápia: n=15) szignifikánsan megnőtt a CD4+FoxP3+ Treg sejtek aránya a betegekben a kontrollhoz képest a

nyomon követés teljes ideje alatt (A), ezzel szemben a CD127^{alacsony/-}CD25^{magas} fenotípusú Treg sejtek aránya sokkal kisebb mértékben nőtt meg a betegekben, azonban 36 hónappal a terápia után a két külső terápiás csoportban szignifikánsan magas maradt (B). A CD8⁺FoxP3⁺ Treg sejtek frakciója közvetlen a terápia után nőtt meg szignifikánsan a két külső terápiás csoportban, majd egy átmeneti normalizálódás után, 36 hónappal később újra szignifikánsan megnőtt a Kiber-kés terápiás csoportban, míg a többi betegben szignifikánsan nem változott a szintje (C). A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Forrás: saját ábra.

Vizsgáltuk a FoxP3⁺/FoxP3⁻ arányt mind a CD4⁺, mind a CD8⁺ T limfocita csoporton belül. A kontroll szinthez képest ($4,98\% \pm 2,54\%$) mind a négy betegcsoportban szignifikánsan (teleterápiás csoportban közel szignifikánsan) megemelkedett a FoxP3⁺ sejtek aránya a CD4⁺ limfocitákon belül terápia előtti időpontban (LDR: $7,13\% \pm 1,36\%$; HDR: $7,97\% \pm 1,63\%$; teleterápia: $6,62\% \pm 3,09\%$; Kiber-kés: $7,61\% \pm 2,81\%$), amely három évvel a kezelést követően is fentmaradt (36. ábra). Az LDR, HDR és Kiber-kés terápiás csoportban ehhez nagyon hasonló eredményeket kaptunk a CD8⁺ limfociták csoportján belül is, azonban a teleterápiás csoportban terápia előtt és rögtön utána csak gyenge, majdnem szignifikáns növekedést kaptunk, majd a későbbi időpontokban (3 hónaptól 36 hóig) kontroll szint körül maradt a FoxP3⁺ T sejtek frakciója (függelék 14. ábra).

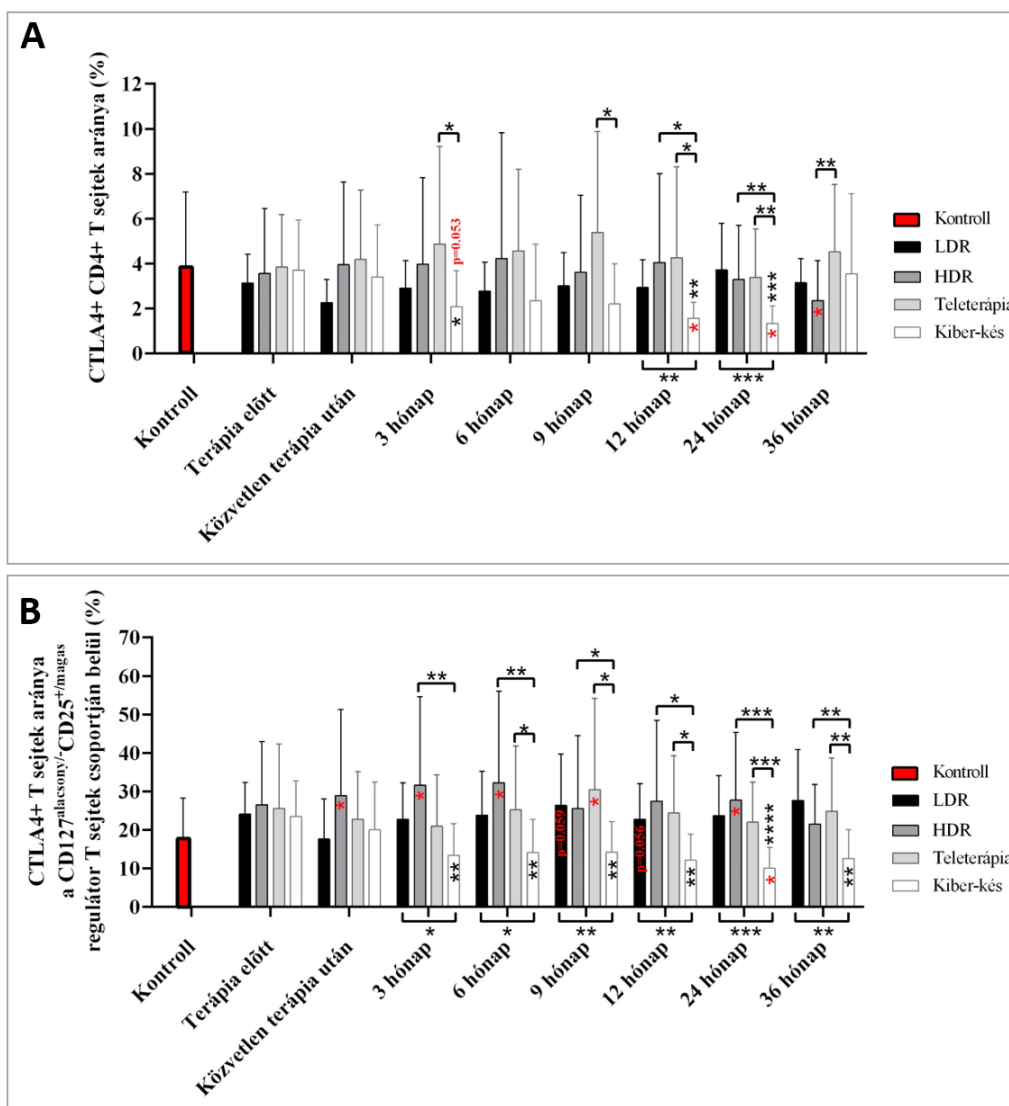


36. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoport (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápia: n=15) mindegyikében szignifikánsan megnőtt a FoxP3+ sejtek aránya a CD4+ T limfociták csoportján belül már kezelés előtt, és ezen a magas szinten maradt a nyomon követés teljes ideje alatt. A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Forrás: saját ábra.

4.2.4.12. CTLA4+ T limfociták és regulátor T sejtek változása

Ezután vizsgáltuk a Treg sejtekre jellemző CTLA4 aktivációs markert expresszáló CD127^{alacsony/-}CD25^{magas} fenotípusú Treg sejtek arányát, és összehasonlítottuk a CTLA4+CD4+ T limfociták arányával mind a kontroll, mind pedig a betegcsoportban.

A CTLA4+CD4+ T sejtek aránya a kontroll átlagához képest ($3,91\% \pm 3,27\%$) nem változott a betegekben kezelés előtt (LDR: $3,14\% \pm 1,28\%$; HDR: $3,56\% \pm 2,89\%$; teleterápia: $3,86\% \pm 2,33\%$; Kiber-kés: $3,71\% \pm 2,22\%$), amely 12 hónapig nem változott a betegekben, csak a Kiber-kés terápiás csoportban csökkent a szintje szignifikánsan 12 és 24 hónappal a terápia után. A HDR csoportban a két éves nyomon követés alatt végig kontroll közelében volt a szintje, majd 36 hónappal a terápia után szignifikánsan lecsökkent a szintje. A másik három beteg csoportban a CTLA4+CD4+ T sejtek arányát kontroll szinten detektáltuk három évvel a terápia után (37A ábra). A CTLA4+ sejtek aránya a CD127^{alacsony}/-CD25^{magas} Treg sejtek csoportjában a kontrollhoz képest ($17,98\% \pm 10,32\%$) nem változott szignifikánsan a betegekben (LDR: $24,11\% \pm 8,25\%$; HDR: $26,54\% \pm 16,44\%$; teleterápia: $25,61\% \pm 16,70\%$; Kiber-kés: $23,47\% \pm 9,28\%$), majd közvetlen terápia után csak a HDR-es csoportban nőtt meg szignifikánsan az aránya ($28,94\% \pm 22,38\%$), amely 24 hónapig magasán maradt, majd normalizálódott 3 évvel később. A Kiber-kés terápiás csoportban 3 hónappal a terápia után szignifikánsan lecsökkent a szintje ($13,43\% \pm 8,22\%$) és ezen az alacsony szinten maradt a nyomon követés teljes ideje alatt. Az LDR csoportban enyhe, nem szignifikáns növekedést tapasztaltunk 9 és 12 hónappal a terápia után, majd normalizálódott, és a teleterápiás csoportban is 9 hónappal később nőtt meg szignifikánsan a szintje, majd normalizálódott (37B ábra).

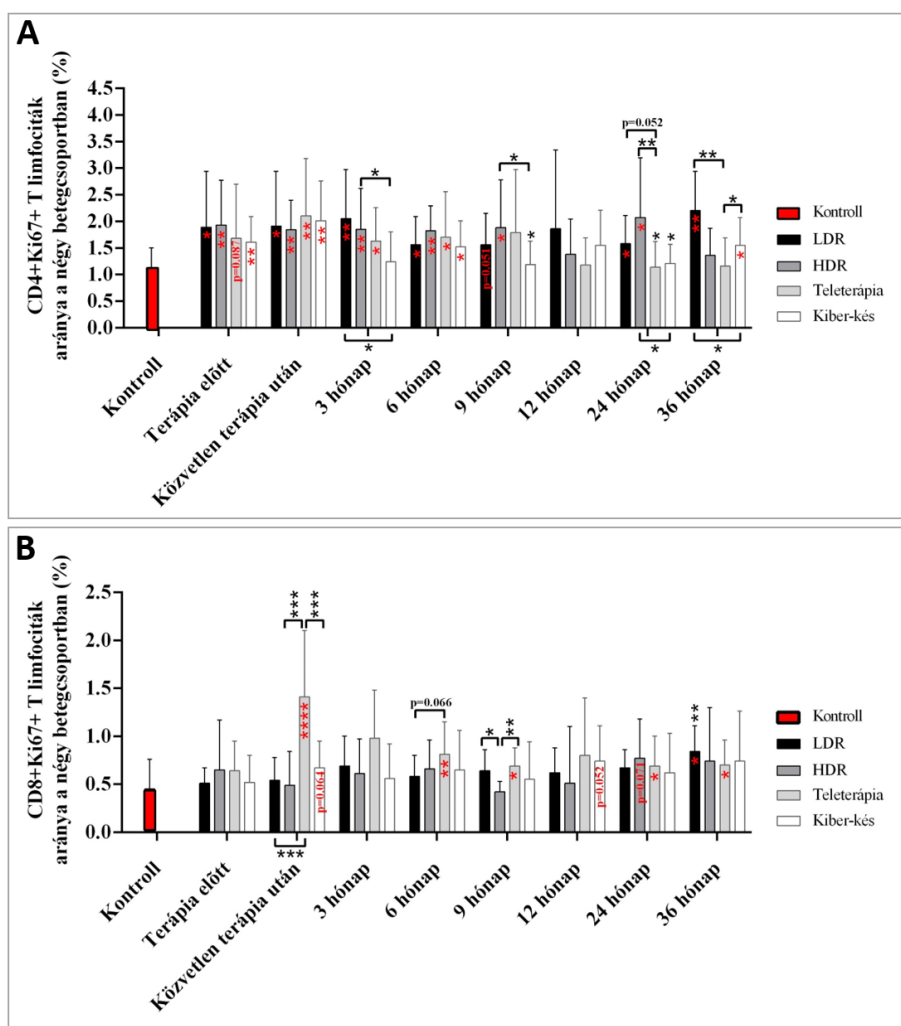


37. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztatata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) nem változott szignifikánsan a CTLA4+CD4+ T sejtek aránya a kontrollhoz képest, és szignifikáns csökkenést csak a Kiber-kés és a HDR csoportban tapasztaltunk késői időpontokban, 12 hónappal a terápia után (A). A CTLA4+ sejtek aránya a CD127^{alacsony/-}CD25^{magas} fenotípusú Treg sejtek csoportján belül szintén nem változott szignifikánsan a betegekben a kontrollhoz képest, majd a HDR csoportban kaptunk szignifikáns növekedést, amely egészen a 24 hónapig fennállt, majd normalizálódott. A Kiber-kés terápiás csoportban pedig szignifikáns csökkenést tapasztaltunk 3 hónappal a terápia után, amely 3 évvel később is kimutatható volt a kezelés előtti szinthez képest (B). A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ****: p < 0,0001). Forrás: saját ábra.

4.2.4.13. Osztódó T limfociták változása

Összehasonlítottuk a CD4+ és a CD8+ limfociták osztódási képességét a Ki67 sejtmagi marker expressziójának mérésével. Az osztódó CD4+ T limfociták aránya a kontroll csoporthoz képest ($1,13\% \pm 0,37\%$) szignifikánsan megnőtt a betegekben a kezelés előtti időpontban (LDR: $1,89\% \pm 1,05\%$; HDR: $1,93\% \pm 0,84\%$; teleterápia: $1,68\% \pm 1,02\%$; Kiber-kés $1,61\% \pm 0,48\%$), amely 6 hónappal a terápia után is ezen az emelkedett szinten maradt (LDR: $1,56\% \pm 0,53\%$; HDR: $1,82\% \pm 0,47\%$; teleterápia: $1,70\% \pm 0,86\%$; Kiber-kés $1,52\% \pm 0,49\%$). Három évvel a kezelést követően az LDR ($2,20\% \pm 0,74\%$) és a Kiber-kés csoportban ($1,55\% \pm 0,52\%$) nőtt meg újra szignifikánsan a szintje, míg a HDR és a teleterápiás csoportban a 12. hónaptól normalizálódott az aránya (38A ábra).

Az osztódó CD8+ limfociták frakciója nem változott szignifikánsan a betegekben a kontrollhoz képest ($0,45\% \pm 0,31\%$) a terápia előtti időpontban, majd közvetlenül a terápia után csak a teleterápiás csoportban nőtt meg szignifikánsan ($1,41\% \pm 0,69\%$), és 24 ($0,69\% \pm 0,31\%$) és 36 hónappal ($0,70\% \pm 0,26\%$) később is emelkedett szinten maradt. Három évvel a kezelés után a teleterápiás csoporton kívül az LDR csoportban is szignifikánsan megnőtt a CD8+Ki67+ T sejtek aránya ($0,84\% \pm 0,27\%$), azonban a másik két beteg csoportban szintjük kontroll körül maradt (38B ábra).

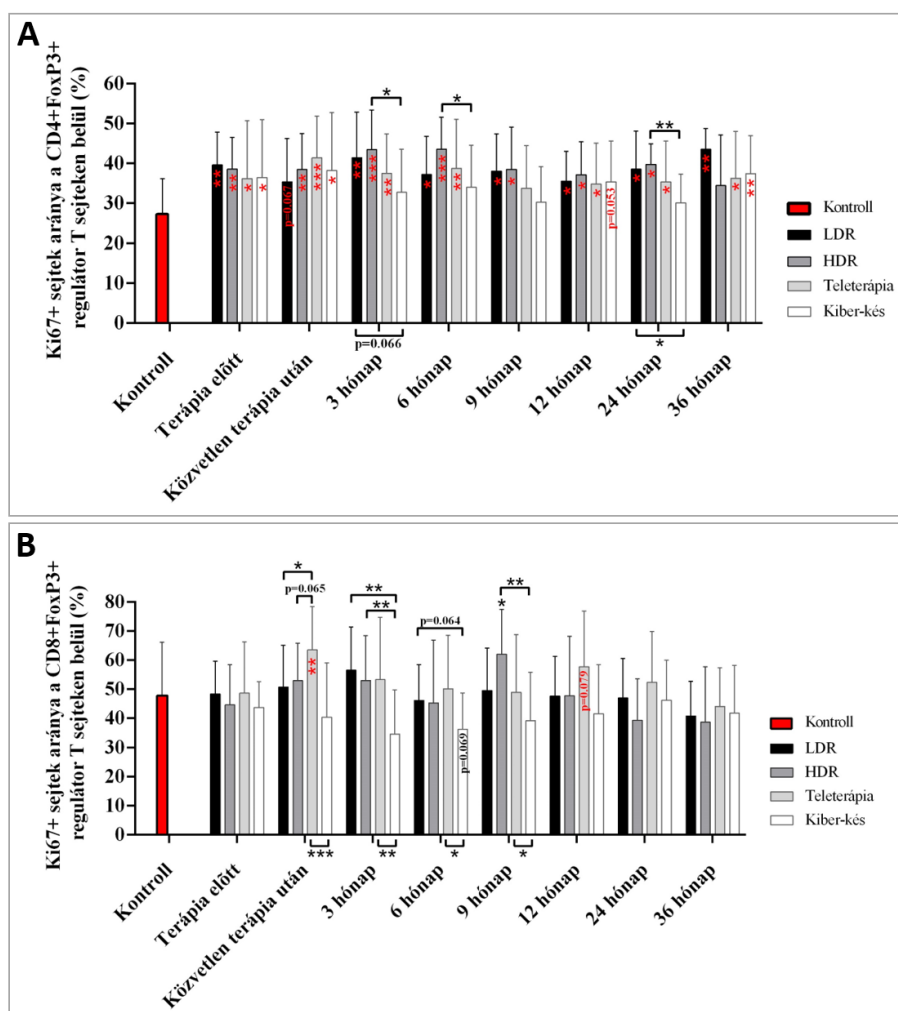


38. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápia: n=15) szignifikánsan megnőtt a CD4+Ki67+ osztódó T sejtek aránya a betegekben a kontrollhoz képest, 6 hónapig emelkedett szinten maradt, majd 36 hónappal a terápia után az LDR és Kiber-kés csoportban (a másik két csoporttal ellentétben) nem normalizálódott az arányuk (A). Ezzel szemben a CD8+Ki67+ osztódó T limfociták frakciója csak a teleterápiás csoportban nőtt meg szignifikánsan közvetlenül a terápia után és 3 évvel később is ezen a szinten detektáltuk (B). A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$). Forrás: saját ábra.

4.2.4.14. Osztódó regulátor T sejtek változása

Ezután megvizsgáltuk a CD4+FoxP3+ és a CD8+FoxP3+ Treg sejtek osztódási képességét szintén a Ki67 sejtmagi marker expressziójának segítségével. Az osztódó CD4+ Treg sejtek frakciója szignifikánsan megnőtt a kontrollhoz képest ($27,53\% \pm$

8,65%) mind a négy beteg csoportban a terápia előtt (LDR: 39,61% ± 8,65%; HDR: 38,53% ± 7,92%; teleterápia: 41,41% ± 10,44%; Kiber-kés: 38,24% ± 14,52), és közvetlen a terápia után is ezen a szinten detektáltuk. Három hónappal a Kiber-kés terápia után a betegekben normalizálódott a szintje egészen 24 hónapig, majd 36 hónappal a terápia után újra szignifikánsan megemelkedett az aránya (37,43% ± 9,53%). A többi betegcsoportban az osztódó CD4+ Treg sejtek aránya szignifikánsan magas maradt a nyomon követés ideje alatt (39A ábra). Ezzel szemben az osztódó CD8+ Treg sejtek szintje nem változott szignifikánsan a betegekben a kontroll csoporthoz képest (44,71% ± 21,39%) sem kezelés előtt, sem azutáni időpontokban. Egyedül a teleterápiás csoportban mértünk szignifikánsan magasabb szintet közvetlenül a terápia után (63,49% ± 14,88%), de szintje ezekben a betegekben is normalizálódott (39B ábra).

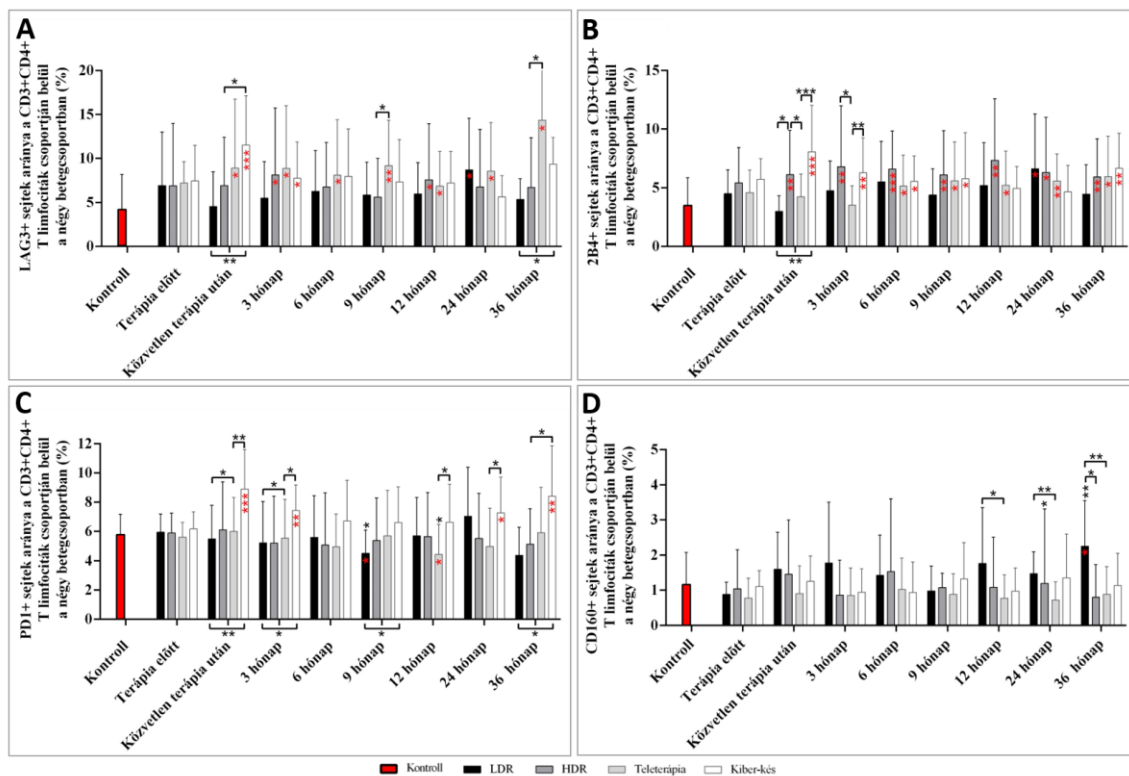


39. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápia: n=15) szignifikánsan

megnőtt a Ki67+ osztódó CD4+FoxP3+ Treg sejtek aránya a betegekben a kontrollhoz képest már kezelés előtt, és 36 hónapig emelkedett szinten maradt, csak a HDR csoportban normalizálódott akkora (A). Ezzel szemben az osztódó CD8+ Treg sejtek frakciója nem változott szignifikánsan a betegekben a kontroll csoporthoz viszonyítva, csak a Kiber-kés terápiás betegeben nőtt meg szignifikánsan terápia után közvetlenül, majd normalizálódott (B A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$). Forrás: saját ábra.

4.2.4.15. Kifáradt T limfociták változása

Vizsgáltuk a CD3+CD4+ és a CD3+CD8+ T limfociták „immunológiai kifáradását” jelző PD1, LAG3, 2B4 és CD160 sejt felszíni gátló receptorok expresszióját. A LAG3 receptorok expressziója a kontrollhoz képest ($4,24\% \pm 3,90\%$) szignifikánsan megemelkedett a két külső terápiás csoportban közvetlenül a kezelés után (teleterápia: $8,90\% \pm 7,85\%$; Kiber-kés: $11,52\% \pm 5,61\%$) és 12 hónappal a kezelés után is ezen az emelkedett szinten maradt. Három évvel a kezelés után csak a teleterápiás csoportban maradt szignifikánsan magasabb a LAG3+CD4+ T sejtek aránya ($14,34\% \pm 8,98\%$), a többi betegcsoportban kontroll szint közelében detektáltuk (40A ábra). A 2B4 receptorok expressziója a CD4+ T limfociták felszínén szintén szignifikánsan megemelkedett a kontroll csoporthoz képest ($3,52\% \pm 2,33\%$) a HDR ($6,11\% \pm 3,78\%$) és a Kiber-kés terápiás csoportban ($8,06\% \pm 3,96\%$) közvetlenül a terápia utáni időpontban, és 36 hónappal a terápia után szintjük ezen a szignifikánsan megnőtt szinten maradt (HDR: $5,91\% \pm 3,27\%$; Kiber-kés: $6,65\% \pm 2,99\%$). A teleterápiás csoportban a terápia után 6 hónappal nőtt meg szignifikánsan a szintje a 2B4+CD4+ T sejtek aránya ($5,14\% \pm 2,62\%$) a kontrollhoz képest, és három évvel később is ezt a magas szintet mértük ki ($5,93\% \pm 3,47\%$) (40B ábra). Szignifikánsan megnőtt PD1 receptor expressziót csak a Kiber-kés terápiás csoportban mértünk közvetlenül a terápia után ($8,89\% \pm 2,69\%$) a kontrollhoz képest ($5,78\% \pm 1,39\%$), amely még három évvel később is magasán maradt ($8,40\% \pm 3,47\%$) (40C ábra), míg a CD160 receptor expressziója nem változott szignifikánsan egyik betegcsoportban sem a CD4+ T limfociták felszínén (40D ábra).



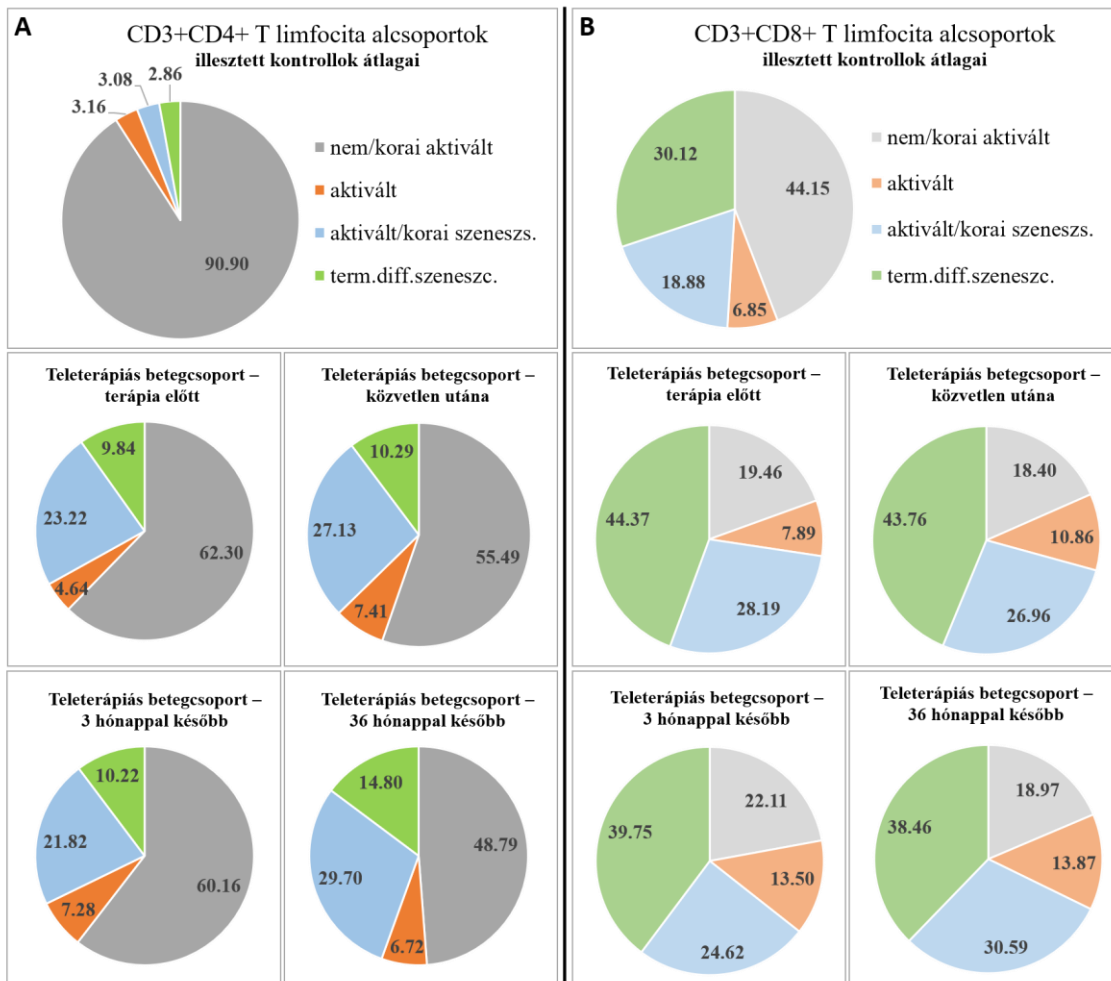
40. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápia: n=15) vizsgáltuk az „immunológiai kifáradást” jelző sejtfelszíni receptorokat a CD4+ T limfociták felszínén. Ezek a LAG3 (A), 2B4 (B), PD1 (C) és a CD160 (D) receptorok. A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).
 Forrás: saját ábra.

Ezzel ellentétben a LAG3+CD8+ és 2B4+CD8+ T limfociták aránya kontroll szint körül mozgott a betegekben terápia előtti és utáni időpontokban (nincs ábrázolva). A PD1+CD8+ T limfociták frakciója szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll csoporthoz képest ($10,05\% \pm 7,26\%$) az LDR ($4,47\% \pm 2,65\%$) és a teleterápiás csoportban ($5,56\% \pm 4,63\%$) 3 hónappal a kezelés után. Az LDR csoportban 9 hónapig maradt ezen az alacsony szinten, majd normalizálódott, a teleterápiás csoportban pedig 6-dik hónaptól nem változott szignifikánsan az aránya a kontroll csoporthoz képest. A CD160+CD8+ T limfociták frakciója a kontroll csoporthoz képest ($2,20\% \pm 1,66\%$) mind a négy betegcsoportban szignifikánsan lecsökkent (LDR: $0,90\% \pm 0,83\%$; HDR: $0,92\% \pm 1,06\%$; teleterápia: $0,62\% \pm 0,61\%$; Kiber-kés: $0,64\% \pm 0,40\%$) terápia előtt, amely alacsony szint az LDR csoporton kívül a többi betegben még 12 hónappal a

terápia után is detektálható volt. Az LDR csoportban az arány terápia után közvetlenül visszatért kontroll szint közelébe. Három évvel a terápia után csak a HDR csoportban maradt szignifikánsan alacsony a CD160+CD8+ T limfociták aránya ($0,91\% \pm 1,12\%$) (függelék 15. ábra).

4.2.4.16. Aktivált és szeneszencs T limfociták változása

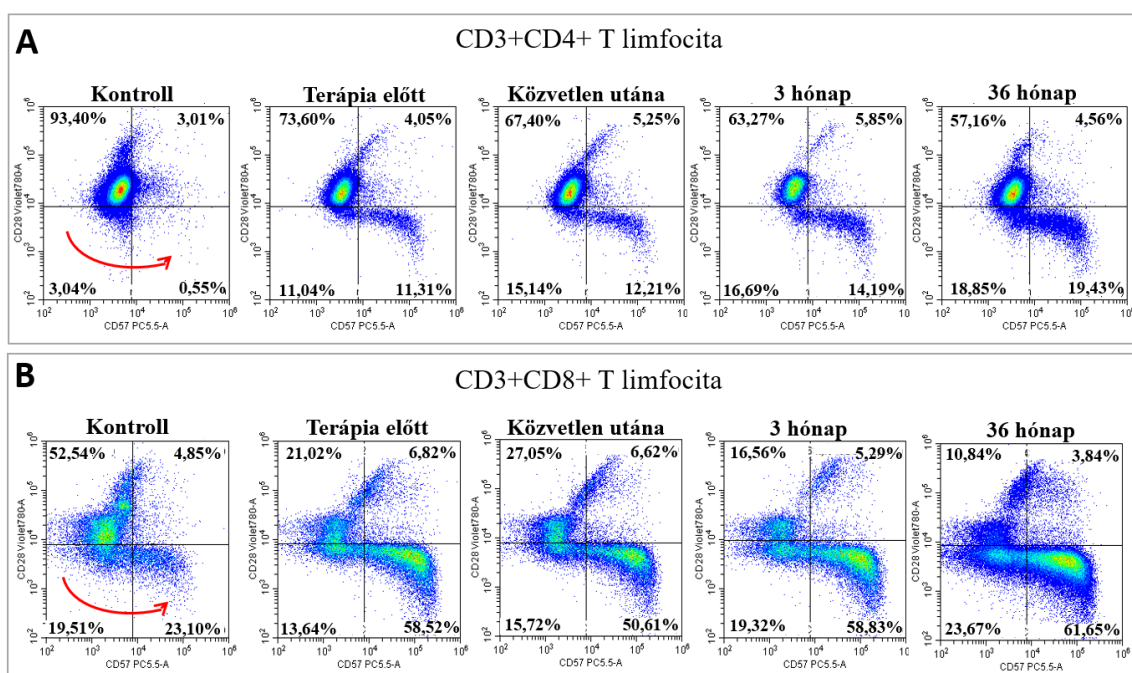
Vizsgáltuk a CD3+CD4+ és CD3+CD8+ T limfociták CD28 és CD57 sejtfelszíni receptoraik segítségével beazonosított négy különböző funkcionális alcsoportját, és azok változását a kontroll csoportban és a betegekben egyaránt. A kördiagrammok jól szemléltetik az illesztett kontroll csoportban a CD3+CD4+ (41A ábra) és CD3+CD8+ T limfocita populációk (41B ábra) funkcionális alcsoportjainak egymástól nagymértékben eltérő megoszlását. A CD4+ T limfociták döntő többsége ($90,90\% \pm 5,89\%$) nem/korai aktivált forma, és a maradék $\sim 10\%$ -on oszlik meg az aktivált ($3,16\% \pm 2,88\%$), korai szeneszencs ($3,08\% \pm 2,40\%$) és a véglegesen differenciálódott szeneszencs CD4+ T limfociták ($2,86\% \pm 3,26\%$). Ezzel ellentétben a CD3+CD8+ T limfocitákon belül a csoportok átlagos megoszlása nagymértékben eltér ettől. A CD8+ T limfociták kevesebb, mint a fele ($44,15\% \pm 15,17\%$) nem/korai aktivált forma, míg az aktivált T sejtek aránya $6,85\% \pm 3,56\%$, a korai szeneszencs formák aránya $18,88\% \pm 5,88\%$, és a terminálisan differenciálódott szeneszencs CD8+ T limfociták aránya pedig $30,11\% \pm 13,69\%$. Ezután a négy betegcsoportban is meghatároztuk mind a CD4+, mind a CD8+ T limfociták funkcionális alcsoportjainak százalékos megoszlását kezelés előtti és utáni időpontokban, amely átlag értékeket a kontroll adatokat ábrázoló kördiagrammok alatti kisebb diagrammok szemléltetik (a teleterápiás csoport adatain bemutatva). Legnagyobb mértékben a két szeneszencs CD4+ T limfocita alcsoport aránya nőtt meg a betegekben a kezelés előtti időpontban a kontroll csoporthoz képest a nem/korai aktivált T sejtek arányának „rovására”, amely eltolódott arány egészen 36 hónappal a terápia után is fent maradt a betegekben. A CD8+ T limfociták esetében is hasonló változások következtek be a teleterápiás betegekben, a szeneszencs formák mellett az aktivált alakok aránya is nőtt a kontroll csoporthoz képest már három hónappal a terápia után, és ez az eltolódott arány három évvel később is kimutatható volt a betegekben.



41. ábra: Korban és nemben illesztett kontroll csoportban (n=22) és a teleterápiás kezelésben részesült prosztata daganatos betegcsoportban (n=20) detektált CD3+CD4+ (A) és CD3+CD8+ T limfociták (B) CD28 és CD57 sejt felszíni receptoraik segítségével beazonosított funkcionális alcsoportjainak a megoszlása terápia előtt és után, illetve 3 és 36 hónappal a terápia után. A kördiagramok értékei az egyes alcsoportok átlagának százalékos arányát jelentik. Forrás: saját ábra.

A fent bemutatott CD3+CD4+ és CD3+CD8+ T limfociták funkcionális alcsoportjaiban bekövetkezett jellegzetes változásokat szemléltetik az alábbi áramlási citometriás grafikonok is, amelyeken egy reprezentatív kontroll (42A ábra) és egy beteg minta (42B ábra) értékei láthatók. A CD28+CD57- nem/korai aktivált formák aránya erőteljesen lecsökkent a betegekben terápia előtt, ezzel párhuzamosan a CD28 markert már nem expresszáló, a szeneszscencia irányába elindult korai szeneszscens (CD28-CD57-) és a véglegesen differenciálódott szeneszscens T sejtek (CD28-CD57+) aránya

nagymértékben megnőtt a betegekben a kontrollhoz képest, amely változások három évvel a terápia után is kimutathatóak voltak.



42. ábra: A CD3+CD4+ (A) és CD3+CD8+ T limfociták (B) sejt felszíni CD28 és CD57 receptorai segítségével meghatározott funkcionális alcsoportok változása, egy reprezentatív kontroll mintán, és különböző időpontokból származó (terápia előtti, közvetlen utáni, illetve 3 és 36 hónappal a terápia utáni) beteg mintán bemutatva. Az áramlási citometriás grafikonok a kvadránsokkal elkülönített funkcionális csoportok (CD28+CD57⁻: nem/korai aktivált; CD28+CD57⁺: aktivált; CD28⁻CD57⁻: korai szeneszencs; CD28⁻CD57⁺: véglegesen differenciálódott szeneszencs sejtek) százalékos arányát mutatják. Mind a két T limfocita alcsoport esetében a szeneszencs formák irányába történik eltolódás, a nem aktivált formák „rovására”, amely hosszú távon, 36 hónappal később is kimutatható. Forrás: saját ábra.

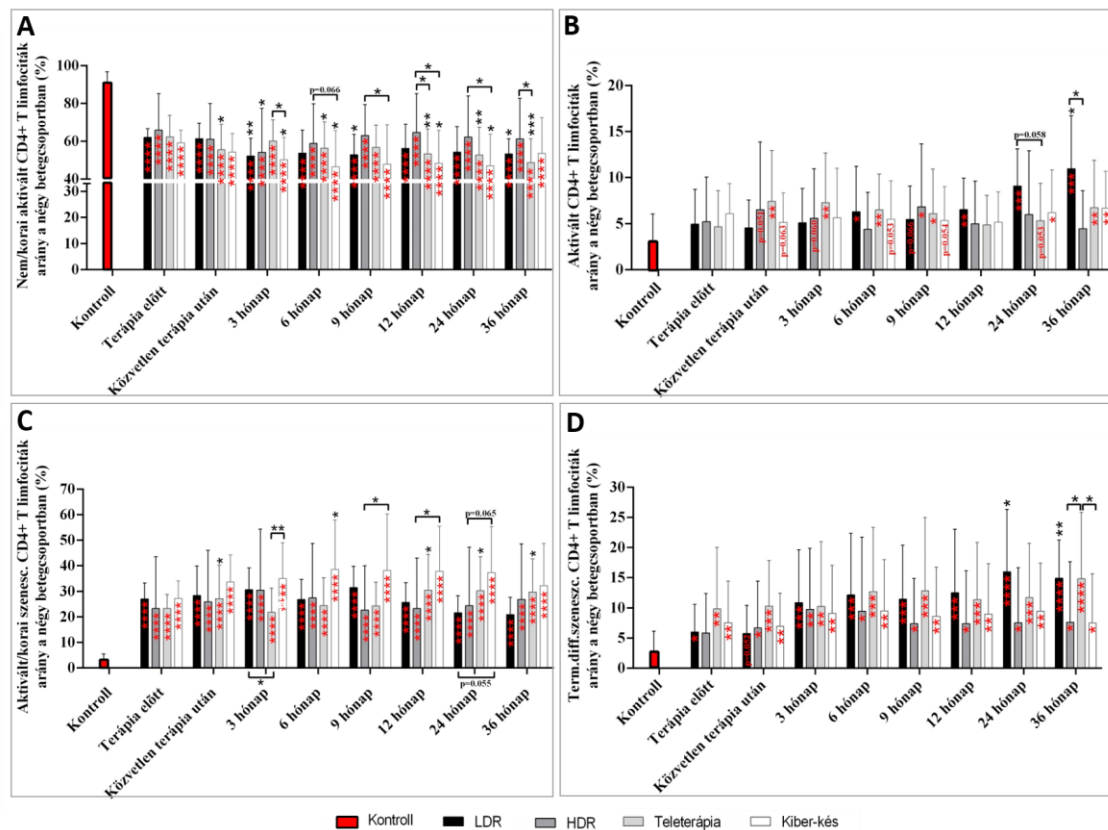
Ezután a CD3+CD4+ és CD3+CD8+ T limfociták alcsoportjainak változását mind a négy betegcsoportban megvizsgáltuk, ezek kontroll csoporthoz viszonyított változásait, illetve a négy betegcsoport egymáshoz viszonyított változásait és a betegek közötti különbségeket a következő grafikonok foglalják össze (43. ábra). A kontrollhoz képest (90,90% ± 5,89%) mind a négy betegcsoportban szignifikánsan lecsökkent a nem/korai aktivált CD4 T sejtek frakciója (LDR: 62,05% ± 4,64%; HDR: 65,92% ± 19,26%;

teleterápia: $62,30\% \pm 11,44\%$; Kiber-kés: $59,16\% \pm 6,84\%$) a kezelés előtt, és ezen az alacsony szinten maradt még három évvel a kezelés után is (43A ábra).

Az aktivált CD4+ T sejtek aránya a kontroll csoporthoz képest ($3,16\% \pm 2,88\%$) a teleterápiás csoportban nőtt meg szignifikánsan közvetlenül a terápia után ($7,41\% \pm 5,52\%$), és ezen a szinten maradt 36 hónappal később is ($6,72\% \pm 5,16\%$), szintje nem normalizálódott. Az LDR csoportban az aktivált formák aránya 6 hónappal a terápia után nőtt meg szignifikánsan ($6,29\% \pm 4,92\%$), és maradt szignifikánsan magas szinten még 36 hónappal a terápia után is ($10,94\% \pm 5,78\%$). A Kiber-kés terápiás csoportban pedig 24 ($6,19\% \pm 4,65\%$), illetve 36 hónappal a terápia után ($6,66\% \pm 4,01\%$) nőtt meg szignifikánsan a szintje (43B ábra).

A CD4+ T limfociták korai szenescens állapotban lévő frakciója a kontroll szinthez képest ($3,08\% \pm 2,40\%$) erőteljes, szignifikáns növekedést mutatott a betegekben már a kezelés megkezdése előtt (LDR: $27,01\% \pm 4,01\%$; HDR: $23,23\% \pm 20,25\%$; teleterápia: $23,22\% \pm 5,53\%$; Kiber-kés: $27,25\% \pm 6,77\%$) és a nyomon követés teljes ideje alatt ezen a magas szinten maradt, még három évvel később is (LDR: $20,89\% \pm 6,76\%$; HDR: $26,77\% \pm 21,78\%$; teleterápia: $29,70\% \pm 13,02\%$; Kiber-kés: $32,22\% \pm 16,49\%$) (43C ábra).

Végül a véglegesen differenciálódott CD4+ T limfociták aránya szintén szignifikánsan megemelkedett a kontrollhoz képest ($2,86\% \pm 3,26\%$) a betegekben már kezelés előtt (LDR: $6,01\% \pm 4,58\%$; HDR: $5,83\% \pm 6,54\%$; teleterápia: $9,84\% \pm 10,18\%$; Kiber-kés: $7,52\% \pm 6,89\%$), és szintje egyik betegcsoportban sem normalizálódott három évvel később sem, sőt az LDR, HDR és teleterápiás csoportokban tovább emelkedett a szintje a kezelés előtti értékekhez képest is (LDR: $14,89\% \pm 6,33\%$; HDR: $7,61\% \pm 10,03\%$; teleterápia: $14,80\% \pm 11,04\%$; Kiber-kés: $7,48\% \pm 8,14\%$) (43D ábra).



43. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=32; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) szignifikánsan lecsökkent a nem/korai aktivált (A), és szignifikánsan megnőtt a korai (C) és differenciálódott szeneszcens CD3+CD4+ T limfociták (D) aránya már a kezelés előtt, a kontroll csoporthoz képest, és ez hosszú távon, három évvel később is detektálható volt. Az aktivált CD4+ T sejt frakciója kezelés előtt egyik csoportban sem változott a kontrollhoz képest, majd terápia után szignifikánsan megemelkedett a teleterápiás csoportban, majd a későbbi időpontokban az LDR és Kiber-kés csoportban is, amely emelkedett szint 3 évvel a terápia után is kimutatható volt (B). A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Forrás: saját ábra.

A nem/korai aktivált CD3+CD8+ T limfociták frakciója a CD4+ csoporthoz hasonlóan erőteljes, szignifikáns csökkenést mutatott a kontrollhoz képest ($44,15\% \pm 15,17\%$) mind a négy betegcsoportban (LDR: $21,75\% \pm 5,86\%$; HDR: $20,83\% \pm 9,75\%$; teleterápia: $19,24\% \pm 10,32\%$; Kiber-kés: $15,83\% \pm 7,88\%$) a kezelés megkezdése előtt, majd ezen az alacsony szinten detektáltuk három évvel később is (LDR: $16,63\% \pm$

8,03%; HDR: 20,82% \pm 13,62%; teleterápia: 18,97% \pm 10,73%; Kiber-kés: 18,49% \pm 10,31%). Az aktivált CD8⁺ T limfociták aránya a kontroll csoporthoz képest (6,85% \pm 3,56%) a kezelés előtti időpontban kontroll szinten mozgott mind a négy betegcsoportban, azonban közvetlenül a terápia után az LDR (11,83% \pm 9,29%) és Kiber-kés terápiás csoportban (13,98% \pm 7,78%) nőtt meg szignifikánsan, amely magas szintet három évvel később is kimutattuk (LDR: 14,43% \pm 11,59%; Kiber-kés: 14,29% \pm 9,66%). A terápia után 3 hónappal a teleterápiás csoportban is szignifikánsan megnőtt (13,50% \pm 10,26%), majd átmeneti csökkenés után, három évvel a kezelést követően újra szignifikánsan magas szinten detektáltuk (13,87% \pm 13,01%). A korai szenescens CD8⁺ T sejtek aránya a kontroll csoporthoz képest (18,88% \pm 5,88%) minden betegcsoportban szignifikánsan megnőtt a kezelés előtt (LDR: 33,62% \pm 9,71%; HDR: 35,12% \pm 14,39%; teleterápia: 28,19% \pm 8,23%; Kiber-kés: 28,92% \pm 9,72%), azonban 36 hónappal később a HDR (40,35% \pm 17,26%) és teleterápiás csoportban (30,59% \pm 17,77%) maradt csak szignifikánsan magas. A véglegesen differenciálódott szenescens CD8⁺ T sejtek aránya nem változott szignifikánsan a kontroll csoporthoz képest (30,11% \pm 13,69%) a betegekben a terápia megkezdése előtt, majd közvetlenül a kezelés után csak a két külső terápiás csoportban nőtt meg szignifikánsan a szintje (teleterápia: 43,76% \pm 12,40%; Kiber-kés: 40,97% \pm 12,98%). Három évvel később csak a Kiber-kés terápiás csoportban maradt csak szignifikánsan a szintje (43,22% \pm 14,01%), a többi csoportban a kontroll, és a kezelés előtti értékhez tért vissza a szintje. Az LDR csoportban azonban nem változott szignifikánsan a betegekben a szenescens CD8⁺ T sejtek aránya a nyomon követés teljes ideje alatt (függelék 16. ábra).

A Tim3⁺ és KLRG1⁺ T sejtek aránya szignifikáns növekedést mutatott minden betegcsoportban már a terápia megkezdése előtt, és ezen a magas szinten maradtak, nem normalizálódott arányuk egyik csoportban sem (függelék 17. ábra).

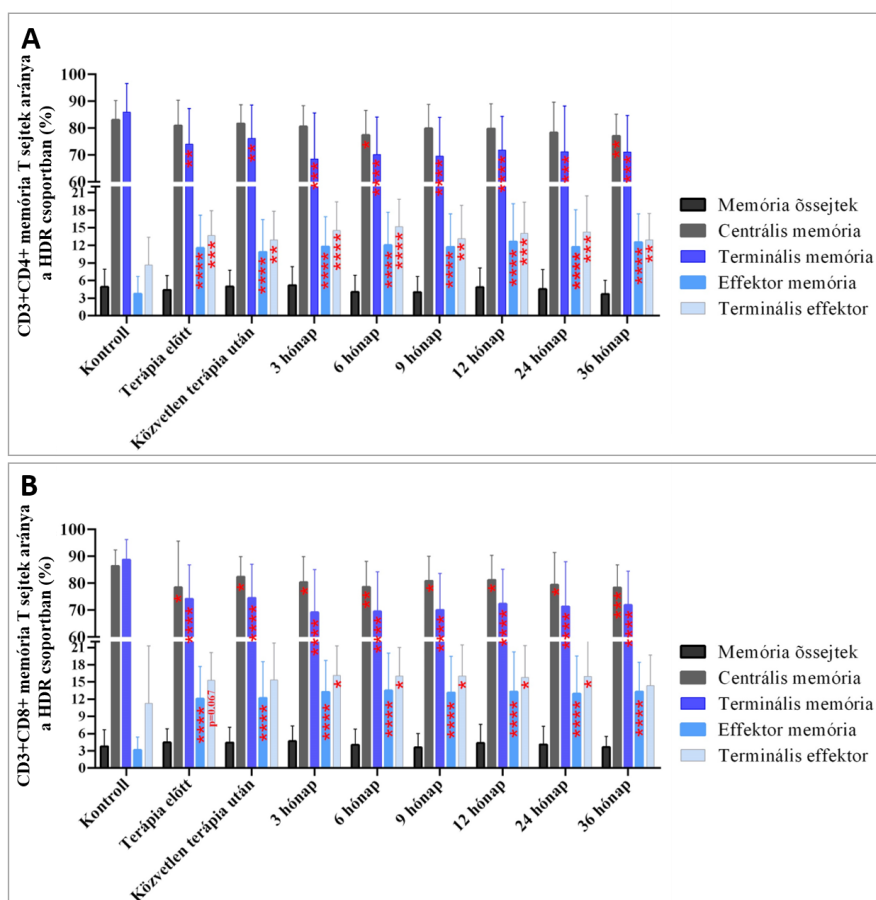
4.2.4.17. A kromoszóma sérülések száma és az immunfenotípus változások közötti összefüggések vizsgálata

Spearman-féle rang-korreláció segítségével vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a perifériás vér limfocitáiban az ionizáló sugárzás hatására kialakult, közvetlenül a sugárterápia után meghatározott kromoszóma-aberrációk száma (függelék 14-17. táblázat) a limfociták szenescens irányban eltolódott immunfenotípusa között. A

korrelációs koefficiens („r”) értékeket a függelék 18. táblázat foglalja össze. Az LDR és a HDR csoportokban a korai időpontokban (terápia után 3 és 6 hónappal) mért véglegesen differenciálódott szeneszcens CD8+ T sejtek aránya pozitívan korrelált a terápia után kialakult kromoszóma-aberrációk számával, majd a későbbi időpontokban is egyre erősebb pozitív összefüggéseket találtunk az adatsorok között. Ezzel ellentétben a két külső terápiás csoportban a korai időpontokban, azaz a Kiber-kés terápiás csoportban közvetlenül terápia után, míg a teleterápiás csoportban 3 hónappal a kezelés után kaptunk erős pozitív korrelációt. Hat, illetve 9 hónappal a terápia után még kaptunk pozitív összefüggést a szeneszcens T sejtek és közvetlen a kezelés utáni kromoszóma-aberrációk száma között, majd 12 hónaptól az összefüggés ereje gyengült.

4.2.4.18. Memória T limfociták változása

Vizsgáltuk a CD3+CD4+ és a CD3+CD8+ T limfociták csoportján belül a memória őssejtek, a centrális, terminális és effektor memória sejteket, valamint a terminális effektor T sejtek frakcióját mind a kontroll, mind pedig a négy betegcsoportban kezelés előtti és utáni időpontokban. Az egyes alcsoportok változásának jellegét jól szemléltetik a HDR betegcsoportban kapott eredmények (44. ábra), amely változások a másik három betegcsoportban is nagyon hasonlóan alakultak (nincs ábrázolva), így a változásokat a HDR csoport eredményei alapján mutatom be. A memória őssejtek aránya nem változott szignifikánsan a nyomon követés ideje alatt a kontroll csoporthoz képest egyik T limfocita alcsoportban sem. A centrális memória T sejtek frakciója a CD4+ csoporton belül csak 6, illetve 36 hónappal később, míg a CD8+ T sejt csoporton belül már terápia előtt szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest, majd 36 hónappal később is ezen az alacsony szinten maradt. A terminális memória sejtek mind a CD4+, mind a CD8+ T sejtek csoportján belül szignifikánsan lecsökkent már terápia előtt a kontrollhoz képest, majd a nyomon követés teljes ideje alatt ezen az alacsony szinten maradt. Ugyanakkor az effektor memória és a terminális effektor sejtek frakciója mind a két T limfocita csoportban szignifikáns növekedést mutatott már terápia előtt a kontroll csoporthoz képest, és hosszú távon, három évvel később is kontroll felett detektáltuk.



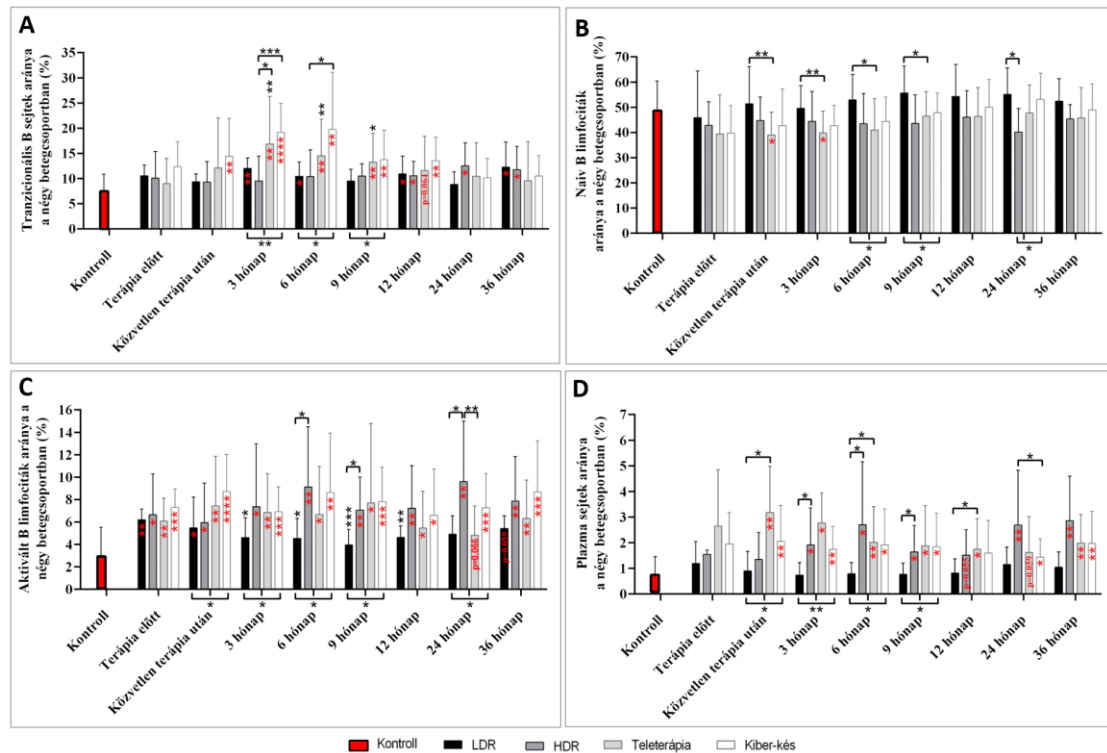
44. ábra: A magas dózisirátájú brachyterápiában (HDR) részesült prosztata daganatos betegcsoportban (n=32) nem változott szignifikánsan a memória őssejtek frakciója, szignifikánsan lecsökkent a centrális és terminális memória T sejtek, ugyanakkor szignifikánsan megnőtt az effektor memória, és terminális effektor T sejtek aránya mind a CD3+CD4+ (A), mind a CD3+CD4+ T limfociták csoportjában. A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Forrás: saját ábra.

4.2.4.19. B limfociták és alcsoportjaik változása

Vizsgáltuk a teljes B limfocita csoport változását a kontroll és beteg csoportokban terápia előtt és után, amelynek aránya a kontroll szint ($3,64\% \pm 2,23\%$) közelében maradt a betegekben a terápia megkezdése előtt (LDR: $4,44\% \pm 2,22\%$; HDR: $3,95\% \pm 2,57\%$; teleterápia: $3,98\% \pm 3,64\%$; Kiber-kés: $3,70\% \pm 1,68\%$). Közvetlenül terápia után csak az LDR csoportban nőtt meg szignifikánsan a B limfociták aránya ($7,20\% \pm 4,12\%$), és maradt magasán a szintje 24 hónappal a terápia után ($7,28\% \pm 4,10\%$), majd

36 hónappal később a szintje a kezelés előtti és a kontroll szinthez tért vissza (függelék 18. ábra).

A B limfociták csoportján belül hat különböző érési és funkcionális alcsoportot vizsgáltunk és hasonlítottuk a változásukat a kontroll csoporthoz és egymáshoz egyaránt. A tranzicionális B sejtek aránya nem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest ($7,51\% \pm 3,34\%$) a betegekben kezelés előtt (LDR: $10,56\% \pm 2,13\%$; HDR: $10,11\% \pm 5,30\%$; teleterápia: $9,00\% \pm 5,00\%$; Kiber-kés: $12,36\% \pm 4,98\%$). Közvetlen a terápia után a Kiber-kés csoportban nőtt meg szignifikánsan a szintje ($14,41\% \pm 7,55\%$) és maradt magasán 12 hónapig, majd normalizálódott. A teleterápiás csoportban 3 hónappal a terápia után emelkedett meg szignifikánsan ($16,87\% \pm 9,42\%$), és 9 hónapig ezen a szinten maradt, majd 12 hónap után normalizálódott. Kiemelendő, hogy a két brachyterápiás csoportban egy évig kontroll közelében volt a tranzicionális B sejtek arányam, majd 12 hónappal a kezelés után szignifikánsan megemelkedett (LDR: $12,29\% \pm 5,00\%$; HDR: $12,56\% \pm 2,87\%$) és 36 hónappal később is ezen a szinten detektáltuk (45A ábra). Az érett, naiv B limfociták szintje enyhe, de nem szignifikáns mértékű csökkenést mutat minden betegcsoportban a nyomon követés teljes ideje alatt. Szignifikáns mértékben csak a teleterápiás csoportban csökkent le közvetlenül, illetve 3 hónappal a kezelés után a kontroll szinthez képest (45B ábra). Aktivált B limfociták frakciója szignifikánsan, kétszeresen megemelkedett a kontrollhoz képest ($3,03\% \pm 2,50\%$) a betegekben kezelés előtt, és az LDR csoporton kívül magasán is maradt 36 hónappal a kezelés után (45C ábra). Az ellenanyagtermelő plazma sejtek frakciója közvetlenül a terápia után nőtt meg szignifikánsan a kontrollhoz képest ($0,77\% \pm 0,69\%$) a két külső terápiás csoportban (teleterápia: $3,18\% \pm 1,81\%$; Kiber-kés: $2,06\% \pm 1,39\%$) és 36 hónappal később is magasán maradt a szintje. A HDR csoportban 3 hónappal a terápia után nőtt meg szignifikánsan ($1,91\% \pm 1,45\%$) az aránya, és három évvel a terápia után ebben a csoportban maradt a legmagasabb a szintje ($2,86\% \pm 1,74\%$) (45D ábra). A korai és késő típusú memória B sejtek aránya nem mutatott szignifikáns változást a betegekben a kontrollhoz képest (nincs ábrázolva).



45. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiais: n=15) vizsgáltuk a B limfociták funkcionális alcsoportjait. A tranzicionális B sejtek aránya a két külső terápiais csoportban a korai időpontokban, míg a brachyterápiás betegekben 12 hónappal a terápia után nőtt meg szignifikánsan (A), míg a naiv B limfociták aránya nem változott szignifikánsan (B). Az aktivált B sejtek frakciója már terápia előtt megnőtt a betegekben és magasán maradt három évvel később is (C), a plazma sejtek aránya pedig az LDR csoporton kívül minden betegben szignifikánsan megnőtt a kontrollhoz képest (D). A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Forrás: saját ábra.

5. Megbeszélés

A tanulmányban célunk volt vizsgálni a daganatokkal összefüggő, ionizáló sugárzás indukálta szisztémás akut és késői, veleszületett és adaptív immunfolyamatokat különböző sugárterápiás protokollal kezelt fej-nyaki és prosztatata daganatos betegekben. Mindkét vizsgált daganattípus kezelésében és gyógyításában ma már rutinszerűen alkalmaznak mind közel, mind távol besugárzást, így lehetőségünk nyílt a hasonló hatékonyságú, de esetlegesen eltérő hatású besugárzási protokollokat összehasonlítani a túlélő betegekben. A fej-nyaki daganatos betegeket csak egy hónapig, azonban a prosztatata adenokarcinómás betegeket öt évig követtük nyomon a terápia után (jelen disszertáció az első három év eredményeit mutatja be), így nem csak a terápia után rövid időn belül fellépő változásokat, hanem a késői, esetlegesen évekkel a terápia után is fent álló eltéréseket is tudtuk monitorozni. A részletes szisztémás immunológiai változások éveken át tartó nyomon követése teszi még értékesebbé ezt a beteganyagot és egyben ezt a vizsgálatot.

A fej-nyaki daganatos betegek esetében génexpressziós, fehérje és sejtszintű vizsgálatokkal tanulmányoztuk az intenzitás modulált sugárterápia szisztémás hatásait. A perifériás vérsejtekben vizsgált DDB2, GADD45, SESN1, FDXR, MDM2 génekről korábbi tanulmányok is igazolták, hogy erős sugárzásválasz gének, így a sugárexpozícióra adott egyéni válaszok monitorozására alkalmas markerek lehetnek (Amundson, Grace et al. 2004, Kis, Szatmari et al. 2006, Kabacik, Mackay et al. 2011, O'Brien, Cruz-Garcia et al. 2018). Expressziós szintjükben bekövetkező változások közvetlenül, vagy rövid idővel a sugárzás után már detektálhatók. A fej-nyaki daganatos betegek perifériás vérsejtjeiben kimutatott génexpressziós eredményeink alátámasztják az irodalmi adatokat; közvetlenül a besugárzás után mindegyik említett gén expressziós szintje szignifikánsan megemelkedett a kontrollhoz képest, és közülük a GADD45, SESN1 és az MDM2 gének expressziója egy hónappal a terápia után is kimutatható volt, amely egy tartósan fennmaradt transzkripciós szabályozási zavarra utal. Azonban a gének megváltozott expressziós szintje és az egyéni sugárérzékenység közötti korreláció megállapításához további vizsgálatok, és hosszabb nyomon követési időszakra lenne szükség.

Vizsgáltuk a fej-nyaki daganatos betegek plazmájában különböző prognosztikai, és/vagy prediktív értékű fehérjék mennyiségi változását is. Egy korábbi tanulmányban a

kutatócsoport 19 különböző fehérje változását vizsgálta fej-nyaki daganatos betegekben sugárkezelés előtt, és közülük nyolc fehérje (IL-2, IL-4, EGFR, OPN, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGF és a GRO) mennyisége szignifikáns változást mutatott a betegekben a kontroll csoporthoz képest, azonban egyik fehérje változása sem korrelált a terápiás kimenetellel (Brondum, Eriksen et al. 2017). Egy másik átfogó fehérje vizsgálati tanulmányban a szerzők fej-nyaki daganatos betegekben 55 különböző fehérje szignifikáns változását mutatták ki sugárterápiát követően, amely változásokat a kezelés előtti értékhez viszonyították. Ezek közül 20 fehérjének a szintje egy hónappal a kezelést követően sem normalizálódott, amelyek többsége gyulladáshoz kapcsolódó funkcionális fehérjék voltak (Widlak, Jelonek et al. 2015). Nagy átteremtő képességű plazma fehérje profil vizsgálatunk során 105, főként gyulladáshoz és különböző immunfolyamatokkal összefüggésbe hozható fehérje vizsgálatára fókuszáltunk a fej-nyaki daganatos betegek. Közülük nyolc fehérje mennyisége változott szignifikánsan a terápia után: az Acrp3, BAFF, ENA-78, C5a koncentrációja megnőtt, míg az ApoA1, CD105 és TFF3 mennyisége lecsökkent a kezelés előtti értékhez képest, amely eredmények átfedést mutatnak a fent bemutatott átfogó vizsgálat eredményeivel. Mi sem tudtunk összefüggést kimutatni a fehérjék változása és az AMR súlyossága között, azonban fontos kihangsúlyozni, hogy a vizsgált betegcsoport nagysága miatt messzemenő következtetéseket nem vonhatunk le a kapott összefüggésből. A vizsgálatunkban az endoglin (CD105) fehérje egyike a sugárhatásra megváltozott fehérjéknek, amely fehérje fontos szerepet tölt be az angiogenezis folyamatában, illetve intratumorális jelenléte fokozott angiogenezisre és neovaszkularizációra utal (Marioni, Ottaviano et al. 2017, Metcalfe, Arik et al. 2018). Mind a tumor mikrokörnyezetben, mind a keringésben jelenlevő endoglin mennyisége prognosztikai értékű, és korrelál a terápiára adott válasszal (Demirci, Yaman et al. 2012, Marioni, Staffieri et al. 2013). Egy másik tanulmányban kimutatták, hogy a keringő endoglin fehérje hozzájárul a sugárzás indukálta késői fibrózis kialakulásának csökkentéséhez úgy, hogy a TGF- β 1 fehérjével komplexet alkotva megakadályozza annak fibrózis indukáló hatását (Li, Wilson et al. 1999). Vagyis az endoglin fehérje a sugárzás indukálta toxicitás késői markere lehet a fej-nyaki daganatos betegekben. Az ApoA1 fehérje szintje szignifikánsan lecsökkent a mi vizsgálati csoportunkban már a kezelés előtt, és ezen az

alacsony szinten maradt a betegekben 1 hónappal a sugárterápia után is. Ez a változás összefügg korábbi tanulmányok eredményeivel, amelyekben a szerzők erős korrelációt mutattak ki a lecsökkent mennyiségű keringő ApoA1 fehérje mennyisége és a távoli metasztázis kialakulásának valószínűsége között (Luo, Zhong et al. 2015, Chang, Wei et al. 2018).

A korábban bemutatott, szűkebb fenotipizálási panel rendszer segítségével vizsgáltuk a CD4⁺ limfocitákat, a FoxP3⁺ Treg sejteket, továbbá T sejt aktivációs markereket, a T sejtek proliferációs státuszát, természetes ölősejteket, dendritikus sejteket és a mieloid eredetű szuppresszor sejtek csoportját a terápia előtti és utáni időpontokban egyaránt. Az irodalomban fellelhető legtöbb tanulmány alátámasztja a tényt, hogy a tumort infiltráló, főként CTLA4 és PD1 markert expresszáló Treg sejtek, és a PD1 fehérjét expresszáló CD4⁺ és CD8⁺ T limfociták emelkedett szintje negatív prognosztikai markerként szolgál a fej-nyaki daganatos betegekben (Matoba, Imai et al. 2019, Pfannenstiel, Diaz-Montero et al. 2019), míg a memória T sejtek emelkedett szintje pozitív prognosztikai értékű (Mann, Smith et al. 2019). A keringő Treg sejtek mennyisége a negatív klinikopatológiai jellemzőkkel és rossz prognózissal korrelál (Strauss, Bergmann et al. 2007, Aggarwal, Sharma et al. 2017). Egy másik tanulmányban kimutatták, hogy a keringő Treg sejtek mennyisége a daganat kiújulás valószínűségével is korrelál kemoterápiában részesült fej-nyaki daganatos betegekben (Schuler, Harasymczuk et al. 2013). Az általunk vizsgált daganatos betegcsoportban mért CD4⁺ limfociták szintje kezelés előtt megegyezett a kontroll csoportban mért szinttel, míg a FoxP3⁺ Treg sejtek aránya közel kétszeresére nőtt a betegekben a kontroll szinthez képest. Továbbá a CTLA4 markert expresszáló Treg sejtek, és a PD1 fehérjét kifejező effektor T sejtek aránya szignifikánsan megemelkedett a betegekben már kezelés előtt a kontrollhoz képest. Ezek az eredmények egy szisztémás immunszuppresszió kialakulására utalnak már a sugárterápia megkezdése előtt, amely eredményeket más tanulmányok is alátámasztanak (Young, Wright et al. 1996, Tsai, Chen et al. 2019). Sugárterápia hatására a legerőteljesebb változást a CD4⁺ T sejtek és a Treg sejtek mutatták, előbbi szignifikáns csökkenést, utóbbi szignifikáns növekedést mutatott, így eltolódás következett be a CD4/Treg arányban a Treg sejtek irányába, amely arány eltolódást más csoportok is tapasztaltak (Balogh, Persa et al. 2013). A terápia után még nagyobb mértékű növekedést mutatott a CTLA4⁺ effektor és Treg

sejtek, illetve a PD1+ effektor T sejtek aránya, amely a sugárzás okozta még erőteljesebb immunszuppresszió kialakulásával magyarázható. Korábbi tanulmányok eredményei alátámasztják, hogy a lokális besugárzás hatására megnő a CTLA4 markert expresszáló cirkuláló CD4+ T limfociták aránya egészséges egerekben (Balogh, Persa et al. 2013, Muroyama, Nirschl et al. 2017), illetve a kemoterápiával kombinált sugárterápia szintén megnövelte a PD1+ T sejtek arányát (Parikh, Duluc et al. 2014). A mi betegcsoportunkban megfigyelhető egy tendencia, miszerint azokban a daganatos betegekben, akikben magas proliferációs kapacitással rendelkező CD4+ T limfocitákat mértünk ki egy hónappal a terápia után, azoknál a CTLA4 és a PD1 szint is magasabb volt, illetve ezen betegek 87%-ának tumor stádiuma súlyosabb, T2-T4 besorolású volt terápia előtt. Ebből arra következtethetünk, hogy előrehaladottabb stádiumban lévő tumorral rendelkező daganatos betegben erősebb, és hosszán tartóbb szisztémás immunszuppresszió lép fel sugárkezelés hatására. Az MDSC-k éretlen mieloid sejtek, amelyek a csontvelőből lépnek ki a vérkeringésbe és immunszuppresszív hatásúak. Többféle daganattípus esetén írtak már le megemelkedett MDSC szintet, amely rossz terápiás válasz prognosztikai markere (Gabitass, Annels et al. 2011, Ohki, Shibata et al. 2012). Az irodalommal ellentétben a betegekben csökkenő cirkuláló MDSC arányt kaptunk terápia után a kontrollhoz képest, azonban a CD14+ MDSC alcsoport szignifikáns növekedést mutatott, amelyhez hasonló eredményt más kutató csoportok is találtak (Yuan, Zhao et al. 2011). A természetes ölüsejtek esetében nem kaptunk szignifikáns változást a betegekben sem terápia előtt, sem utána. Ugyanakkor mind a mieloid, mind a limfoid DC-k aránya szignifikánsan megnőtt a betegekben a kontroll csoporthoz képest, amelyhez nagyon hasonló eredményeket kapott egy másik kutatócsoport sugár- és kemoterápiában részesült mell és prosztata daganatos betegekben (Schmidt, Fortsch et al. 2012). Ezzel ellentétben más tanulmányban csökkent DC szintet mértek ki fej-nyaki daganatos betegekben (Sakakura, Chikamatsu et al. 2006), tehát az irodalomban található ellentmondásos véleményekből következik, hogy szintjük nem feltétlenül tükrözi funkcionális integritásukat. Az eredmények alapján elmondható, hogy a fej-nyaki daganatos betegekben a sugárterápia megkezdése előtt a daganatstátusz okozta immunszuppresszív állapot alakult ki, amelyért alapvetően a CTLA4-t marker expresszáló regulátor és effektor CD4+ T sejtek, illetve a PD1+ T limfociták megemelkedett szintje felelős. Ezt az állapotot a sugárterápia tovább

erősítette, azonban a rövid nyomon követés miatt az intenzitás modulált sugárterápia hosszú távú immunmoduláló hatását nem tudtuk megvizsgálni, nincs információ arról, hogy ez a szuppresszív állapot meddig maradt fent a betegekben, mely paraméterek normalizálódtak, és melyek maradtak megváltozott szinten hosszú távon.

A prosztata daganatos betegek szisztémás immunfolyamatainak vizsgálatához egy, a korábbinál bővebb fenotipizálási panel rendszert alkalmaztunk, amellyel a veleszületett és adaptív immunrendszer további alcsoportjainak változását tudtuk nyomon követni. Miután a prosztata daganatos betegeknél nyílt lehetőségünk a távolbesugárzás mellett brachyterápiás kezelésben részesült betegek immunstátuszát is vizsgálni, és hosszú távon nyomon követni, így esetükben egy, a fej-nyaki daganatos betegeknél végzett kiértékelésnél még részletesebb összehasonlítást végeztünk, egészen az alap immunsejt-populációktól kezdve a különböző érési és funkcionális alcsoportokig.

A teljes limfocita csoport arányát a terápia előtti időpontban a prosztata daganatos betegekben kontroll szint közelében detektáltuk, azonban közvetlenül a terápia után az arány az LDR csoporton kívül mindegyik betegcsoportban szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest, amely jól mutatja a limfociták magas sugárérzékenységét, és az LDR terápia alacsony dózisirátájú sugárterhelését. Közvetlenül a terápia utáni időpontban a HDR kezelés esetében egyszeri 19 Gy (vagy 21 Gy), a teleterápia során összesen 70-78 Gy, a Kiber-kés terápia esetében pedig 40 Gy került leadásra a prosztata szövetébe, míg az LDR terápia esetében közvetlenül az izotópok beültetése után mindössze 1,6-3,3 Gy nagyságú sugárexpozíció érte a prosztata szövetét. A teljes limfocita csoportban bekövetkezett szignifikáns csökkenés a két külső csoportban maradt fent 24, illetve 36 hónappal a terápia után is, a HDR-es csoportban szintje 9 hónappal a terápia után végleg normalizálódott. Azt fontos megemlíteni, hogy ugyan a teljes limfocita csoport aránya nem mutatott szignifikáns változást az LDR-es csoportban sem kezelés előtt, sem azutáni, későbbi időpontokban, ugyanakkor a későbbiekben diszkutált különböző limfocita alcsoportokban találtunk szignifikánsan változó frakciókat az LDR kezelésben részesült betegek esetében is. A limfociták csoportján belül vizsgáltuk az alap CD3+, CD4+ helper és CD8+ citotoxikus limfociták alcsoportját is, amelyek nélkülözhetetlenek az immunhomeosztázis fenntartásában, amelyet a veleszületett immunrendszer elemeivel szorosan együttműködve

szabályoznak. Továbbá az immunfolyamatok modulálásában és a daganatprogresszió folyamatában is fontos szerepük van. Arányukban bekövetkezett változások összefüggést mutathatnak a daganat státusz kialakulásával is (Gerloni and Zanetti 2005). A CD3+ és CD4+ limfociták száma az általunk vizsgált betegekben terápia előtt kontroll szinten volt, azonban terápia után csökkenő tendenciát mutattak minden csoportban, míg a CD8+ limfociták aránya kontroll közeli volt terápia előtt és után a betegekben (csak a HDR és teleterápiás csoportban nőtt meg szignifikánsan 3 hónappal a kezelés után), amely eredményeket egy 2021 évben megjelent meta-analízis eredményei is alátámasztanak (Wang, Li et al. 2021). A tanulmányban a három alap limfocita csoport változását vizsgálták sugárterápia előtt és után különböző típusú daganatos megbetegedések esetében és csökkent CD3+ és CD4+, és változatlan CD8+ limfocita szintről számoltak be egy hónappal a sugárexpozíció után. A sugárterápia hatására egyértelmű immunológiai változások következtek be a betegekben, amelyek az immun sejtek apoptózisát és a T limfociták csökkenését okozhatják, valamint befolyásolják a perifériás vér immunsejtjeinek egyensúlyát. A tanulmány fontos következtetése, hogy a sugárterápia által kiváltott immunválasz mértéke daganattípusonként eltérő volt. Vizsgálatunkban egyedül a teleterápia okozott hosszan fennálló egyensúlyi eltolódást a betegekben, sem a CD4+, sem a CD8+ T limfociták aránya nem normalizálódott még három évvel a terápia után sem. Ezt támasztja alá a perifériás CD4+ és CD8+ T limfociták átlagos számából eredeztetett arányszám (CD4+/CD8+) is, amely fontos biomarkerként utal az egyén gyulladásos, vagy épp szeneszcens immunstátuszára. Terápia előtt az LDR és Kiber-kés csoportban a helper/citotoxikus arány pontosan megegyezett a kontroll csoportban megállapított arányszámmal, a másik két csoportban pedig ugyan kevéssel a kontroll alatt, de 1 felett volt ez az érték. Három hónappal a terápia után a HDR és teleterápiás csoportban 1 alá csökkent az arányszám, azonban míg a HDR-es betegekben egy gyors normalizáció következtében már fél évvel a terápia után 1 fölé emelkedett, 9 hónappal a terápia után pedig a kezelés előtti értékre állt vissza az arányuk, addig a teleterápiás csoportban három év alatt sem normalizálódott a T sejtek aránya. Utóbbi egy perzisztens, citotoxikus CD8+ irányú egyensúly eltolódásra és szeneszcens immunstátusz kialakulására utal a teleterápiás betegekben (Serrano-Villar and Deeks 2015, Sato, Adachi et al. 2019).

A T limfociták normális működéséhez és sikeres antigén prezentáláshoz nélkülözhetetlen kostimulációs markert nem expresszáló, aberráns CD3-CD4⁺ limfociták aránya a kontroll csoportban elenyésző mértékű volt, azonban ehhez képest a daganatos betegekben szignifikánsan megnőtt már terápia előtt, és egyik csoportban sem normalizálódott évekkal később sem. Érdekes, hogy a CD3-CD8⁺ sejtek frakcióját jóval magasabb szinten detektáltuk a kontroll csoportban, azonban a CD3⁺/CD3⁻ aránya a CD8⁺ limfocitákon belül végig kontroll közelében maradt a betegekben. Ehhez szorosan kapcsolódó eredményünk, hogy a CD3 marker fluoreszcencia intenzitása (MFI) is szignifikánsan lecsökkent minden betegcsoportban a CD4⁺ limfociták felszínén. Azonban fontos kiemelni, hogy annak ellenére, hogy a CD3-CD8⁺ sejtek százalékos arányában nem kaptunk szignifikáns változást, a CD3 MFI értéke ugyan kisebb mértékben (mint a CD4⁺ limfocitákon), de a CD8⁺ limfocitákon is egyértelmű csökkenést mutatott már kezelés előtt, és egyik T limfocita alcsoporton sem normalizálódott évekkal később sem. Vagyis a különböző gyulladásos, illetve daganatos elváltozások indukálta, aberráns CD3⁻ limfocita irányú arányeltolódás a CD4 helper T sejteket nagyobb mértékben érintette, azonban a CD3 receptor vesztés (Akl, Badran et al. 2007, Alikhan, Song et al. 2016, Lee, Lim et al. 2021), és ezáltal jelentkezett diszfunkció, mind a két T limfocita csoportot érintette. Ezekben a változásokban nem találtunk különbséget az egyes terápiás eljárásokban részesült betegek között, minden csoportban szignifikánsan megnőtt az aberráns helper T sejtek aránya, és lecsökkent a CD3 MFI értéke.

Érdekes megemlíteni az immunszuppresszív CD4-CD8⁻ dupla negatív T sejtek, amelyek a Treg sejtekkel mutatnak hasonló funkciókat, elősegíthetik a tumor metasztatikus folyamatokat (Greenplate, McClanahan et al. 2019), továbbá hozzájárulhatnak a Graft-versus-host betegség és az autoimmunitás kialakulásához (Abraham, Sachs et al. 1992). Ugyanakkor a CD3⁺CD4⁻CD8⁻ dupla negatív T sejteket humán hasnyálmirigy daganatos sejtekkel co-kultúrában tartva azok aktivációjának és inváziójának gátlásáról számoltak be kutatók egy tanulmányban (Lu, Hu et al. 2019). Az irodalomban fellelhető ellentmondásos tanulmányok értelmében a dupla negatív T sejtek képesek tumor-gátló, illetve tumor-aktiváló hatást is kifejteni függően a tumor típusától és annak mikro környezetétől (Wu, Zheng et al. 2022). A dupla negatív T sejtek szintje a HDR csoportban szignifikánsan már korai időpontban, és a teleterápiás

csoportban 6 hónappal a terápia után nőtt meg, és három évvel később sem normalizálódott, míg az LDR és Kiber-kés csoportban szintjük végig kontroll közelében mozgott.

Ahogy korábban is kihangsúlyoztam a fej-nyaki daganatos betegek esetében, úgy ennél a csoportnál is kitérek a fontos prognosztikai értékű, az effektor immunfolyamatok szabályozásában fontos szereppel bíró, immunszuppresszív tulajdonságokkal is rendelkező Treg sejtek csoportjára. A CD4+FoxP3+ Treg mellett a CD8+FoxP3+ Treg csoportot is vizsgáltuk, ugyanis újabb tanulmányok egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek a még jóval kevésbé ismert CD8+ Treg sejtek vizsgálatára is (Menoret, Tesson et al. 2023). Egy tanulmányban prosztata daganatos mikro környezetbe infiltrált CD8+FoxP3+ Treg-eket vizsgáltak, amely tanulmányban bebizonyosodott, hogy a CD4+ Treg-ekhez hasonlóan ennek a Treg csoportnak is szerepe van az immunszuppresszió közvetítésében, méghozzá a Toll-szerű receptor 8 molekulán keresztül szabályozható ezen funkciójuk (Kiniwa, Miyahara et al. 2007). A mi betegcsoportjainkban kapott eredmény rendkívül érdekes: a CD4+FoxP+ Treg sejtek aránya szignifikánsan megnőtt, míg a CD8+FoxP+ Treg-ek frakciója kontroll szinten volt a terápia előtt a betegekben. A CD4+ Treg-ek éveken át ezen a magas szinten maradtak, nem normalizálódtak, ezzel szemben a CD8+ Treg-ek aránya a két külső terápiás csoportban nőtt csak meg szignifikánsan közvetlenül a kezelést követően, majd a teleterápiás csoportban normalizálódott, míg a Kiber-kés terápiás csoportban magasan maradt a szintje hosszútávon. Tehát elmondható, hogy míg a CD4+ Treg-ek emelkedettebb szintje a daganat státusszal összefüggő változás, és szintjében a különböző terápiás eljárások közvetlenül a terápia után további (nem szignifikáns) növekedést okoztak, addig a CD8+ Treg-ek frakcióját a két legnagyobb, akut sugárterheléssel járó távolbesugárzás emelte meg szignifikánsan a normál, kontroll közeli szintről, azonban hamar, 3 hónappal a kezelés után újra normalizálódott a betegekben. Mind a CD4+, mind a CD8+ Treg csoporton belül el tudtunk különíteni egy FoxP3 markert magasabban, és egy alacsonyabban expresszáló alcsoportot. A FoxP3^{magas} fenotípusú Treg-ek csoportja a CD4+ limfocitákon belül kézseres növekedést mutatott a betegekben a kontrollhoz képest, míg a CD8+ csoporton belül kisebb mértékű növekedést tapasztaltunk. Fontos kiemelni, hogy annak ellenére, hogy a CD8+FoxP3+ Treg sejtek százalékos aránya kismértékű növekedést mutatott a

betegekben a kontrollhoz képest, a FoxP3⁺/FoxP3⁻ arány ebben a T sejt csoportban is (a CD4⁺FoxP3⁺ Treg-ekhez hasonlóan) szignifikánsan eltolódott a FoxP3⁺ Treg sejtek javára már a kezelés előtt, és arányuk nem normalizálódott hosszú távon sem.

Egy tanulmányban négy féle marker kombinációjú Treg csoportot hasonlítottak össze (CD4⁺CD25^{magas}, CD4⁺CD39⁺, CD4⁺CD73⁺ és a CD4⁺CD25⁺ CD127^{alacsony/-}) azzal a céllal, hogy megtalálják a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg csoporttal leginkább megegyező, de csak sejtfelszíni markerekkel beazonosított Treg csoportot. A tanulmány alapján elmondható, hogy az általunk is vizsgált CD4⁺CD25⁺CD127^{alacsony/-} fenotípusú Treg sejtek esetében találták a legmagasabb FoxP3 expressziót, és a legerősebb korrelációt a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg csoporttal (Yu, Li et al. 2012). Így mi is tanulmányoztunk a sejten belüli jelölést nem igénylő, CD127^{alacsony/-}CD25^{magas} fenotípussal rendelkező Treg-ek csoportját is, amelynek aránya a CD4⁺FoxP3⁺ csoporthoz nagyon hasonló volt a kontroll csoportban, azonban egymástól eltérő módon változott a betegekben a nyomon követés ideje alatt. CD127^{alacsony/-}CD25^{magas} Treg-ek szintje csak közvetlen kezelés után nőtt meg (az LDR csoportot kivéve), és ez a sokkal kisebb mértékű változás hamarabb is normalizálódott a betegek nagy részében, amely a különböző fenotípusú Treg csoportok közötti eltérő funkcionalitásra utalhat.

A T limfociták proliferációs képessége fontos mutatója azok funkcionális integritásának, megfelelő működőképességüknek, és aktivációs képességükre is utal. Érdekes módon a Ki67 sejtmagi markerrel vizsgált osztódó frakciók a CD4⁺ limfociták és CD4⁺FoxP3⁺ Treg sejtek csoportjában sokkal nagyobb mértékű, és hosszan tartó szignifikáns növekedést mutattak a betegekben, mint a CD8⁺ effektor és Treg sejtek csoportjában, ahol nem változott az osztódó sejtek aránya sem kezelés előtt, sem azután. Összességében elmondható, hogy nem csak a teljes CD8⁺ limfocita csoport, hanem az aberráns CD3-CD8⁺, a CD8⁺FoxP3⁺ regulátor és a Ki67⁺ osztódó citotoxikus T sejtek frakciója jóval kisebb mértékű eltérést mutatott a betegekben a CD4⁺ alcsoportokhoz képest, azonban a FoxP3⁺ irányú arány eltolódás nagymértékű volt esetükben is. A megnövekedett CD4⁺ osztódási ráta hátterében vagy az úgynevezett homeosztatiszikus proliferáció jelensége áll (Min 2018), amely megmagyarázza a lecsökkent CD4⁺ limfocita arányt és a megnövekedett osztódó CD4⁺ T sejt frakciót a betegekben, vagy a daganat státusszal összefüggő perzisztens CD4⁺ T sejt aktiváció és proliferáció áll fent. Ezt a dilemmát a CD4⁺ és CD8⁺ T sejtek további vizsgálati eredményei oldhatják fel,

miszerint a CD28+CD57+ fenotípussal jellemezhető aktivált frakciót is vizsgáltuk a T limfocita alcsoportokban, amelyek növekvő tendenciát mutattak a betegekben a terápia utáni időpontokban, míg ezzel párhuzamosan a CD28+CD57- nem aktivált formák szintje szignifikánsan lecsökkent minden betegcsoportban. Ugyan más sejtfelszíni markerekkel, de másik kutató csoport is vizsgálta a perifériás vérben az aktivált T sejtek arányát prosztata daganatos betegekben LDR terápiát követően több időpontban, és a csoport is hosszantartó, emelkedett aktivációs szintet mért még 15 hónappal a terápia után is mind a CD4+, mind a CD8+ T sejtek csoportjában (Kubo, Satoh et al. 2018). A folyamatos antigén stimulus és több aktivációs ciklust követően a T sejtek felszíni CD28 molekulájának kifejeződése folyamatosan csökken, míg a CD57 marker expressziója nő, amely folyamatok a szeneszscens T sejtek kialakulásához vezetnek. A CD28 a T sejtek egyik legfontosabb kostimulációs markere, amellyel az APC-k CD80, vagy CD86 receptoraikhoz kapcsolódnak. A CD28 receptor hiányában az immunológiai szinapszis, és ezáltal a sikeres antigén prezentáció is elmarad, így a T sejtek az effektor funkciójukat nem képesek ellátni (Arosa 2002, Esensten, Helou et al. 2016, Pangrazzi, Reidla et al. 2020). Korai szeneszscens CD4+ és CD8+ frakciók, illetve a véglegesen differenciálódott szeneszscens CD4+ T sejtek minden betegcsoportban szignifikáns növekedést mutattak már a terápia előtt, és évekkel később sem normalizálódtak, míg a differenciálódott szeneszscens CD8+ sejtek aránya csak a két külső terápiás csoportban nőtt meg szignifikánsan a betegekben, míg a két brachyterápiás csoportban nem változott. Ezen eredmények szintén a megnövekedett proliferációs ráta okára világíthatnak rá, amelyet megnövekedett mértékű aktiváció előzhetett meg, végül pedig a T limfociták szeneszscens irányú eltolódásához vezetett. A kontroll csoportban tapasztalt nagymértékű CD28+/CD28- arány eltolódást a CD4+ és a CD8+ T sejtekben belül magyarázhatja az a tény is, miszerint a normál öregedés folyamata és a kor közvetlenül korrelál a CD8+CD28- T sejtek arányával (Fagnoni, Vescovini et al. 1996, Mou, Espinosa et al. 2014). Ehhez kapcsolódó eredményünk, hogy közvetlenül a terápia után a perifériás limfocitákban keletkezett és meghatározott teljes kromoszóma aberrációk száma szoros pozitív összefüggést mutat a véglegesen differenciálódott szeneszscens T sejtek terápia utáni különböző, korai és késői időpontokban meghatározott arányával, amely utalhat a szeneszscens állapotban lévő immunsejtek perzisztens kromoszóma sérüléséből eredő funkcióvesztésre is.

Végül a vizsgált memória T sejt alcsoportokban tapasztalt rendkívül érdekes változásokra térnek ki, amely az eddig leírt eredményeket újabb irányból közelíti meg, és támaszthatja alá. Szignifikáns arány eltolódást kaptunk a betegekben a memória őssejtek és a centrális memória T sejtek, valamint az effektor memória és terminális effektor T sejtek aránya között az utóbbi két csoport javára, amelyek CCR7 receptort nem expresszálva képesek elhagyni a másodlagos nyirokszerveket, és a periférián nagy hatékonysággal fejtik ki effektor funkcióikat. A változás hátterében feltételezhetően a folyamatos T sejt stimuláció és aktiváció áll, amely végső soron a T sejtek „immunológiai kimerüléséhez” és működésképtelenséghez vezethet. Egy tanulmányban, amelyben ugyan ezeket a memória T sejt alcsoportokat vizsgálták akut mieloid leukémiás betegekben, pontosan ezt az arány eltolódást tapasztalták, amely kemoterápia utáni teljes remissziót követően is megmaradt a betegekben (Xu, Yao et al. 2018). Az immunológiai kimerülés során a T sejtek effektor funkciói fokozatosan, hierarchikus sorrendben vesznek el, amelynek jellemző mozzanata a sejt felszíni gátló receptorok expressziójának megnövekedése. Ilyen receptor például az általunk is vizsgált PD1, LAG3, 2B4 (CD244) és a CD160. Az immunológiai kimerülés súlyossága korrelál ezen gátló receptorok expressziójának mértékével, az antigén mennyiségével és a CD4+ T sejtek segítő funkcióinak megszűnésével (Wherry, Blattman et al. 2003, Wherry 2011). Ezek összességében csökkent tumorelles választ és szuppresszív mikrokoznyezetet eredményeznek (Wherry and Kurachi 2015). A betegekben a vizsgált receptorok terápia utáni időpontban mutattak szignifikáns növekedést, azonban ezekre az eredményekre a diszkusszió végén újra kitérek.

A B limfociták arányát a tumor státusz nem befolyásolta a vizsgált betegekben, majd közvetlenül terápia után szignifikánsan az LDR (és közel szignifikánsan) a HDR csoportban nőtt meg arányuk, másik két csoportban szintje végig kontroll és kezelés előtti szint közelében mozgott. Funkcionális alcsoportjaikban azonban annál inkább tapasztaltunk változásokat; az aktivált B limfociták szintje már terápia előtt szignifikánsan megnőtt minden betegekben, és éveken át ezen a szinten maradt, legkisebb mértékű változást az LDR csoportban tapasztaltunk, szintje hamar, 3 hónappal a terápia után normalizálódott. Ezzel szépen összecseng az aktivációt követően kialakuló, ellenanyag termelő, és ezáltal tumor ellenes hatású, és pozitív prognosztikai értékű plazma sejtek változása (Weiner, Vidotto et al. 2021), amely

terápia után közvetlen, illetve a nyomon követés 3-dik hónapjától az LDR csoporton kívül minden betegen szignifikánsan megnőtt, és három évvel később is magasán maradt.

A veleszületett immunrendszer elemei közül az NK sejtek, és azok érési és funkcionális alcsoportjai mutattak legerőteljesebb, és egyben hosszú távú károsodást a betegeken. Az éretlen/korai érett NK sejtek, amelyek hatékony citokin termelésük révén immunszabályozó tulajdonságokkal bírnak, és belőlük differenciálódnak az érett NK formák (Michel, Poli et al. 2016), szintjük szignifikánsan megnőtt, míg az érett, citotoxikus NK sejtek aránya szignifikáns csökkenést mutatott a betegeken, amely eltolódott arány három év múlva sem normalizálódott. Az anergia egy úgynevezett immunológiai érzéketlenségi állapot, amely állapot a sejtaktiválásnak kedvező feltételek biztosításával megszűnik, a sejtek ismét aktiválhatók, tehát visszafordítható ez az állapot (Yang, Cheng et al. 2018). Egy tanulmány szerint a daganatos sejtek is képesek az NK sejtek anergikus állapotát indukálni, amely természetesen rossz prognosztikai értékű (Yang, Cheng et al. 2018). Az általunk vizsgált betegeken az anergikus NK sejtek aránya növekvő tendenciát mutatott, de szignifikánsan csak a Kiber-kés terápiás csoportban nőtt meg közvetlenül a terápia után, és évekkal később sem normalizálódott. A kapott eredményekkel összecseng az egyes NK alcsoportok Ki67 sejtmagi markerrel vizsgált osztódási rátája, amely az éretlen/korai érett NK sejtekben volt a legmagasabb, az érett formákban egyáltalán nem változott, míg az anergikus NK sejtek osztódási kapacitása szignifikánsan lecsökkent a betegeken, amely a válaszképtelen állapot egyik legfontosabb jellemzője.

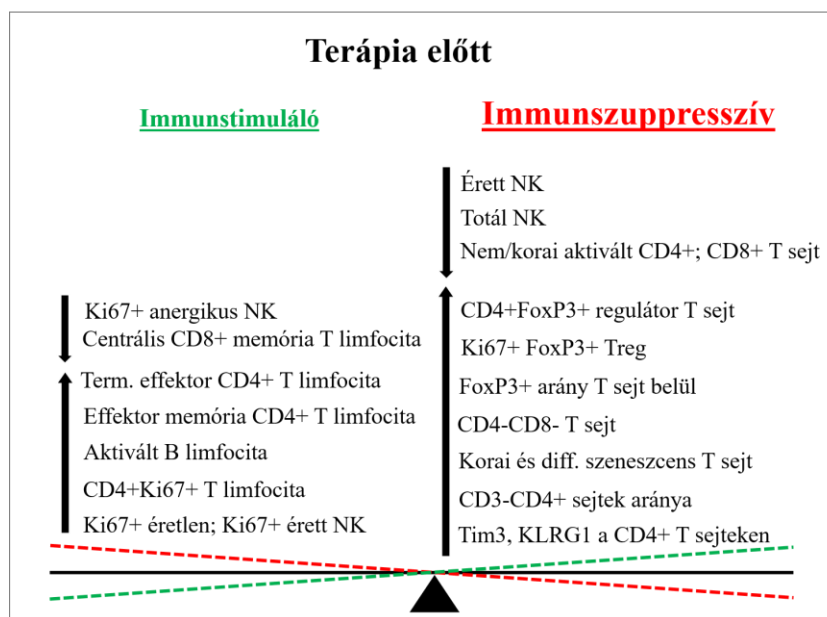
Vizsgáltuk a keringésben jelen levő monociták alcsoportjait, és szignifikáns eltolódást tapasztaltunk az átmeneti, a CD14 LPS receptort magasán expresszáló és CD16+ átmeneti monocita alcsoport irányába mind a négy betegcsoportban, amely alcsoport erősen expresszálja az MCP-1 fehérje receptorát, a CCR2-t, azonban a MIP-1 α fehérjét kötő CCR5 receptort csak nagyon kis mennyiségben fejezi ki (Weber, Belge et al. 2000), valamint fontos szerepük van az antigén prezentálásban és az apoptózis szabályozásában (Ziegler-Heitbrock 2007). A cirkuláris PSA+ makrofágok monitorozása segítséget nyújthat a jó és rosszindulatú prosztatata daganatos elváltozások elkülönítésében, amelyet Frans Nauwelaers és munkacsoportja is alátámaszt az eredményeikkel. A csoport a PSA+ makrofágok szintjének szignifikáns emelkedését

mutatta ki a prosztatata daganatos betegek perifériás vérében ($17,7\% \pm 12,3\%$) összehasonlítva a prosztatát érintő benignus elváltozásokkal rendelkező betegekkel ($3,6\% \pm 1,9\%$) (Leers, Nap et al. 2008). Egy másik tanulmányban a keringésben, illetve a tumoros mikrokörnyezetben található PSA+ makrofágok szintjét vizsgálták és hasonlították össze prosztatata daganatos betegek és egészséges donorok között. Eredményeikkel alátámasztották, hogy a PSA+ makrofágok szintje a prosztatata daganatos betegekben magasabb, és megállapították, hogy az intracelluláris PSA szint mérése nagyobb szenzitivitással (92%), specificitással (92%) és prediktív értékkel (92%) rendelkezik, mint a szérumból rutinszerűen kimutatható PSA szint (szenzitivitás: 79,5%, specificitás: 87,5%, prediktív érték: 26,8%) (Herwig, Mitteregger et al. 2008). A terápia előtti időpontban a mi prosztatata adenokarcinómás betegeinkben mért plazma PSA szint szignifikánsan megemelkedett, amely szintén a terápia előtt mért PSA+ makrofágok arányával erős pozitív ($r > 0,6$) korrelációt mutatott minden betegcsoportban. Azonban a későbbi időpontokban összehasonlítva a vérplazma PSA és az intracelluláris PSA szint változását elmondható, hogy a plazmában szintje már a kezelés után 3 hónappal normál szint alá süllyedt, míg a PSA+ makrofágok aránya 3 év után sem normalizálódott. Ennek lehetséges oka, hogy ugyan a prosztatata sejtei még mindig nagy mennyiségben termelik a PSA-t, azonban a makrofágok hatékonyan fagocitálják a lokálisan termelődő PSA-t a prosztatata szöveténél, így szabad formában a keringésbe jutó PSA szintje szignifikánsan lecsökken. A már említett fibrózis kialakulását számos citokin (IL-13, IL-21, TGF- β 1), kemokin (MCP-1, MIP-1 β), angiogenikus faktor (VEGF) és növekedési faktor (PDGF) szabályozza (Wynn 2008), amelyek közül mi is vizsgáltuk A PDGF-AA/BB, RANTES és ENA-78 fehérjéket, és változásukat hosszú távon nyomon követtük az LDR és HDR kezelésben részesült betegekben. Szintjük már terápia előtt megnőtt, de míg az LDR csoportban 3-6 hónap után csökkent szintjük, addig a HDR csoportban hosszú távú emelkedett szintet mértünk ki, amely összefügghet a nagyobb sugárterheléssel járó terápia késői következményeivel.

Végül pedig a DC-k változására szeretnék kitérni, amely sejtek az egyik legfontosabb összekötő elemei a két immunrendszernek, képesek beindítani a specifikus, adaptív immunválaszt. A fej-nyaki daganatos betegekkel ellentétben (ahol mindkét DC altípus erőteljes növekedést mutatott), a prosztatata daganatos betegeinkben a vizsgált

alcsoporthoz ellentétesen változtak. Kezelés előtt arányuk kontrollhoz közeli volt, azonban a terápia hatására a Th1 irányú eltolódást előidéző, IL-12, IFN- γ és TNF- α citokineket termelő mieloid („konvencionális”) alakok szignifikáns növekedést, míg az IL-3 fehérjét megkötő IL-3R α receptort nagy mennyiségben expresszáló és Th2 irányú differenciációt előidéző limfoid („plazmacitoid”) alakok szignifikáns csökkenést mutattak a betegekben (Porta, Rigolin et al. 2004, Moriyama and Nakamura 2017). Vagyis a celluláris immunitás kialakulásáért felelős, citotoxikus T sejt irányú tumor eliminációs, és gyulladásos folyamatok irányába történt eltolódás a betegekben (Li, Shi et al. 2022).

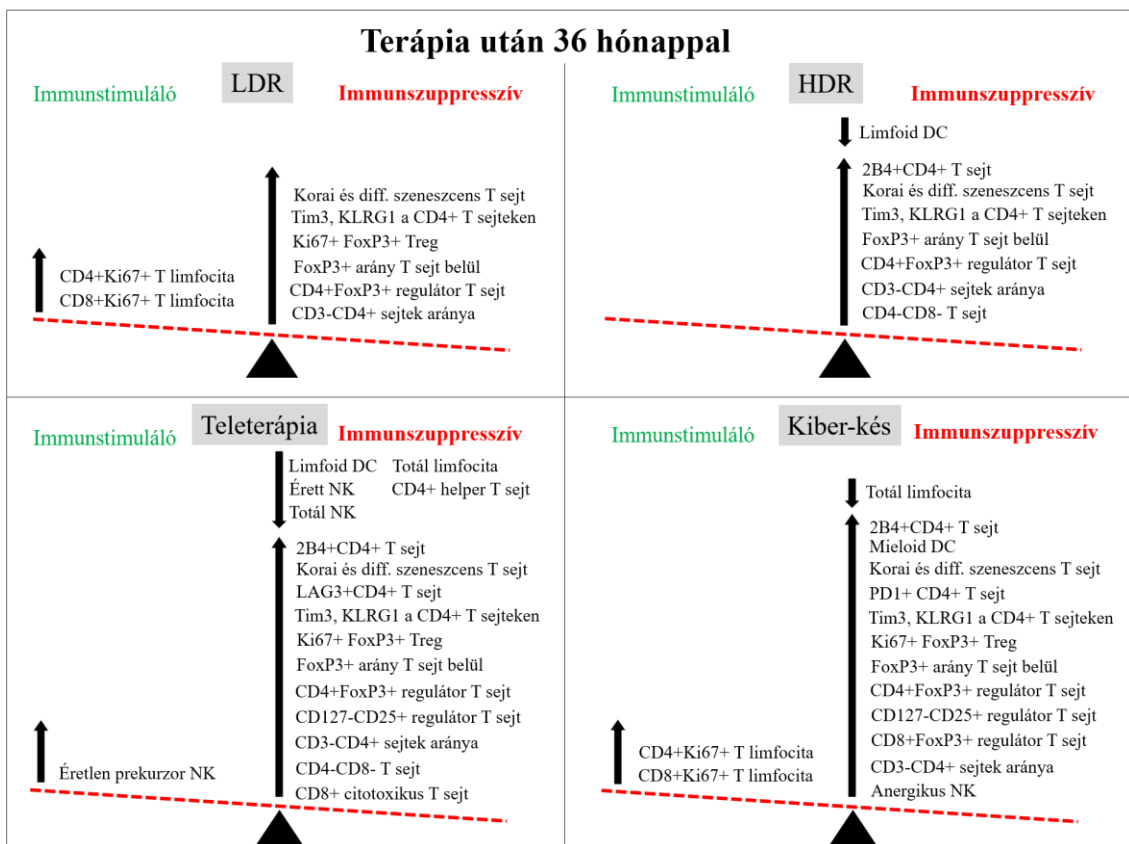
Az eredményeket összefoglalva látható, hogy már a tumor megjelenésével felborul az immunhomeosztázis, és mind a fej-nyaki, mind a prosztata daganatos betegekben az immunrendszert gátló, szuppresszív hatású celluláris változások kerülnek túlsúlyba, ugyanakkor ezzel párhuzamosan immunstimuláló folyamatok is aktiválódnak a betegekben (46. ábra).



46. ábra: A tanulmányban vizsgált daganatos betegekben a tumorstátusszal összefüggésbe hozható szuppresszív hatású celluláris változások kerülnek túlsúlyba a terápia megkezdése előtt. Az ábrán az egyes immunstimuláló, és immunszuppresszív hatású immunsejtek csoportja látható, a nyilak iránya pedig a kontrollhoz viszonyított változásuk irányát szemléltetik. Forrás: saját ábra.

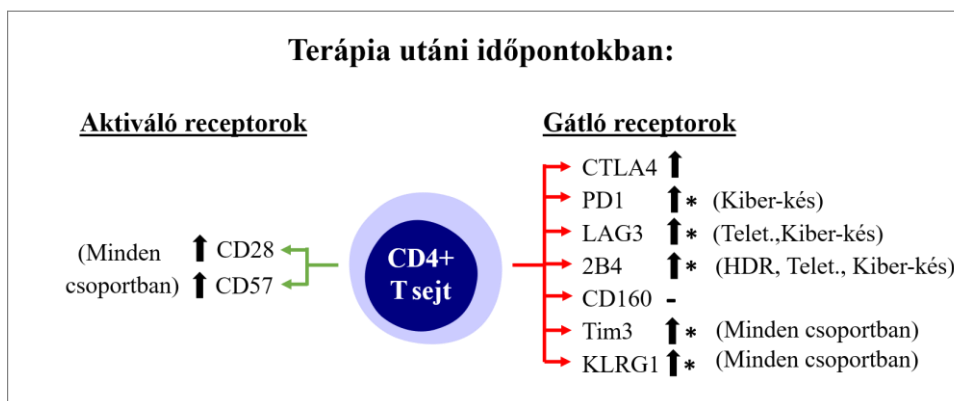
A terápia után azonban a különböző besugárzási protokollok eltérő mértékű akut és krónikus változásokat eredményeztek a betegekben. A vizsgált immunparaméterek nagy

része az LDR terápiában részesült csoportban mutatott legkisebb mértékű változást, mind a kontrollhoz, mind a kezelés előtti állapothoz képest, amely feltételezhetően a kis dóziszrátájú lassú, krónikus sugárexpozíciónak köszönhető. A bekövetkezett változások nagy része pedig hamarabb normalizálódott, mint a többi betegcsoportban. Az LDR-hez képest a HDR brachyterápia sokkal több paramétert érintő immunváltozást eredményezett 3 hónappal a terápia után (például: megnövekedett citotoxikus T sejt arány, és emelkedett CTLA+, LAG3+ és 2B4+ T sejt arány), amelyek egy még erőteljesebb szuppresszív státuszt eredményeztek a betegekben. Ennek vélhető oka a prosztata szövetét érő, nagy dóziszrátájú akut sugárexpozíció. A két külső terápia hatását összehasonlítva elmondható, hogy a teleterápia okozta a súlyosabb krónikus elváltozásokat, amelynek oka, hogy a teleterápia esetében nagyobb egészséges szövet rész, és nagyobb térfogatú perifériás vér esik a sugárnyaláb útjába. A Kiber-kés terápia pedig egy sokkal precízebb, robotikus technikával működtetett eljárás, amely a teleterápiás kezeléssel ellentétben kisebb sugárterheléssel jár. Három évvel a terápia után a betegcsoportokban különböző mértékű, de azonos irányú, azaz az immunszuppresszív állapot felé történő eltolódás maradt fent (47. ábra).



47. ábra: A tanulmányban vizsgált prosztata adenokarcinómás betegekben 36 hónappal a terápia után kimutatott, többségében szuppresszív hatású celluláris változásokat összefoglaló ábra. Forrás: saját ábra.

A tumor kialakulásával járó szuppresszív irányú immunstátusz eltolódást okozó T sejt felszíni markerek megnövekedett expressziója a daganat ellenes immunterápiák potenciális célmarkerei lehetnek, amely gátló receptorok blokkolásával a T sejt tumor ellenes aktivációja fokozható. Ezen gondolatmenet mentén az immunterápia szemszögéből szeretnék néhány kitekintés tenni, amely a jövőre vonatkozóan hasznos információval szolgálhat a daganatellenes terápia tervezése és kombinálása során. A már régóta kutatott CTLA4 és PD1 immunfék receptorok expressziója a T sejtek felszínén, ahogy korábban már kitértem rá, a fej-nyaki daganatos betegekben már kezelés előtt szignifikánsan magasabb szinten detektáltuk. Fej-nyaki daganatos betegségek gyógyításához már alkalmaznak az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) által is jóváhagyott PD1 gátló szereket (Polverini, D'Silva et al. 2018), és a CTLA4 markert célzó, kombinált immunterápiák fejlesztése is folyamatban van (NCT04080804). Ugyanakkor a prosztata daganatos betegekben a CTLA4 enyhe növekedést mutatott, míg a PD1 receptor expressziója nem változott a terápia előtt, így esetükben ezen receptorok terápia útján történő gátlása nehezebb lehet, és nem okozna nagymértékű T sejt aktivációt. Eredményeink is azt támasztják alá, hogy a prosztata daganat immunterápiája során kombináltan szükséges alkalmazni a különböző receptor inhibitorokat, kiegészítve akár androgén-megvonásos terápiával, és természetesen sugárterápiával, hogy még hatékonyabbá tegyék a tumor pusztítását (Alberti 2017). A dolgozatban további, a T sejtek felszíni gátló és aktiváló receptorok változását is vizsgáltuk. A LAG3, 2B4, CD160 gátló receptorokat expresszáló T sejtek aránya kontroll szinten mozgott terápia előtt, míg a Tim3+ és a KLRG1+ T sejtek már terápia előtt is szignifikánsan magasabb szintet mutattak. A CD160 markert leszámítva minden vizsgált immunfék receptorral rendelkező CD4+ T sejtek aránya erőteljes növekedést mutatott a sugárterápia utáni időpontokban (48. ábra).



48. ábra: A prosztata adenokarcinómás betegeinkben vizsgált T sejt felszíni aktiváló/gátló receptorok terápia utáni változását összefoglaló ábra, ahol a nyilak a változás irányát, a csillag a kontroll szinthez viszonyított szignifikáns változást jelöli (*: $p < 0,05$). Forrás: saját ábra.

A részletes immunfenotipizálási eredményeinket összefoglalva tehát látható, hogy a daganatos megbetegedés, és a sugárterápia következtében sokféle hatás éri egyszerre a szervezetet. A daganat következtében legyengült immunrendszert tovább szuppresszálja a sugárterápia, ezzel párhuzamosan bizonyos immunstimuláló folyamatokat pedig aktivál, tehát bebizonyosodott, hogy az ionizáló sugárzás és az immunrendszer között egy dinamikus kapcsolat áll fent ezekben a betegeknél. A hosszan fentálló szuppresszív állapot ellenére azonban teljes gyógyulást értek el a betegek.

6. Következtetések

- Egyedülálló részletességgel kidolgozott, a fej-nyaki és prosztatata daganatos betegek szisztémás immunológiai változásainak nyomon követéséhez több mint, 40 féle funkcionális immunsejt csoportot vizsgáló fenotipizálási panel rendszert sikerült kifejlesztenünk, amellyel sikeresen monitoroztuk a betegeket.
- Mind a tumor státusz, mind pedig a sugárterápia befolyásolta a betegek immunhomeosztázisát: a daganat státusz következtében mindkét betegcsoportban az immunszuppresszív folyamatok irányába történt eltolódás, amelyet a sugárterápia tovább erősített a betegekben (pl.: szuppresszív hatású Treg és dupla negatív T sejtek).
- Sikerült összehasonlítanunk az eltérő intenzitású és energiájú sugárterhelés szisztémás hatásait, amely eredményekből arra következtethetünk, hogy:
 - Legkisebb mértékű szisztémás immunológiai változást az LDR terápia okozta, azonban emellett, hogy kis dózisirátájú sugárterhelésről van szó, azt sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy az LDR-es csoportban csak kis és közepes kockázatú betegek voltak, így ezen tényezők együttesen is okozhatták a kisebb mértékű változásokat.
 - Legsúlyosabb immunszuppresszív eltolódást a teleterápiás kezelésben részesült csoportban tapasztaltuk, amely kezelés esetében lehetett a legnagyobb mértékű ép szöveti károsodás és perifériás vér expozíció, illetve a csoport fele a legmagasabb kockázati besorolással rendelkezett. Három évvel a terápia után különböző mértékű immunszuppresszió maradt fent a betegekben.
 - Mindezekből arra következtethetünk, hogy az eltérő nagyságú sugárterhelés mellett az előrehaladottabb stádiumban lévő tumorra rendelkező daganatos betegben erősebb, és tartósabb szisztémás immunszuppresszió lép fel sugárkezelés hatására. Ez is rávilágít a megbízható prognosztikai marker szükségességére.
- Tartósan fennmaradt transzkripciós szabályozási zavarra utaló változásokat detektáltunk, azonban fehérjeszinten csak enyhébb sugárhatást mértünk ki a betegekben.

- A hosszú távon fentmaradt szeneszccens irányú fenotipikus elváltozások hátterében az immunsejtek perzisztens kromoszóma sérüléséből eredő funkcióvesztés állhat.
- Ionizáló sugárzás hatására szignifikáns különbségeket detektáltunk a CD4+ és a CD8+ T limfociták funkcionális alcsoportjainak változása között. Ez szintén alátámasztja a tényt, miszerint a helper és a citotoxikus T sejteknek eltérő a sugárérzékenysége, amelyből adódóan a sugárterápia eltérő módon befolyásolta azok funkcionális állapotát, osztódási képességüket (Bogdandi, Balogh et al. 2010, Heylmann, Rodel et al. 2014).
- A LAG3, 2B4, Tim3 és a KLRG1 T sejt felszíni immunfék receptorok változását nyomon követtük, amelyek az immunterápiák potenciális célmarkerei lehetnek. A sugárterápiának az expressziós mintázatukra gyakorolt rövid és hosszú távú hatásait is vizsgáltuk, hiszen a jövőre vonatkozóan fontos információ lehet, hogy az immunterápiával kombinált sugárterápia hogyan befolyásolja az immunterápiás cél receptorok expresszióját. Miután a gátló receptorok expressziója sugárterápia hatására nőtt meg, ebből arra következtethetünk, hogy a szinergista hatás eléréséért előbb célszerű a sugárterápiát, majd azt követően immunterápiát alkalmazni a prosztatata daganatos betegek esetében, hogy még hatékonyabbá tegyük az immunterápia daganatpusztító hatását. Továbbá egy egészen új aspektus lehet, hogy az aktiváló receptorok (pl.: CD28) kifejeződését fokozzuk a T sejtek felszínén, fokozva ezzel az immunológiai szinapszis kialakulását.
- Sikert a plazma PSA mellett egy, a betegek 92%-ában már terápia előtt szignifikánsan megemelkedő markert beazonosítani, ezek a PSA+ makrofágok. Kései magas szintjéből pedig arra lehet következtetni, hogy a prosztatata sejtszintjén még mindig nagy mennyiségben termelik a PSA-t, amelynek oka lehet akár egy krónikusan fennálló gyulladás, amely a sugárzás következtében kialakult késői fibrotikus elváltozásokkal függhet össze. A daganat sikeres kezelése ellenére fentmaradt fokozott PSA termelés szintén a marker alacsony tumor specificitására utal. Azonban ha a makrofágokban hamarabb feldúsulna a PSA, mint hogy szabad formában a keringésbe jutna, nagyobb specificitású prognosztikai markerként szolgálhat a jövőben a prosztatata daganatos betegek korai diagnosztizálásához.
- A tanulmány eredményei az eddig alkalmazott besugárzási protokollok egyénre szabásában segíthet, amellyel közelebb juthatunk azon betegek beazonosításához,

akik számára hasznos, és akik számára csak súlyos mellékhatásokkal végezhető a sugárterápia, illetve a sugár- és immunterápia kombinálásának optimalizálásával akár a betegek felesleges sugárterhelése is csökkenthető lesz a jövőben.

7. Összefoglalás

Jelen tanulmány fő témája a daganat státusz és a sugárterápia szerepének vizsgálata a szisztémás immunválasz rövid- és hosszútávú modulálásában fej-nyaki és prosztatata daganatos betegekben. Az egyedülálló részletességgel kidolgozott fenotipizálási panel rendszer segítségével összehasonlítottuk az eltérő intenzitású és energiájú sugárterhelés hatásait. Megállapítottuk, hogy a legkisebb mértékű szisztémás immunológiai változást az LDR terápia okozta, míg a legsúlyosabb immunszuppresszív eltolódást a teleterápiás kezelésben részesült csoportban tapasztaltuk, amely három évvel később is fentmaradt a betegekben. Szintén megállapítottuk, hogy az eltérő nagyságú sugárterhelés mellett az előrehaladottabb stádiumban lévő tumorral rendelkező daganatos betegben erősebb, és tartósabb szisztémás immunszuppresszió lép fel terápia hatására. Ionizáló sugárzás hatására szignifikáns különbségeket detektáltunk a CD4⁺ és a CD8⁺ T limfociták funkcionális alcsoportjainak változása között, amely az alcsoportok eltérő sugárérzékenységét támasztja alá. A hosszú távon fentmaradt szenescens irányú fenotipikus elváltozások hátterében az immunsejtek perzisztens kromoszóma sérüléséből eredő funkcióvesztés állhat. A LAG3, 2B4, Tim3 és a KLRG1 T sejt felszíni gátló receptorok expressziója sugárterápia hatására nőtt meg, ebből arra következtethetünk, hogy a szinergista hatás eléréséért előbb célszerű a sugárterápiát, majd azt követően immunterápiát alkalmazni a prosztatata daganatos betegek esetében, hogy még hatékonyabbá tegyük az immunterápia daganatpusztító hatását. Sikerült a plazma PSA mellett egy, a betegek 92%-ában már terápia előtt szignifikánsan megemelkedő markert beazonosítani, ezek a PSA⁺ makrofágok. Kései magas szintjük utalhat a sugárzás következtében kialakult késői fibrózisra. A daganat sikeres kezelése ellenére fentmaradt fokozott PSA termelés a marker alacsony tumor specificitására utal. Azonban ha a makrofágokban hamarabb feldúsulna a PSA, mint hogy szabad formában a keringésbe jutna, nagyobb specificitású prognosztikai markerként szolgálhat a jövőben a prosztatata daganatos betegek korai diagnosztizálásához. A tanulmány eredményei az eddig alkalmazott besugárzási protokollok egyénre szabásában segíthet, amellyel közelebb juthatunk azon betegek beazonosításához, akik számra hasznos, és akik számára csak súlyos mellékhatásokkal végezhető a sugárterápia, illetve a sugár- és immunterápia kombinálásának optimalizálásával akár a betegek felesleges sugárterhelése is csökkenthető lesz a jövőben.

Summary

The main topic of this thesis is the investigation how cancer and different types of radiotherapy can impact the acute and chronic immune responses of head and neck and prostate cancer patients. We developed a detailed immune phenotyping panel system, which enables us to compare the systemic effects of different types of radiotherapy. We established that the mildest immunological changes were caused by LDR therapy, while the most severe immunosuppressive shift was observed in the group receiving teletherapy treatment. This shift was detected up to 36 months after therapy in all patient groups. However we determined beside the different radiation exposures, patients with more advanced tumor stage have stronger and more permanent immunosuppression after radiotherapy. We found significant differences between the CD4⁺ helper and CD8⁺ cytotoxic T cell subpopulations after therapy indicating different radiation sensitivity of the subpopulations. The background of the persistent shift of senescent T cell phenotype might be the loss of function resulting from persistent chromosome damage of the immune cells. The proportion of LAG3⁺, 2B4⁺, Tim3⁺ and KLRG1⁺ T cells increased after radiotherapy in prostate cancer patients. We can conclude that in order to achieve a synergistic effect, it is advisable to use radiotherapy first and then immunotherapy to enhance the efficiency of tumor elimination. We have successfully monitored the changes of PSA⁺ macrophages, which level significantly increased in 92% of the patients before therapy. Their late elevated levels may indicate radiation induced late fibrosis of the prostate. Despite the successful treatment of the tumor, the remaining increased PSA indicates the low tumor specificity of the marker. However, if PSA could appear within macrophages before it enters the circulation in free form, it could serve as a more specific prognostic marker for early diagnosis of prostate cancer patients in the future. The results of the study can help in the individualization of the radiation protocols used up to now, through this we can get closer to the identification of patients who most likely benefit from a certain therapy regimen, and patients who have serious side effects. Furthermore, through the optimization of radiotherapy and immunotherapy combination it will also be possible to reduce the unnecessary radiation exposure of patients in the future.

8. Irodalomjegyzék

- Aaronson, N. K., M. Bullinger and S. Ahmedzai (1988). "A modular approach to quality-of-life assessment in cancer clinical trials." Recent Results Cancer Res **111**: 231-249.
- Abraham, V. S., D. H. Sachs and M. Sykes (1992). "Mechanism of protection from graft-versus-host disease mortality by IL-2. III. Early reductions in donor T cell subsets and expansion of a CD3+CD4-CD8- cell population." J Immunol **148**(12): 3746-3752.
- Abusaris, H., M. Hoogeman and J. J. Nuyttens (2012). "Re-irradiation: outcome, cumulative dose and toxicity in patients retreated with stereotactic radiotherapy in the abdominal or pelvic region." Technol Cancer Res Treat **11**(6): 591-597.
- Abusaris, H., P. R. Storchi, R. P. Brandwijk and J. J. Nuyttens (2011). "Second re-irradiation: efficacy, dose and toxicity in patients who received three courses of radiotherapy with overlapping fields." Radiother Oncol **99**(2): 235-239.
- Aggarwal, S., S. C. Sharma and N. D. S (2017). "Dynamics of regulatory T cells (T(regs)) in patients with oral squamous cell carcinoma." J Surg Oncol **116**(8): 1103-1113.
- Akl, H., B. Badran, G. Dobirta, G. Manfouo-Foutsop, M. Moschitta, M. Merimi, A. Burny, P. Martiat and K. E. Willard-Gallo (2007). "Progressive loss of CD3 expression after HTLV-I infection results from chromatin remodeling affecting all the CD3 genes and persists despite early viral genes silencing." Virol J **4**: 85.
- Alberti, C. (2017). "Prostate cancer immunotherapy, particularly in combination with androgen deprivation or radiation treatment. Customized pharmacogenomic approaches to overcome immunotherapy cancer resistance." G Chir **37**(5): 225-235.
- Alikhan, M., J. Y. Song, A. R. Sohani, J. Moroch, A. Plonquet, A. S. Duffield, M. J. Borowitz, L. Jiang, C. Bueso-Ramos, K. Inamdar, M. P. Menon, S. Gurbuxani, E. Chan, S. M. Smith, A. Nicolae, E. S. Jaffe, P. Gaulard and G. Venkataraman (2016). "Peripheral T-cell lymphomas of follicular helper T-cell type frequently display an aberrant CD3(-/dim)CD4(+) population by flow cytometry: an important clue to the diagnosis of a Hodgkin lymphoma mimic." Mod Pathol **29**(10): 1173-1182.

Amadori, A., R. Zamarchi, G. De Silvestro, G. Forza, G. Cavatton, G. A. Danieli, M. Clementi and L. Chieco-Bianchi (1995). "Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans." Nat Med **1**(12): 1279-1283.

Amand, M., G. Iserentant, A. Poli, M. Sleiman, V. Fievez, I. P. Sanchez, N. Sauvageot, T. Michel, N. Aouali, B. Janji, C. M. Trujillo-Vargas, C. Seguin-Devaux and J. Zimmer (2017). "Human CD56(dim)CD16(dim) Cells As an Individualized Natural Killer Cell Subset." Front Immunol **8**: 699.

Amundson, S. A., M. B. Grace, C. B. McLeland, M. W. Epperly, A. Yeager, Q. Zhan, J. S. Greenberger and A. J. Fornace, Jr. (2004). "Human in vivo radiation-induced biomarkers: gene expression changes in radiotherapy patients." Cancer Res **64**(18): 6368-6371.

Anker, C. J. and D. C. Shrieve (2009). "Basic principles of radiobiology applied to radiosurgery and radiotherapy of benign skull base tumors." Otolaryngol Clin North Am **42**(4): 601-621.

Arosa, F. A. (2002). "CD8+CD28- T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset." Immunol Cell Biol **80**(1): 1-13.

Atri, C., F. Z. Guerfali and D. Laouini (2018). "Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases." Int J Mol Sci **19**(6).

Balazs, K., E. Kis, C. Badie, E. N. Bogdandi, S. Candeias, L. C. Garcia, I. Dominczyk, B. Frey, U. Gaipf, Z. Juranyi, Z. S. Kocsis, E. A. Rutten, G. Safrany, P. Widlak and K. Lumniczky (2019). "Radiotherapy-Induced Changes in the Systemic Immune and Inflammation Parameters of Head and Neck Cancer Patients." Cancers (Basel) **11**(9).

Balazs, K., Z. S. Kocsis, P. Agoston, K. Jorgo, L. Gesztesi, G. Farkas, G. Szekely, Z. Takacsi-Nagy, C. Polgar, G. Safrany, Z. Juranyi and K. Lumniczky (2022). "Prostate Cancer Survivors Present Long-Term, Residual Systemic Immune Alterations." Cancers (Basel) **14**(13).

Balogh, A., E. Persa, E. N. Bogdandi, A. Benedek, H. Hegyesi, G. Safrany and K. Lumniczky (2013). "The effect of ionizing radiation on the homeostasis and functional integrity of murine splenic regulatory T cells." Inflamm Res **62**(2): 201-212.

Bannard, O. and J. G. Cyster (2017). "Germinal centers: programmed for affinity maturation and antibody diversification." Curr Opin Immunol **45**: 21-30.

Barry, M. J., F. J. Fowler, Jr., M. P. O'Leary, R. C. Bruskewitz, H. L. Holtgrewe, W. K. Mebust and A. T. Cockett (1992). "The American Urological Association symptom index for benign prostatic hyperplasia. The Measurement Committee of the American Urological Association." J Urol **148**(5): 1549-1557; discussion 1564.

Bilate, A. M. and J. J. Lafaille (2012). "Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance." Annu Rev Immunol **30**: 733-758.

Bogdandi, E. N., A. Balogh, N. Felgyinszki, T. Szatmari, E. Persa, G. Hildebrandt, G. Safrany and K. Lumnitzky (2010). "Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation." Radiat Res **174**(4): 480-489.

Boice, J. D., Jr. (2017). "The linear nonthreshold (LNT) model as used in radiation protection: an NCRP update." Int J Radiat Biol **93**(10): 1079-1092.

Bol, K. F., G. Schreibelt, K. Rabold, S. K. Wculek, J. K. Schwarze, A. Dzionek, A. Teijeira, L. E. Kandalaft, P. Romero, G. Coukos, B. Neyns, D. Sancho, I. Melero and I. J. M. de Vries (2019). "The clinical application of cancer immunotherapy based on naturally circulating dendritic cells." J Immunother Cancer **7**(1): 109.

Brenner, D. J. and E. J. Hall (2007). "Computed tomography--an increasing source of radiation exposure." N Engl J Med **357**(22): 2277-2284.

Brondum, L., J. G. Eriksen, B. Singers Sorensen, L. S. Mortensen, K. Toustrup, J. Overgaard and J. Alsner (2017). "Plasma proteins as prognostic biomarkers in radiotherapy treated head and neck cancer patients." Clin Transl Radiat Oncol **2**: 46-52.

Buffa, S., M. Pellicano, M. Bulati, A. Martorana, D. Goldeck, C. Caruso, G. Pawelec and G. Colonna-Romano (2013). "A novel B cell population revealed by a CD38/CD24 gating strategy: CD38(-)CD24 (-) B cells in centenarian offspring and elderly people." Age (Dordr) **35**(5): 2009-2024.

Campbell, J. J., K. E. Murphy, E. J. Kunkel, C. E. Brightling, D. Soler, Z. Shen, J. Boisvert, H. B. Greenberg, M. A. Vierra, S. B. Goodman, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, E. C. Butcher and L. Wu (2001). "CCR7 expression and memory T cell diversity in humans." J Immunol **166**(2): 877-884.

Cencioni, M. T., R. Ali, R. Nicholas and P. A. Muraro (2021). "Defective CD19+CD24(hi)CD38(hi) transitional B-cell function in patients with relapsing-remitting MS." Mult Scler **27**(8): 1187-1197.

Chadwick, K. H. and H. P. Leenhouts (1998). "Radiation induced chromosome aberrations: some biophysical considerations." Mutat Res **404**(1-2): 113-117.

Chang, H., J. W. Wei, K. Chen, S. Zhang, F. Han, L. X. Lu, W. W. Xiao and Y. H. Gao (2018). "Apolipoprotein A-I Is a Prognosticator of Nasopharyngeal Carcinoma in the Era of Intensity-modulated Radiotherapy." J Cancer **9**(4): 702-710.

Chen, X., Y. Du, X. Lin, Y. Qian, T. Zhou and Z. Huang (2016). "CD4+CD25+ regulatory T cells in tumor immunity." Int Immunopharmacol **34**: 244-249.

Chi, X., Y. Li and X. Qiu (2020). "V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation." Immunology **160**(3): 233-247.

Churlaud, G., F. Pitoiset, F. Jebbawi, R. Lorenzon, B. Bellier, M. Rosenzweig and D. Klatzmann (2015). "Human and Mouse CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy." Front Immunol **6**: 171.

Clark, A. and L. J. Fallowfield (1986). "Quality of life measurements in patients with malignant disease: a review." J R Soc Med **79**(3): 165-169.

Collin, M. and V. Bigley (2018). "Human dendritic cell subsets: an update." Immunology **154**(1): 3-20.

Coppe, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D. P. Munoz, J. Goldstein, P. S. Nelson, P. Y. Desprez and J. Campisi (2008). "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor." PLoS Biol **6**(12): 2853-2868.

Costantini, D. and B. Borremans (2019). "The linear no-threshold model is less realistic than threshold or hormesis-based models: An evolutionary perspective." Chem Biol Interact **301**: 26-33.

Cox, J. D., J. Stetz and T. F. Pajak (1995). "Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)." Int J Radiat Oncol Biol Phys **31**(5): 1341-1346.

Davalos, A. R., J. P. Coppe, J. Campisi and P. Y. Desprez (2010). "Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression." Cancer Metastasis Rev **29**(2): 273-283.

Demirci, U., M. Yaman, S. Buyukberber, U. Coskun, M. Baykara, K. Uslu, A. Ozet, M. Benekli and E. U. Bagriacik (2012). "Prognostic importance of markers for

inflammation, angiogenesis and apoptosis in high grade glial tumors during temozolomide and radiotherapy." Int Immunopharmacol **14**(4): 546-549.

Domina, E. A. and O. L. Kopylenko (2022). "Role of Radioprotectors in Minimization of Stochastic Effects of Radiation Incidents." Exp Oncol **44**(3): 186-189.

Doss, M. (2013). "Linear No-Threshold Model VS. Radiation Hormesis." Dose Response **11**(4): 480-497.

Dustin, M. L. (2014). "The immunological synapse." Cancer Immunol Res **2**(11): 1023-1033.

Eibel, H., H. Kraus, H. Sic, A. K. Kienzler and M. Rizzi (2014). "B cell biology: an overview." Curr Allergy Asthma Rep **14**(5): 434.

Esensten, J. H., Y. A. Helou, G. Chopra, A. Weiss and J. A. Bluestone (2016). "CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy." Immunity **44**(5): 973-988.

Fagnoni, F. F., R. Vescovini, M. Mazzola, G. Bologna, E. Nigro, G. Lavagetto, C. Franceschi, M. Passeri and P. Sansoni (1996). "Expansion of cytotoxic CD8+ CD28- T cells in healthy ageing people, including centenarians." Immunology **88**(4): 501-507.

Falcke, S. E., P. F. Ruhle, L. Deloch, R. Fietkau, B. Frey and U. S. Gaipl (2018). "Clinically Relevant Radiation Exposure Differentially Impacts Forms of Cell Death in Human Cells of the Innate and Adaptive Immune System." Int J Mol Sci **19**(11).

Fenoglio, D., C. Dentone, A. Signori, A. Di Biagio, A. Parodi, F. Kalli, G. Nasi, M. Curto, G. Cenderello, P. De Leo, V. Bartolacci, G. Orofino, L. A. Nicolini, L. Taramasso, E. Fiorillo, V. Orru, P. Traverso, B. Bruzzone, F. Ivaldi, E. Mantia, M. Guerra, S. Negrini, M. Giacomini, S. Bhagani and G. Filaci (2018). "CD8(+)/CD28(-)/CD127(lo)/CD39(+) regulatory T-cell expansion: A new possible pathogenic mechanism for HIV infection?" J Allergy Clin Immunol **141**(6): 2220-2233 e2224.

Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-336.

Foray, N., C. F. Arlett and E. P. Malaise (1997). "Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: a closer look." Biochimie **79**(9-10): 567-575.

Friedman, W. A. (1992). "Linear accelerator radiosurgery." Clin Neurosurg **38**: 445-471.

- Friedman, W. A. (2008). "Linear accelerator radiosurgery for vestibular schwannomas." Prog Neurol Surg **21**: 228-237.
- Fry, R. J. (2001). "Deterministic effects." Health Phys **80**(4): 338-343.
- Gabitass, R. F., N. E. Annels, D. D. Stocken, H. A. Pandha and G. W. Middleton (2011). "Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13." Cancer Immunol Immunother **60**(10): 1419-1430.
- Gattinoni, L., D. E. Speiser, M. Lichterfeld and C. Bonini (2017). "T memory stem cells in health and disease." Nat Med **23**(1): 18-27.
- Gerloni, M. and M. Zanetti (2005). "CD4 T cells in tumor immunity." Springer Semin Immunopathol **27**(1): 37-48.
- Grage-Griebenow, E., H. D. Flad and M. Ernst (2001). "Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets." J Leukoc Biol **69**(1): 11-20.
- Greenplate, A. R., D. D. McClanahan, B. K. Oberholtzer, D. B. Doxie, C. E. Roe, K. E. Diggins, N. Leelatian, M. L. Rasmussen, M. C. Kelley, V. Gama, P. J. Siska, J. C. Rathmell, P. B. Ferrell, D. B. Johnson and J. M. Irish (2019). "Computational Immune Monitoring Reveals Abnormal Double-Negative T Cells Present across Human Tumor Types." Cancer Immunol Res **7**(1): 86-99.
- Guilliams, M., F. Ginhoux, C. Jakubzick, S. H. Naik, N. Onai, B. U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand and S. Yona (2014). "Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny." Nat Rev Immunol **14**(8): 571-578.
- Helleday, T., J. Lo, D. C. van Gent and B. P. Engelward (2007). "DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment." DNA Repair (Amst) **6**(7): 923-935.
- Herwig, R., D. Mitteregger, B. Djavan, G. Kramer, M. Margreiter, M. P. Leers, B. Glodny, D. G. Haider, W. H. Horl and M. Marberger (2008). "Detecting prostate cancer by intracellular macrophage prostate-specific antigen (PSA): a more specific and sensitive marker than conventional serum total PSA." Eur J Clin Invest **38**(6): 430-437.

Heylmann, D., F. Rodel, T. Kindler and B. Kaina (2014). "Radiation sensitivity of human and murine peripheral blood lymphocytes, stem and progenitor cells." Biochim Biophys Acta **1846**(1): 121-129.

Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.

Howard, R. R., C. S. Fasano, L. Frey and C. H. Miller (1996). "Reference intervals of CD3, CD4, CD8, CD4/CD8, and absolute CD4 values in Asian and Non-Asian populations." Cytometry **26**(3): 231-232.

Janvary, L. Z., O. Ferenczi, Z. Takacsi-Nagy, A. Bajcsay and C. Polgar (2018). "[Application of CyberKnife stereotactic radiosurgery in the treatment of head and neck cancer]." Magy Onkol **62**(3): 180-185.

Jiang, W., L. Kang, H. Z. Lu, X. Pan, Q. Lin, Q. Pan, Y. Xue, X. Weng and Y. W. Tang (2004). "Normal values for CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy Chinese adults from Shanghai." Clin Diagn Lab Immunol **11**(4): 811-813.

Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Holenbeck, M. A. Lerman, A. Najj and A. J. Caton (2001). "Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide." Nat Immunol **2**(4): 301-306.

Joshua, D. E., S. Vuckovic, J. Favaloro, K. H. A. Lau, S. Yang, C. E. Bryant, J. Gibson and P. J. Ho (2021). "Treg and Oligoclonal Expansion of Terminal Effector CD8(+) T Cell as Key Players in Multiple Myeloma." Front Immunol **12**: 620596.

Kabacik, S., A. Mackay, N. Tamber, G. Manning, P. Finnon, F. Paillier, A. Ashworth, S. Bouffler and C. Badie (2011). "Gene expression following ionising radiation: identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response." Int J Radiat Biol **87**(2): 115-129.

Kaiser, M., M. D. Semeraro, M. Herrmann, G. Absenger, A. Gerger and W. Renner (2021). "Immune Aging and Immunotherapy in Cancer." Int J Mol Sci **22**(13).

Kim, J., Y. J. Chwae, M. Y. Kim, I. H. Choi, J. H. Park and S. J. Kim (1997). "Molecular basis of HLA-C recognition by p58 natural killer cell inhibitory receptors." J Immunol **159**(8): 3875-3882.

Kiniwa, Y., Y. Miyahara, H. Y. Wang, W. Peng, G. Peng, T. M. Wheeler, T. C. Thompson, L. J. Old and R. F. Wang (2007). "CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer." Clin Cancer Res **13**(23): 6947-6958.

Kis, E., T. Szatmari, M. Keszei, R. Farkas, O. Esik, K. Lumniczky, A. Falus and G. Safrany (2006). "Microarray analysis of radiation response genes in primary human fibroblasts." Int J Radiat Oncol Biol Phys **66**(5): 1506-1514.

Kondo, K., I. Ohigashi and Y. Takahama (2019). "Thymus machinery for T-cell selection." Int Immunol **31**(3): 119-125.

Kubo, M., T. Satoh, H. Ishiyama, K. I. Tabata, H. Tsumura, S. Komori, M. Iwamura, S. Baba, K. Hayakawa, T. Kawamura and F. Obata (2018). "Enhanced activated T cell subsets in prostate cancer patients receiving iodine-125 low-dose-rate prostate brachytherapy." Oncol Rep **39**(1): 417-424.

Lee, B., D. J. Lim, W. Y. Heo, S. E. Yoon, H. Y. Kim, H. J. Kim, S. H. Kim and D. Cho (2021). "Aberrant Loss of Surface CD3 and TCRgammadelta Expression in Relapsed Hepatosplenic T-cell Lymphoma." Ann Lab Med **41**(6): 598-600.

Leers, M. P., M. Nap, R. Herwig, K. Delaere and F. Nauwelaers (2008). "Circulating PSA-containing macrophages as a possible target for the detection of prostate cancer: a three-color/five-parameter flow cytometric study on peripheral blood samples." Am J Clin Pathol **129**(4): 649-656.

Li, C., P. B. Wilson, E. Levine, J. Barber, A. L. Stewart and S. Kumar (1999). "TGF-beta1 levels in pre-treatment plasma identify breast cancer patients at risk of developing post-radiotherapy fibrosis." Int J Cancer **84**(2): 155-159.

Li, Q., Z. Shi, F. Zhang, W. Zeng, D. Zhu and L. Mei (2022). "Symphony of nanomaterials and immunotherapy based on the cancer-immunity cycle." Acta Pharm Sin B **12**(1): 107-134.

Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler and J. A. Bluestone (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." J Exp Med **203**(7): 1701-1711.

Lu, Y., P. Hu, H. Zhou, Z. Yang, Y. U. Sun, R. M. Hoffman and J. Chen (2019). "Double-negative T Cells Inhibit Proliferation and Invasion of Human Pancreatic Cancer Cells in Co-culture." Anticancer Res **39**(11): 5911-5918.

Luckheeram, R. V., R. Zhou, A. D. Verma and B. Xia (2012). "CD4(+)T cells: differentiation and functions." Clin Dev Immunol **2012**: 925135.

- Lumniczky, K., N. Impens, G. Armengol, S. Candeias, A. G. Georgakilas, S. Hornhardt, O. A. Martin, F. Rodel and D. Schaue (2021). "Low dose ionizing radiation effects on the immune system." Environ Int **149**: 106212.
- Lumniczky, K. and G. Safrany (2015). "The impact of radiation therapy on the antitumor immunity: local effects and systemic consequences." Cancer Lett **356**(1): 114-125.
- Lumniczky, K. and G. Safrany (2016). "[The effect of radiotherapy on the antitumor immune response. Possibilities to combine radiotherapy with immunotherapy]." Magy Onkol **60**(1): 46-54.
- Luo, X. L., G. Z. Zhong, L. Y. Hu, J. Chen, Y. Liang, Q. Y. Chen, Q. Liu, H. L. Rao, K. L. Chen and Q. Q. Cai (2015). "Serum apolipoprotein A-I is a novel prognostic indicator for non-metastatic nasopharyngeal carcinoma." Oncotarget **6**(41): 44037-44048.
- Ma, L., L. Wang, C. L. Tseng and A. Sahgal (2017). "Emerging technologies in stereotactic body radiotherapy." Chin Clin Oncol **6**(Suppl 2): S12.
- Magadan, S. (2020). "Adaptive immune receptor repertoires, an overview of this exciting field." Immunol Lett **221**: 49-55.
- Mahnke, Y. D., T. M. Brodie, F. Sallusto, M. Roederer and E. Lugli (2013). "The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets." Eur J Immunol **43**(11): 2797-2809.
- Mann, J. E., J. D. Smith, A. C. Birkeland, E. Bellile, P. Swiecicki, M. Mierzwa, S. B. Chinn, A. G. Shuman, K. M. Malloy, K. A. Casper, S. A. McLean, J. S. Moyer, G. T. Wolf, C. R. Bradford, M. E. Prince, T. E. Carey, J. B. McHugh, M. E. Spector and J. C. Brenner (2019). "Analysis of tumor-infiltrating CD103 resident memory T-cell content in recurrent laryngeal squamous cell carcinoma." Cancer Immunol Immunother **68**(2): 213-220.
- Marcus, D. M., A. B. Jani, K. Godette and P. J. Rossi (2010). "A review of low-dose-rate prostate brachytherapy--techniques and outcomes." J Natl Med Assoc **102**(6): 500-510.
- Marioni, G., G. Ottaviano, R. Marchese-Ragona, E. Fasanaro, G. Tealdo, C. Zanotti, B. Randon, L. Giacomelli, E. Stellini and S. Blandamura (2017). "Nuclear survivin

expression correlates with endoglin-assessed microvascularisation in laryngeal carcinoma." J Clin Pathol **70**(12): 1033-1037.

Marioni, G., A. Staffieri, R. Hagen, G. Ottaviano, M. Lionello, C. Staffieri, L. Giacomelli and S. Blandamura (2013). "Prognostic value of hypoxia-inducible factors (angiogenin and endoglin) in open partial laryngectomies: uni- and multivariate analyses." Am J Otolaryngol **34**(1): 3-9.

Martinez, F. O., S. Gordon, M. Locati and A. Mantovani (2006). "Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression." J Immunol **177**(10): 7303-7311.

Mate, T. P., J. E. Gottesman, J. Hatton, M. Gribble and L. Van Hollebeke (1998). "High dose-rate afterloading 192Iridium prostate brachytherapy: feasibility report." Int J Radiat Oncol Biol Phys **41**(3): 525-533.

Matoba, T., M. Imai, N. Ohkura, D. Kawakita, K. Ijichi, T. Toyama, A. Morita, S. Murakami, S. Sakaguchi and S. Yamazaki (2019). "Regulatory T cells expressing abundant CTLA-4 on the cell surface with a proliferative gene profile are key features of human head and neck cancer." Int J Cancer **144**(11): 2811-2822.

McLane, L. M., M. S. Abdel-Hakeem and E. J. Wherry (2019). "CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer." Annu Rev Immunol **37**: 457-495.

Menoret, S., L. Tesson, S. Remy, V. Gourain, C. Serazin, C. Usal, A. Guiffes, V. Chenouard, L. H. Ouisse, M. Gantier, J. M. Heslan, C. Fourgeux, J. Poschmann, C. Guillonnet and I. Anegon (2023). "CD4(+) and CD8(+) regulatory T cell characterization in the rat using a unique transgenic Foxp3-EGFP model." BMC Biol **21**(1): 8.

Metcalf, E., D. Arik, T. Oge, D. Etiz, O. T. Yalcin, S. Kabukcuoglu, O. Pasaoglu and S. S. Ozalp (2018). "CD105 (endoglin) expression as a prognostic marker of angiogenesis in squamous cell cervical cancer treated with radical radiotherapy." J Cancer Res Ther **14**(6): 1373-1378.

Michel, T., A. Poli, A. Cuapio, B. Briquemont, G. Iserentant, M. Ollert and J. Zimmer (2016). "Human CD56bright NK Cells: An Update." J Immunol **196**(7): 2923-2931.

Miggelbrink, A. M., J. D. Jackson, S. J. Lorrey, E. S. Srinivasan, J. Waibl-Polania, D. S. Wilkinson and P. E. Fecci (2021). "CD4 T-Cell Exhaustion: Does It Exist and What Are Its Roles in Cancer?" Clin Cancer Res **27**(21): 5742-5752.

Min, B. (2018). "Spontaneous T Cell Proliferation: A Physiologic Process to Create and Maintain Homeostatic Balance and Diversity of the Immune System." Front Immunol **9**: 547.

Mittrucker, H. W., A. Visekruna and M. Huber (2014). "Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **62**(6): 449-458.

Moriyama, M. and S. Nakamura (2017). "Th1/Th2 Immune Balance and Other T Helper Subsets in IgG4-Related Disease." Curr Top Microbiol Immunol **401**: 75-83.

Mou, D., J. Espinosa, D. J. Lo and A. D. Kirk (2014). "CD28 negative T cells: is their loss our gain?" Am J Transplant **14**(11): 2460-2466.

Muroyama, Y., T. R. Nirschl, C. M. Kochel, Z. Lopez-Bujanda, D. Theodoros, W. Mao, M. A. Carrera-Haro, A. Ghasemzadeh, A. E. Marciscano, E. Velarde, A. J. Tam, C. J. Thoburn, M. Uddin, A. K. Meeker, R. A. Anders, D. M. Pardoll and C. G. Drake (2017). "Stereotactic Radiotherapy Increases Functionally Suppressive Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment." Cancer Immunol Res **5**(11): 992-1004.

Nagasaki, J., T. Ishino and Y. Togashi (2022). "Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors." Cancer Sci **113**(10): 3303-3312.

O'Brien, G., L. Cruz-Garcia, M. Majewski, J. Grepl, M. Abend, M. Port, A. Tichy, I. Sirak, A. Malkova, E. Donovan, L. Gothard, S. Boyle, N. Somaiah, E. Ainsbury, L. Ponge, K. Slosarek, L. Mischczyk, P. Widlak, E. Green, N. Patel, M. Kudari, F. Gleeson, V. Vinnikov, V. Starenkiy, S. Artiukh, L. Vasyliiev, A. Zaman and C. Badie (2018). "FDXR is a biomarker of radiation exposure in vivo." Sci Rep **8**(1): 684.

Ohki, S., M. Shibata, K. Gonda, T. Machida, T. Shimura, I. Nakamura, T. Ohtake, Y. Koyama, S. Suzuki, H. Ohto and S. Takenoshita (2012). "Circulating myeloid-derived suppressor cells are increased and correlate to immune suppression, inflammation and hypoproteinemia in patients with cancer." Oncol Rep **28**(2): 453-458.

Okada, H. and T. W. Mak (2004). "Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells." Nat Rev Cancer **4**(8): 592-603.

Pangrazzi, L., J. Reidla, J. A. Carmona Arana, E. Naismith, C. Miggitsch, A. Meryk, M. Keller, A. A. N. Krause, F. L. Melzer, K. Trieb, M. Schirmer, B. Grubeck-Loebenstein and B. Weinberger (2020). "CD28 and CD57 define four populations with distinct phenotypic properties within human CD8(+) T cells." Eur J Immunol **50**(3): 363-379.

Pape, K. A., J. J. Taylor, R. W. Maul, P. J. Gearhart and M. K. Jenkins (2011). "Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response." Science **331**(6021): 1203-1207.

Parikh, F., D. Duluc, N. Imai, A. Clark, K. Misiukiewicz, M. Bonomi, V. Gupta, A. Patsias, M. Parides, E. G. Demicco, D. Y. Zhang, S. Kim-Schulze, J. Kao, S. Gnjjatic, S. Oh, M. R. Posner and A. G. Sikora (2014). "Chemoradiotherapy-induced upregulation of PD-1 antagonizes immunity to HPV-related oropharyngeal cancer." Cancer Res **74**(24): 7205-7216.

Pawelec, G. (2019). "Is There a Positive Side to T Cell Exhaustion?" Front Immunol **10**: 111.

Pfannenstiel, L. W., C. M. Diaz-Montero, Y. F. Tian, J. Scharpf, J. S. Ko and B. R. Gastman (2019). "Immune-Checkpoint Blockade Opposes CD8(+) T-cell Suppression in Human and Murine Cancer." Cancer Immunol Res **7**(3): 510-525.

Polverini, P. J., N. J. D'Silva and Y. L. Lei (2018). "Precision Therapy of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma." J Dent Res **97**(6): 614-621.

Porta, M. D., G. M. Rigolin, E. P. Alessandrino, M. Maiocchi, L. Malcovati, L. Vanelli, C. Barate, E. Rumi, M. Ciccone, A. Cuneo, M. Lazzarino and G. Castoldi (2004). "Dendritic cell recovery after allogeneic stem-cell transplantation in acute leukemia: correlations with clinical and transplant characteristics." Eur J Haematol **72**(1): 18-25.

Rajaraman, P., M. Hauptmann, S. Bouffler and A. Wojcik (2018). "Human individual radiation sensitivity and prospects for prediction." Ann ICRP **47**(3-4): 126-141.

Raphael, I., R. R. Joern and T. G. Forsthuber (2020). "Memory CD4(+) T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases." Cells **9**(3).

Reincke, M. E., K. J. Payne, I. Harder, V. Strohmeier, R. E. Voll, K. Warnatz and B. Keller (2020). "The Antigen Presenting Potential of CD21(low) B Cells." Front Immunol **11**: 535784.

Reizis, B. (2019). "Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function." Immunity **50**(1): 37-50.

Riley, P. A. (1994). "Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation." Int J Radiat Biol **65**(1): 27-33.

Rouas, R., M. Merimi, M. Najar, N. El Zein, M. Fayyad-Kazan, M. Berehab, D. Agha, D. Bron, A. Burny, W. Rachidi, B. Badran, P. Lewalle and H. Fayyad-Kazan (2019).

"Human CD8(+) CD25 (+) CD127 (low) regulatory T cells: microRNA signature and impact on TGF-beta and IL-10 expression." J Cell Physiol **234**(10): 17459-17472.

Sakakura, K., K. Chikamatsu, K. Takahashi, T. L. Whiteside and N. Furuya (2006). "Maturation of circulating dendritic cells and imbalance of T-cell subsets in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." Cancer Immunol Immunother **55**(2): 151-159.

Salih, M. M., M. Almeahadi, A. Shafie, A. Alsharif, N. Alsiwiehri, A. El-Askary, K. Alzahrani, A. Aljuaid, O. Abdulaziz, A. A. Alrehaili, A. A. Almalki, H. S. Alzahrani, M. Halawi, S. Almalki, E. Alosimi and A. F. Gharib (2022). "Evaluation of CD4+:CD8+ Ratio in Patients With Cervical Cancer and the Levels of Inflammatory Markers." In Vivo **36**(5): 2414-2421.

Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-712.

Santin, A. D., P. L. Hermonat, J. C. Hiserodt, M. Chiriva-Internati, J. Woodliff, J. W. Theus, D. Barclay, S. Pecorelli and G. P. Parham (1997). "Effects of irradiation on the expression of major histocompatibility complex class I antigen and adhesion costimulation molecules ICAM-1 in human cervical cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys **39**(3): 737-742.

Santin, A. D., G. S. Rose, J. C. Hiserodt, J. Fruehauf, L. M. Eck, R. I. Garcia, V. Schranz, P. J. Disaia, S. Pecorelli and G. A. Granger (1996). "Effects of cytokines combined with high-dose gamma irradiation on the expression of major histocompatibility complex molecules and intercellular adhesion molecule-1 in human ovarian cancers." Int J Cancer **65**(5): 688-694.

Sato, H., E. Adachi, L. A. Lim, M. Koga, T. Koibuchi, T. Tsutsumi and H. Yotsuyanagi (2019). "CD4/CD8 ratio predicts the cellular immune response to acute hepatitis C in HIV-coinfected adults." J Infect Chemother **25**(8): 646-648.

Schmidt, M. A., C. Fortsch, M. Schmidt, T. T. Rau, R. Fietkau and L. V. Distel (2012). "Circulating regulatory T cells of cancer patients receiving radiochemotherapy may be useful to individualize cancer treatment." Radiother Oncol **104**(1): 131-138.

Schuler, P. J., M. Harasymczuk, B. Schilling, Z. Saze, L. Strauss, S. Lang, J. T. Johnson and T. L. Whiteside (2013). "Effects of adjuvant chemoradiotherapy on the frequency

and function of regulatory T cells in patients with head and neck cancer." Clin Cancer Res **19**(23): 6585-6596.

Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher and B. Fazekas de St Groth (2006). "Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells." J Exp Med **203**(7): 1693-1700.

Senthamizhchelvan, S., G. S. Pant, G. K. Rath, P. K. Julka, O. Nair, R. C. Joshi, A. Malhotra and R. M. Pandey (2007). "Biodosimetry using chromosome aberrations in human lymphocytes." Radiat Prot Dosimetry **123**(2): 241-245.

Serrano-Villar, S. and S. G. Deeks (2015). "CD4/CD8 ratio: an emerging biomarker for HIV." Lancet HIV **2**(3): e76-77.

Sheu, B. C., S. M. Hsu, H. N. Ho, R. H. Lin, P. L. Torng and S. C. Huang (1999). "Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma." Cancer **86**(8): 1537-1543.

Straub, J. M., J. New, C. D. Hamilton, C. Lominska, Y. Shnayder and S. M. Thomas (2015). "Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy." J Cancer Res Clin Oncol **141**(11): 1985-1994.

Strauss, L., C. Bergmann, W. Gooding, J. T. Johnson and T. L. Whiteside (2007). "The frequency and suppressor function of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." Clin Cancer Res **13**(21): 6301-6311.

Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal and F. Bray (2021). "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." CA Cancer J Clin **71**(3): 209-249.

Swanson, G. P., S. G. Jhavar and K. Hammonds (2020). "The effect of pelvic radiation alone on lymphocyte subgroups." Clin Transl Radiat Oncol **23**: 100-102.

Tchkonia, T., Y. Zhu, J. van Deursen, J. Campisi and J. L. Kirkland (2013). "Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities." J Clin Invest **123**(3): 966-972.

- Telesca, D., R. Etzioni and R. Gulati (2008). "Estimating lead time and overdiagnosis associated with PSA screening from prostate cancer incidence trends." *Biometrics* **64**(1): 10-19.
- Thery, C. and S. Amigorena (2001). "The cell biology of antigen presentation in dendritic cells." *Curr Opin Immunol* **13**(1): 45-51.
- Thorne, M. C. (2003). "Background radiation: natural and man-made." *J Radiol Prot* **23**(1): 29-42.
- Tsai, M. S., W. C. Chen, C. H. Lu and M. F. Chen (2019). "The prognosis of head and neck squamous cell carcinoma related to immunosuppressive tumor microenvironment regulated by IL-6 signaling." *Oral Oncol* **91**: 47-55.
- Vignard, J., G. Mirey and B. Salles (2013). "Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up." *Radiother Oncol* **108**(3): 362-369.
- Wang, Q., S. Li, S. Qiao, Z. Zheng, X. Duan and X. Zhu (2021). "Changes in T Lymphocyte Subsets in Different Tumors Before and After Radiotherapy: A Meta-analysis." *Front Immunol* **12**: 648652.
- Ward, J. F. (1988). "DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **35**: 95-125.
- Weber, C., K. U. Belge, P. von Hundelshausen, G. Draude, B. Steppich, M. Mack, M. Frankenberger, K. S. Weber and H. W. Ziegler-Heitbrock (2000). "Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations." *J Leukoc Biol* **67**(5): 699-704.
- Weiner, A. B., T. Vidotto, Y. Liu, A. A. Mendes, D. C. Salles, F. A. Faisal, S. Murali, M. McFarlane, E. L. Imada, X. Zhao, Z. Li, E. Davicioni, L. Marchionni, A. M. Chinnaiyan, S. J. Freedland, D. E. Spratt, J. D. Wu, T. L. Lotan and E. M. Schaeffer (2021). "Plasma cells are enriched in localized prostate cancer in Black men and are associated with improved outcomes." *Nat Commun* **12**(1): 935.
- Wherry, E. J. (2011). "T cell exhaustion." *Nat Immunol* **12**(6): 492-499.
- Wherry, E. J. and R. Ahmed (2004). "Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection." *J Virol* **78**(11): 5535-5545.

Wherry, E. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, R. van der Most and R. Ahmed (2003). "Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment." J Virol **77**(8): 4911-4927.

Wherry, E. J. and M. Kurachi (2015). "Molecular and cellular insights into T cell exhaustion." Nat Rev Immunol **15**(8): 486-499.

Whiteside, T. L., M. Mandapathil, M. Szczepanski and M. Szajnik (2011). "Mechanisms of tumor escape from the immune system: adenosine-producing Treg, exosomes and tumor-associated TLRs." Bull Cancer **98**(2): E25-31.

Widlak, P., K. Jelonek, A. Wojakowska, M. Pietrowska, J. Polanska, L. Marczak, L. Miszczyk and K. Skladowski (2015). "Serum Proteome Signature of Radiation Response: Upregulation of Inflammation-Related Factors and Downregulation of Apolipoproteins and Coagulation Factors in Cancer Patients Treated With Radiation Therapy--A Pilot Study." Int J Radiat Oncol Biol Phys **92**(5): 1108-1115.

Wong, K. L., J. J. Tai, W. C. Wong, H. Han, X. Sem, W. H. Yeap, P. Kourilsky and S. C. Wong (2011). "Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets." Blood **118**(5): e16-31.

Wong, K. L., W. H. Yeap, J. J. Tai, S. M. Ong, T. M. Dang and S. C. Wong (2012). "The three human monocyte subsets: implications for health and disease." Immunol Res **53**(1-3): 41-57.

Wu, Z., Y. Zheng, J. Sheng, Y. Han, Y. Yang, H. Pan and J. Yao (2022). "CD3(+)/CD4(-)/CD8(-) (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer." Front Immunol **13**: 816005.

Wynn, T. A. (2008). "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis." J Pathol **214**(2): 199-210.

Xu, L., D. Yao, J. Tan, Z. He, Z. Yu, J. Chen, G. Luo, C. Wang, F. Zhou, X. Zha, S. Chen and Y. Li (2018). "Memory T cells skew toward terminal differentiation in the CD8+ T cell population in patients with acute myeloid leukemia." J Hematol Oncol **11**(1): 93.

Xu, L. P., X. H. Luo, Y. J. Chang, D. H. Liu, K. Y. Liu, Y. H. Chen and X. J. Huang (2009). "High CD4/CD8 ratio in allografts predicts adverse outcomes in unmanipulated

HLA-mismatched/haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia." Ann Hematol **88**(10): 1015-1024.

Yamamoto, T., T. Kimura, E. Ueta, Y. Tatemoto and T. Osaki (2003). "Characteristic cytokine generation patterns in cancer cells and infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinomas and the influence of chemoradiation combined with immunotherapy on these patterns." Oncology **64**(4): 407-415.

Yang, C., H. Cheng, Y. Zhang, K. Fan, G. Luo, Z. Fan, Q. Huang, Y. Lu, K. Jin, Z. Wang, X. Yu and C. Liu (2018). "Anergic natural killer cells educated by tumor cells are associated with a poor prognosis in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma." Cancer Immunol Immunother **67**(12): 1815-1823.

Yatim, K. M. and F. G. Lakkis (2015). "A brief journey through the immune system." Clin J Am Soc Nephrol **10**(7): 1274-1281.

Young, M. R., M. A. Wright, Y. Lozano, J. P. Matthews, J. Benefield and M. M. Prechel (1996). "Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer." Int J Cancer **67**(3): 333-338.

Yu, N., X. Li, W. Song, D. Li, D. Yu, X. Zeng, M. Li, X. Leng and X. Li (2012). "CD4(+)CD25 (+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood." Inflammation **35**(6): 1773-1780.

Yuan, X. K., X. K. Zhao, Y. C. Xia, X. Zhu and P. Xiao (2011). "Increased circulating immunosuppressive CD14(+)HLA-DR(-/low) cells correlate with clinical cancer stage and pathological grade in patients with bladder carcinoma." J Int Med Res **39**(4): 1381-1391.

Zaorsky, N. G., B. J. Davis, P. L. Nguyen, T. N. Showalter, P. J. Hoskin, Y. Yoshioka, G. C. Morton and E. M. Horwitz (2017). "The evolution of brachytherapy for prostate cancer." Nat Rev Urol **14**(7): 415-439.

Zawada, A. M., K. S. Rogacev, B. Rotter, P. Winter, R. R. Marell, D. Fliser and G. H. Heine (2011). "SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset." Blood **118**(12): e50-61.

Zhang, N. and M. J. Bevan (2011). "CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system." Immunity **35**(2): 161-168.

Zhao, C., H. Zhang, W. C. Wong, X. Sem, H. Han, S. M. Ong, Y. C. Tan, W. H. Yeap, C. S. Gan, K. Q. Ng, M. B. Koh, P. Kourilsky, S. K. Sze and S. C. Wong (2009).

"Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods." J Proteome Res **8**(8): 4028-4038.

Ziegler-Heitbrock, L. (2007). "The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation." J Leukoc Biol **81**(3): 584-592.

Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn and M. B. Lutz (2010).

"Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood." Blood **116**(16): e74-80.

Zwang, N. A., B. B. Ganesh, K. T. Cardenas, A. S. Chong, P. W. Finn and D. L. Perkins (2018). "An optimized protocol to quantify signaling in human transitional B cells by phospho flow cytometry." J Immunol Methods **463**: 112-121.

9. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

1. Balazs, K., E. Kis, C. Badie, E. N. Bogdandi, S. Candeias, L. C. Garcia, I. Dominczyk, B. Frey, U. Gaipl, Z. Juranyi, Z. S. Kocsis, E. A. Rutten, G. Safrany, P. Widlak and K. Lumniczky (2019). "Radiotherapy-Induced Changes in the Systemic Immune and Inflammation Parameters of Head and Neck Cancer Patients." Cancers (Basel) **11**(9).
2. Balazs, K., L. Antal, G. Safrany and K. Lumniczky (2021). "Blood-Derived Biomarkers of Diagnosis, Prognosis and Therapy Response in Prostate Cancer Patients." J Pers Med **11**(4).
3. Balazs, K., Z. S. Kocsis, P. Agoston, K. Jorgo, L. Gesztesi, G. Farkas, G. Szekely, Z. Takacs-Nagy, C. Polgar, G. Safrany, Z. Juranyi and K. Lumniczky (2022). "Prostate Cancer Survivors Present Long-Term, Residual Systemic Immune Alterations." Cancers (Basel) **14**(13).

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

1. Lukacsi, S., T. Gerecsei, K. Balazs, B. Francz, B. Szabo, A. Erdei and Z. Bajtay (2020). "The differential role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in the adherence, migration and podosome formation of human macrophages and dendritic cells under inflammatory conditions." PLoS One **15**(5): e0232432.
2. Kis, D., I. B. Csordas, E. Persa, B. Jezso, R. Hargitai, T. Szatmari, N. Sandor, E. Kis, K. Balazs, G. Safrany and K. Lumniczky (2022). "Extracellular Vesicles Derived from Bone Marrow in an Early Stage of Ionizing Radiation Damage Are Able to Induce Bystander Responses in the Bone Marrow." Cells **11**(1).
3. Moquet, J., E. Ainsbury, K. Balazs, S. Barnard, R. Hristova, K. Lumniczky, M. Port, U. Roessler, H. Scherthan, A. Staynova, T. Szatmari, M. Wojewodzka and M. Abend (2023). "RENEB Inter-Laboratory Comparison 2021: The Gamma-H2AX Foci Assay." Radiat Res **199**(6): 591-597.
4. Port, M., J. F. Barquinero, D. Endesfelder, J. Moquet, U. Oestreicher, G. Terzoudi, F. Trompier, A. Vral, Y. Abe, L. Ainsbury, L. Alkebsi, S. A. Amundson, C. Badie, A. Baeyens, A. S. Balajee, K. Balazs, S. Barnard, C. Bassinet, L. A. Beaton-Green, C. Beinke, L. Bobyk, P. Brochard, K. Brzoska, M. Bucher, B. Ciesielski, C. Cuceu,

- M. Discher, D. O. MC, I. Dominguez, S. Doucha-Senf, A. Dumitrescu, P. N. Duy, F. Finot, G. Garty, S. A. Gandhi, E. Gregoire, V. S. T. Goh, I. Guclu, L. Hadjiiska, R. Hargitai, R. Hristova, K. Ishii, E. Kis, M. Juniewicz, R. Kriehuber, J. Lacombe, Y. Lee, M. Lopez Riego, K. Lumniczky, T. T. Mai, N. Maltar-Strmecki, M. Marrale, J. S. Martinez, A. Marciniak, N. Maznyk, S. W. S. McKeever, P. K. Meher, M. Milanova, T. Miura, O. Monteiro Gil, A. Montoro, M. Moreno Domene, A. Mrozik, R. Nakayama, G. O'Brien, D. Oskamp, P. Ostheim, J. Pajic, N. Pastor, C. Patrono, M. Pujol-Canadell, M. J. Prieto Rodriguez, M. Repin, A. Romanyukha, U. Rössler, L. Sabatier, A. Sakai, H. Scherthan, S. Schule, K. M. Seong, O. Sevriukova, S. Sholom, S. Sommer, Y. Suto, T. Sypko, T. Szatmari, M. Takahashi-Sugai, K. Takebayashi, A. Testa, I. Testard, A. Tichy, S. Triantopoulou, N. Tsuyama, M. Unverricht-Yeboah, M. Valente, O. Van Hoey, R. C. Wilkins, A. Wojcik, M. Wojewodzka, L. Younghyun, D. Zafiroopoulos and M. Abend (2023). "RENEB Inter-Laboratory Comparison 2021: Inter-Assay Comparison of Eight Dosimetry Assays." *Radiat Res* 199(6): 535-555.
5. Vral, A., D. Endesfelder, K. Balazs, C. Beinke, C. Cuceu Petrenci, F. Finot, G. Garty, L. Hadjiiska, R. Hristova, I. Ivanova, Y. Lee, K. Lumniczky, M. Milanova, O. Monteiro Gil, U. Oestreicher, J. Pajic, C. Patrono, N. D. Pham, G. Perletti, K. M. Seong, S. Sommer, T. Szatmari, A. Testa, A. Tichy, T. M. Tran, R. Wilkins, M. Port, M. Abend and A. Baeyens (2023). "RENEB Inter-Laboratory Comparison 2021: The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay." *Radiat Res* 199(6): 571-582.
6. Szatmari, T., K. Balazs, I. B. Csordas, G. Safrany and K. Lumniczky (2023). "Effect of radiotherapy on the DNA cargo and cellular uptake mechanisms of extracellular vesicles." *Strahlenther Onkol*.

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban témavezetőmnek, Dr. Lumniczky Katalinnak, akinek nagyra becsült szakmai tudása és széleskörű látásmódja formálta az én szakmai látásmódomat is, segítségére munkám, és a disszertáció készítése során is mindig számíthattam, és sokat tanulhattam tőle.

Szeretném megköszönni opponensemnek, Dr. Szarka Eszternek, hogy rendkívüli alapossággal tanulmányozta át a dolgozatomat, kritikai észrevételei és építő jellegű kérdései segítségemre voltak.

Szeretnék köszönetet mondani a Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központnak, és Dr. Sáfrány Géza főosztályvezető főorvos Úrnak a tanulmányaimhoz, és szakmai továbbképzéseimhez nyújtott eszközi és anyagi támogatásért, amellyel hozzájárult a doktori tanulmányaim sikerességéhez.

Szeretném megköszönni a sikeres együttműködést a kollaboráns intézetek (Maria Skłodowska-Curie Rákkutató Intézet, Országos Onkológiai Intézet) munkatársainak, kiemelve Dr. Jurányi Zsolt és Dr. Kocsis S. Zsuzsa (OOI munkatársak) éveken át tartó áldozatos munkáját, és a prosztatata daganatos beteg minták biztosítását, amely nélkül ez a dolgozat nem valósulhatott volna meg.

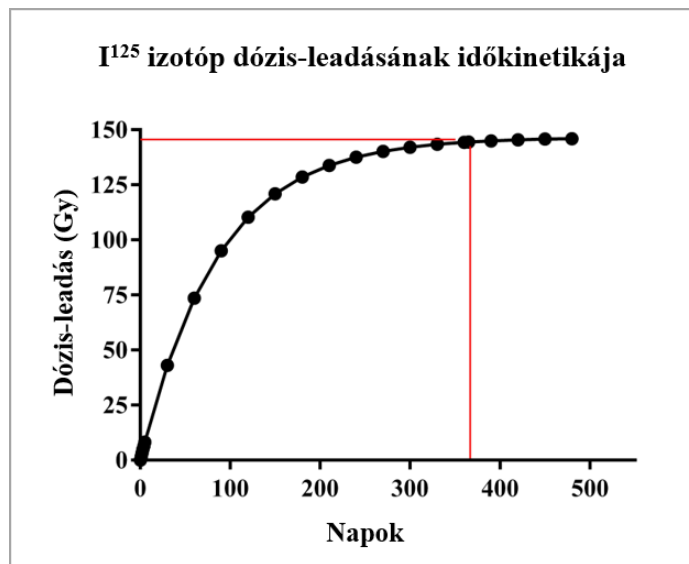
Minden valaha volt és jelenlegi kollégámnak, Csordás Ilonának, Erdélyi Renátának, Forgács Martinának, Győryné Galgand Kingának, Dr. Hargitai Ritnak, Kis Dávidnak, Kis Enikőnek, Dr. Persa Eszternek, Dr. Szatmári Tündének és Dr. Sándor Nikolettnek hálával tartozom, akik szakmai és lelki támogatására mindig számíthattam.

Szeretném megköszönni az Európai Sugárkutató Társaság (European Radiation Research Society) Fiatal Kutatói Díj formájában kifejezett szakmai elismerését, amellyel jelen tanulmány eredményeit jutalmazta.

Végül, de nem utolsó sorban óriási hálával tartozom az egész családomnak, legfőképpen Szüleimnek és Férjemnek, akik végtelennek tűnő türelmükkel, biztatásukkal, és támogatásukkal mindvégig mögöttem álltak, és óriási lelkitámaszt nyújtottak a doktori képzésem alatt is.

Függelék

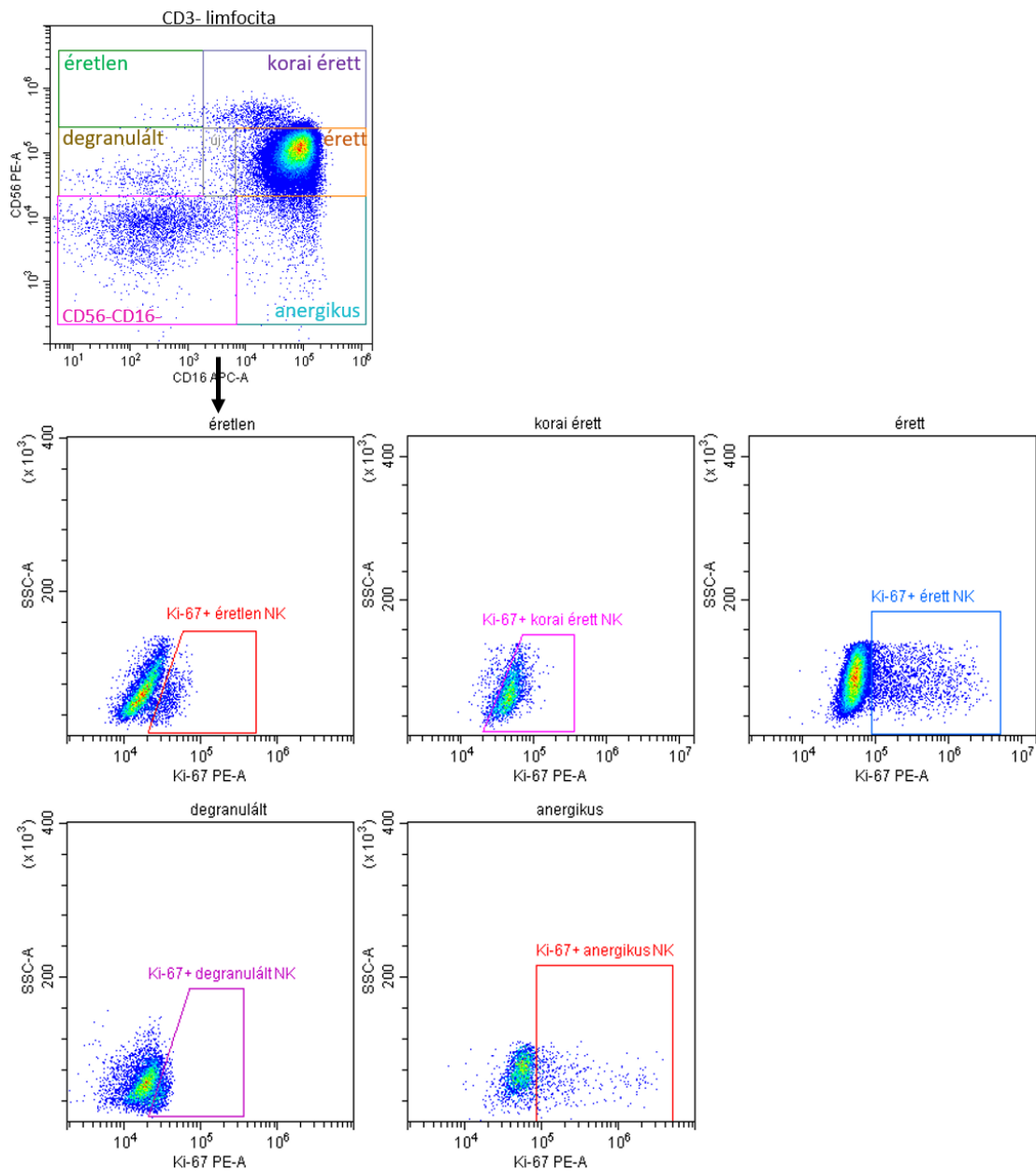
Az LDR terápia során alkalmazott jódiótop dózis-leadásának időkinetikája



Függelék 1. ábra: Az alacsony dózisirátájú brachyterápia (LDR) során alkalmazott ¹²⁵I izotóp dózis-leadásának időkinetikája. A piros vonalak jelzik, hogy a teljes dózis (145 Gy) körülbelül 365 nappal a sugárforrás beültetése után kerül leadásra a prosztata szövetébe. Forrás: (Balazs, Kocsis et al. 2022).

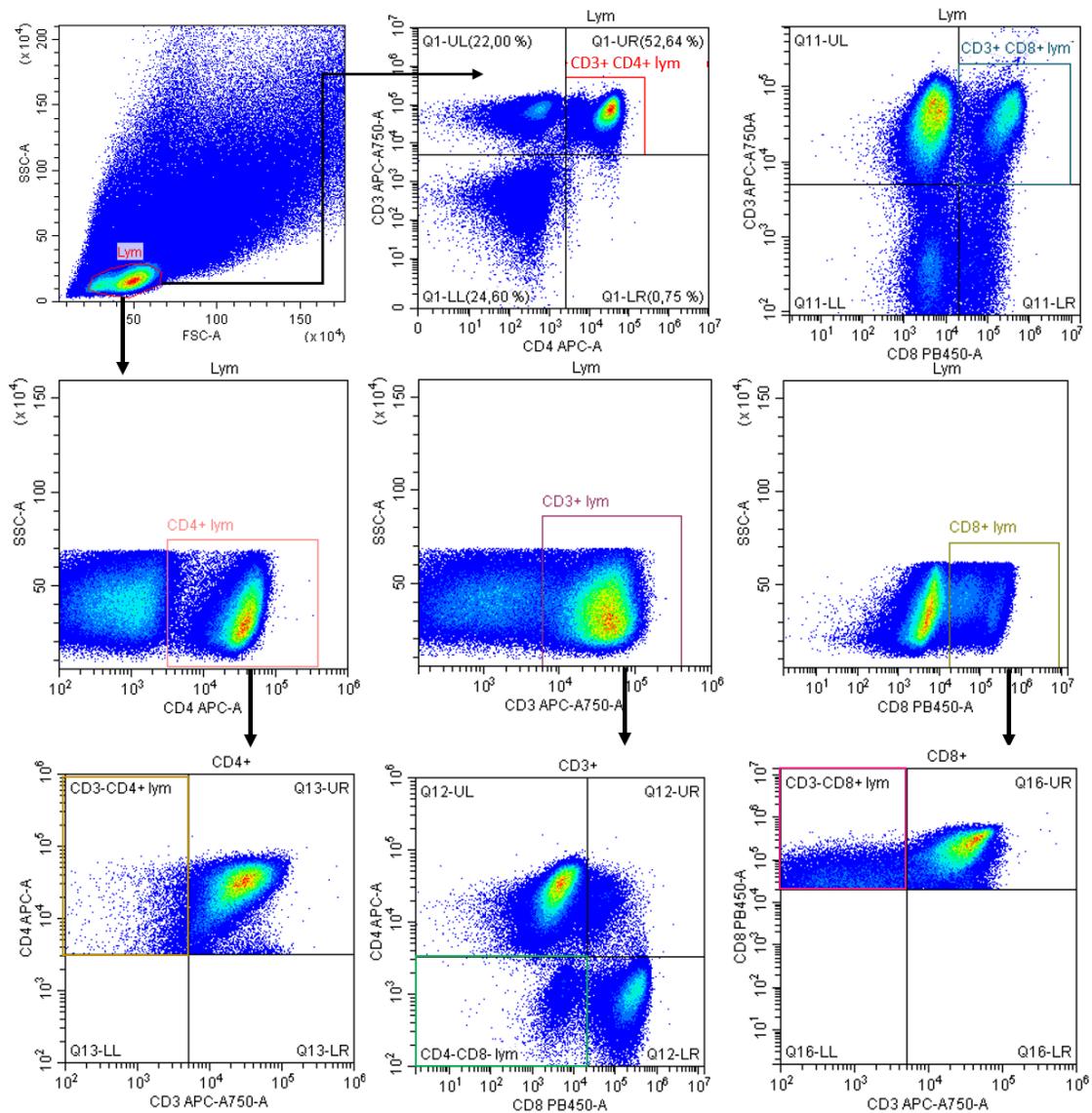
Osztódó természetes ölüsejtek kapuzása

A természetes ölüsejtek alcsoportjainak osztódási kinetikáját a Ki67 marker expressziójával határoztuk meg. A Ki67 fehérje a G0 fázis kivételével a sejtciklus minden fázisában kifejeződik a sejtmagban, így expressziójának mérésével következtethetünk a sejtosztódás tényére és mértékére. Az NK sejtek alcsoportjaiban a Ki67+, azaz osztódó frakciót különítettük el a Ki67- (nyugvó) állapotú alakoktól.



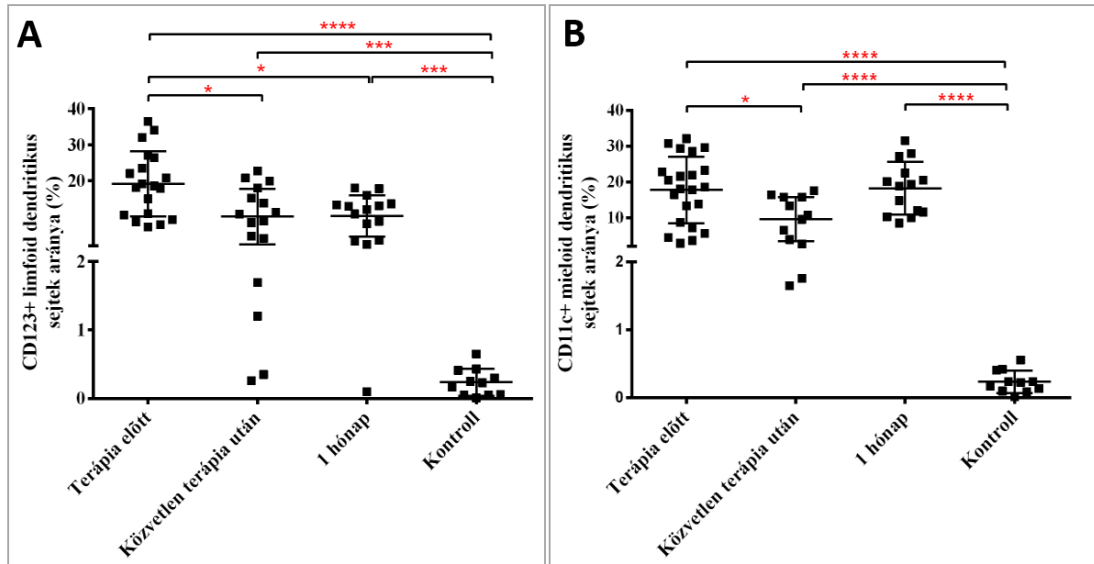
Függelék 2. ábra: A természetes ölösejtek als csoportjainak osztódási arányát a Ki67 marker expressziójával határoztuk meg. Forrás: saját ábra.

A CD3+, CD4+ és CD8+ T limfocita alcsoportok kapuzása



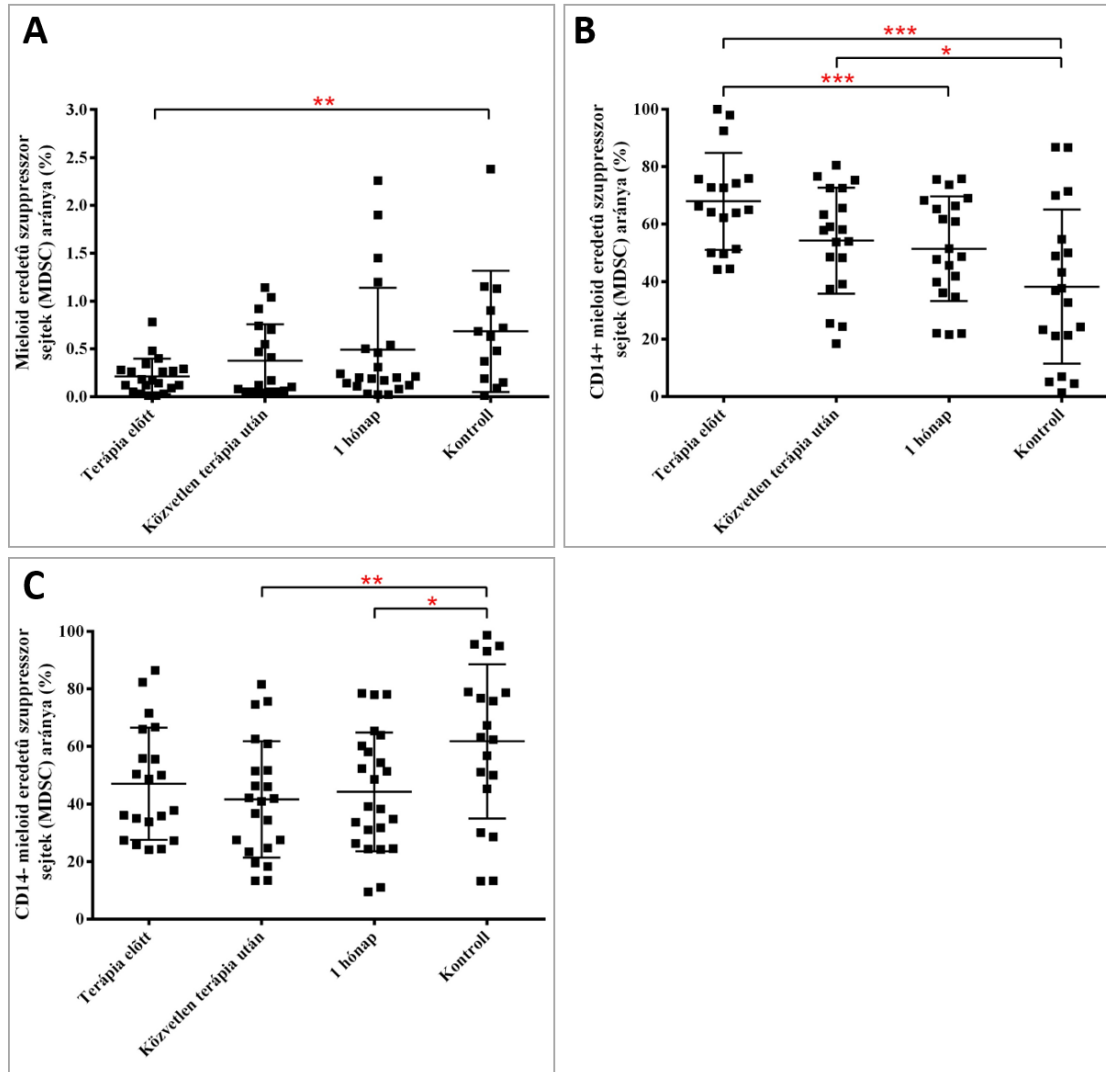
Függelék 3. ábra: CD3+, CD4+ és CD8+ T limfocita alcsoportok kapuzását a teljes limfocita csoporton belül végeztük. Meghatároztuk továbbá a CD4-CD8- dupla negatív T limfocitákat a CD3+ csoporton belül, illetve a CD4+ és CD8+ limfocitákon belüli CD3- limfocita arányt. Forrás: saját ábra.

Mieloid és limfoid eredetű dendritikus sejtek változása intenzitás modulált sugárterápiával kezelt fej-nyaki daganatos betegekben



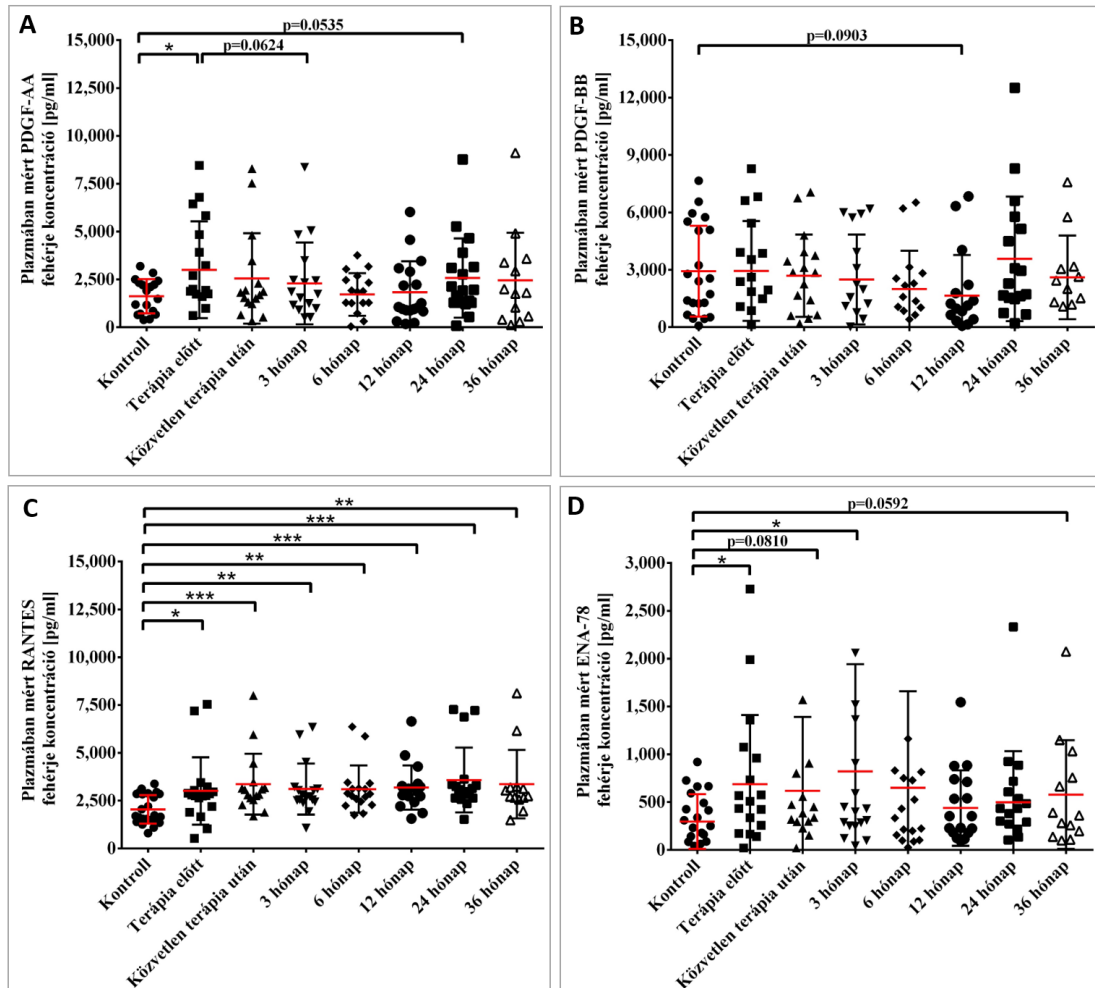
Függelék 4. ábra: Intenzitás modulált sugárterápiával kezelt fej-nyaki daganatos betegek (n=23) perifériás vérében keringő CD123+ limfoid (A) és CD11c+ mieloid eredetű (B) dendritikus sejtek frakciója szignifikánsan megemelkedett már a kezelés előtt a kontrollhoz képest, és emelkedett szinten maradt egy hónappal később is. A betegekben mért változásokat kontroll csoport (n=15) értékeihez is viszonyítottuk. Szignifikáns változásokat a piros csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). A vízszintes vonal a csoport átlagát, míg a függőleges vonal az adatsor szórását jelzi. Forrás: (Balazs, Kis et al. 2019).

Mieloid eredetű szuppresszor sejtek változása intenzitás modulált sugárterápiával kezelt fej-nyaki daganatos betegekben



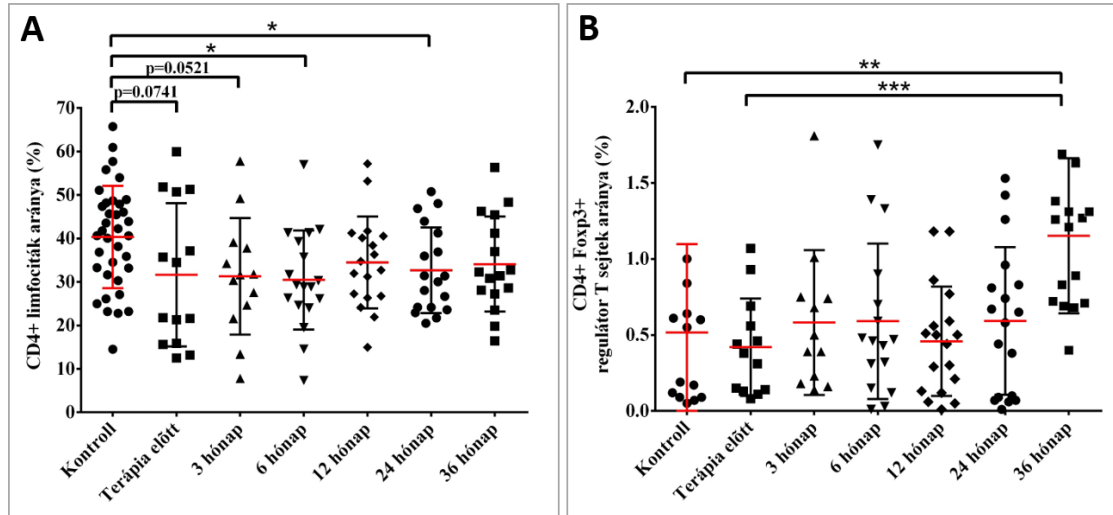
Függelék 5. ábra: Intenzitás modulált sugárterápiával kezelt fej-nyaki daganatos betegek (n=23) mieloid eredetű szuppresszor sejtjeinek aránya szignifikánsan lecsökkent kezelés előtt, és alacsony szinten maradt a nyomon követés ideje alatt (A). A CD14+ MDSC alcsoport szignifikáns növekedést, míg a CD14- alcsoport szignifikáns csökkenést mutatott a betegekben a kontroll csoporthoz képest. A betegekben mért változásokat kontroll csoport (n=15) értékeihez is viszonyítottuk. Szignifikáns változásokat a piros csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). A vízszintes vonal a csoport átlagát, míg a függőleges vonal az adatsor szórását jelzi. Forrás: (Balazs, Kis et al. 2019).

Fehérjék koncentrációjának változása kezelés előtti és utáni időpontokban ELISA technika segítségével a HDR betegcsoportban



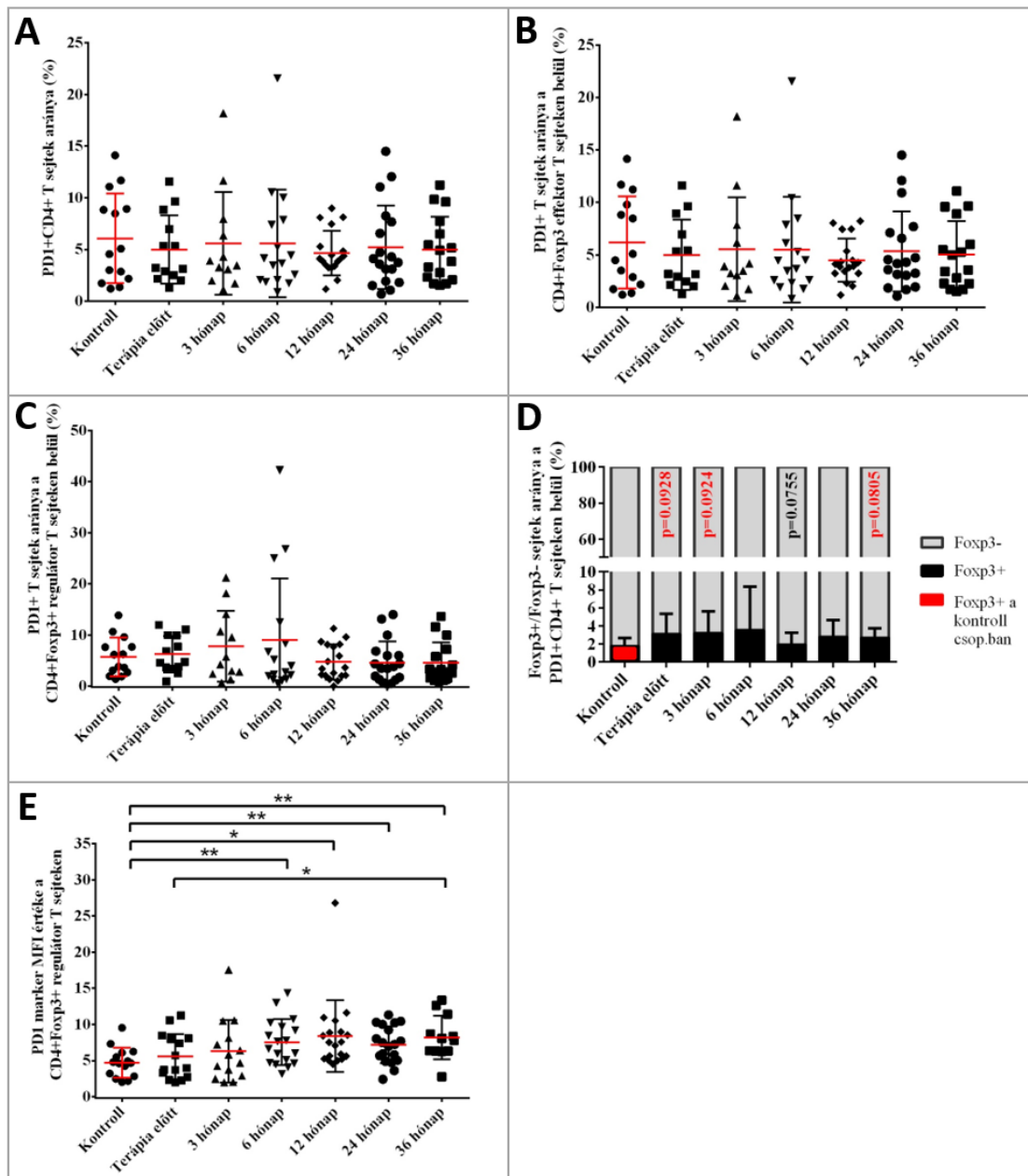
Függelék 6. ábra: A magas dózisirátájú brachyterápiában (HDR) részesült prosztata daganatos betegek egy csoportjában (n=18) szignifikánsan megemelkedett a PDGF-AA (A), RANTES (C), és ENA-78 (D) fehérjék koncentrációja a terápia előtti időpontban a kontrollhoz képest, majd szintjük a RANTES kivételével részben normalizálódott. A PDGF-BB szintje nem változott szignifikánsan a betegekben a kontrollhoz képest (B). Az eredményeket ELISA technika segítségével kaptuk. Szignifikáns változásokat a csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). A piros vízszintes vonal a csoport átlagát, míg a függőleges vonal az adatsor szórását jelzi. Forrás: saját ábra.

A CD4+ T limfociták és FoxP3+ regulátor T limfociták változása az LDR betegcsoportban



Függelék 7. ábra: Az alacsony dózistrátájú brachyterápiában (LDR) részesült prosztata daganatos betegek egy csoportjában (n=21) szignifikánsan lecsökkent a CD4+ T limfociták frakciója 24 hónappal a terápia után, és szintjük nem normalizálódott 3 évvel később sem (A). A CD4+FoxP3+ regulátor T sejtek aránya 36 hónappal a kezelést követően nőtt meg szignifikánsan mind a kontroll, mind a kezelés előtti értékhez képest (B). A betegekben mért változásokat kontroll csoport (n=24) értékeihez is viszonyítottuk. Szignifikáns változásokat a csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). A piros vízszintes vonal a csoport átlagát, míg a függőleges vonal az adatsor szórását jelzi. Forrás: (Balazs, Kocsis et al. 2022).

T limfociták funkcionális integritásának és proliferációs kapacitásának változása az LDR betegcsoportban

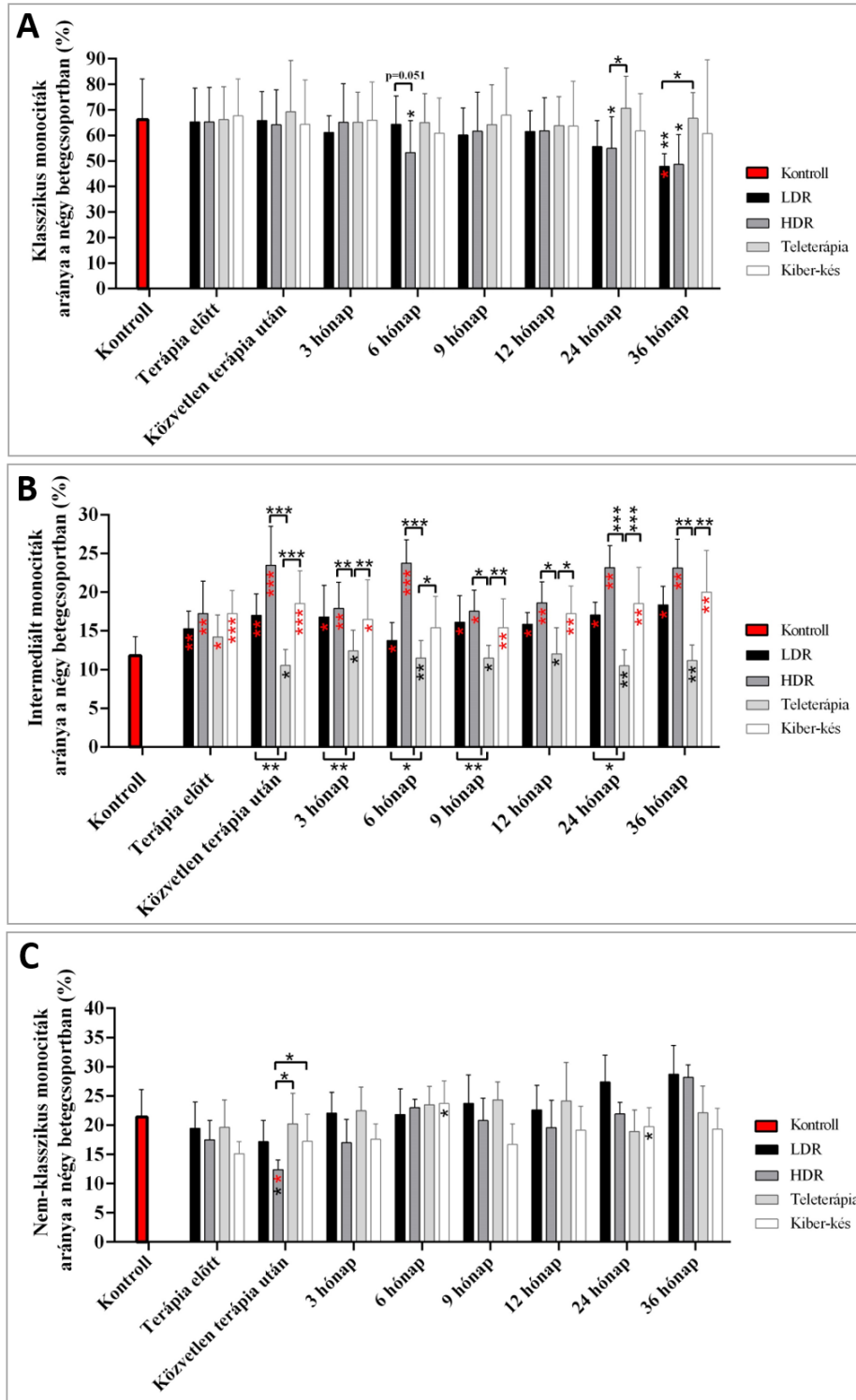


Függelék 8. ábra: Az alacsony dóziszrátájú brachyterápiában (LDR) részesült prosztata daganatos betegek egy csoportjában (n=21) nem változott szignifikánsan a PD1+CD4+ T sejtek (A), a PD1+ effektor T sejtek (B) és a PD1+ regulátor T sejtek (C) frakciója a kontroll csoporthoz képest. A FoxP3+ sejtek aránya csak enyhén, nem szignifikáns mértékben emelkedett a betegekben (D), azonban a PD1 marker expressziós szintje (MFI) kezelést követően a 6-dik hónaptól szignifikánsan megemelkedett (E). A betegekben mért változásokat kontroll csoport (n=24) értékeihez is viszonyítottuk.

Szignifikáns változásokat a csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). A piros vízszintes vonal a csoport átlagát, míg a függőleges vonal az adatsor szórását jelzi.

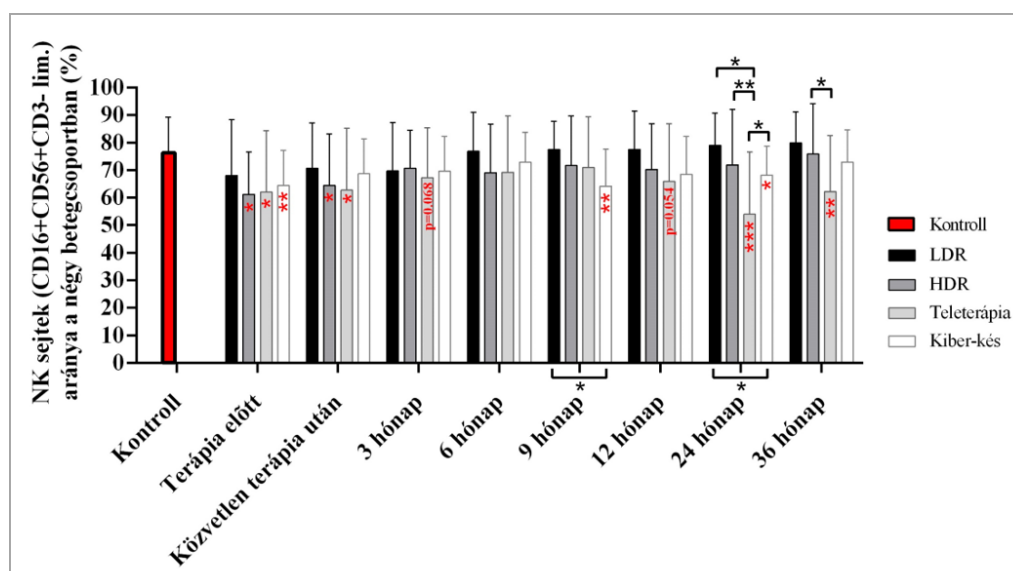
Forrás: (Balazs, Kocsis et al. 2022).

Monocita alcsoportok változása a négy betegcsoportban



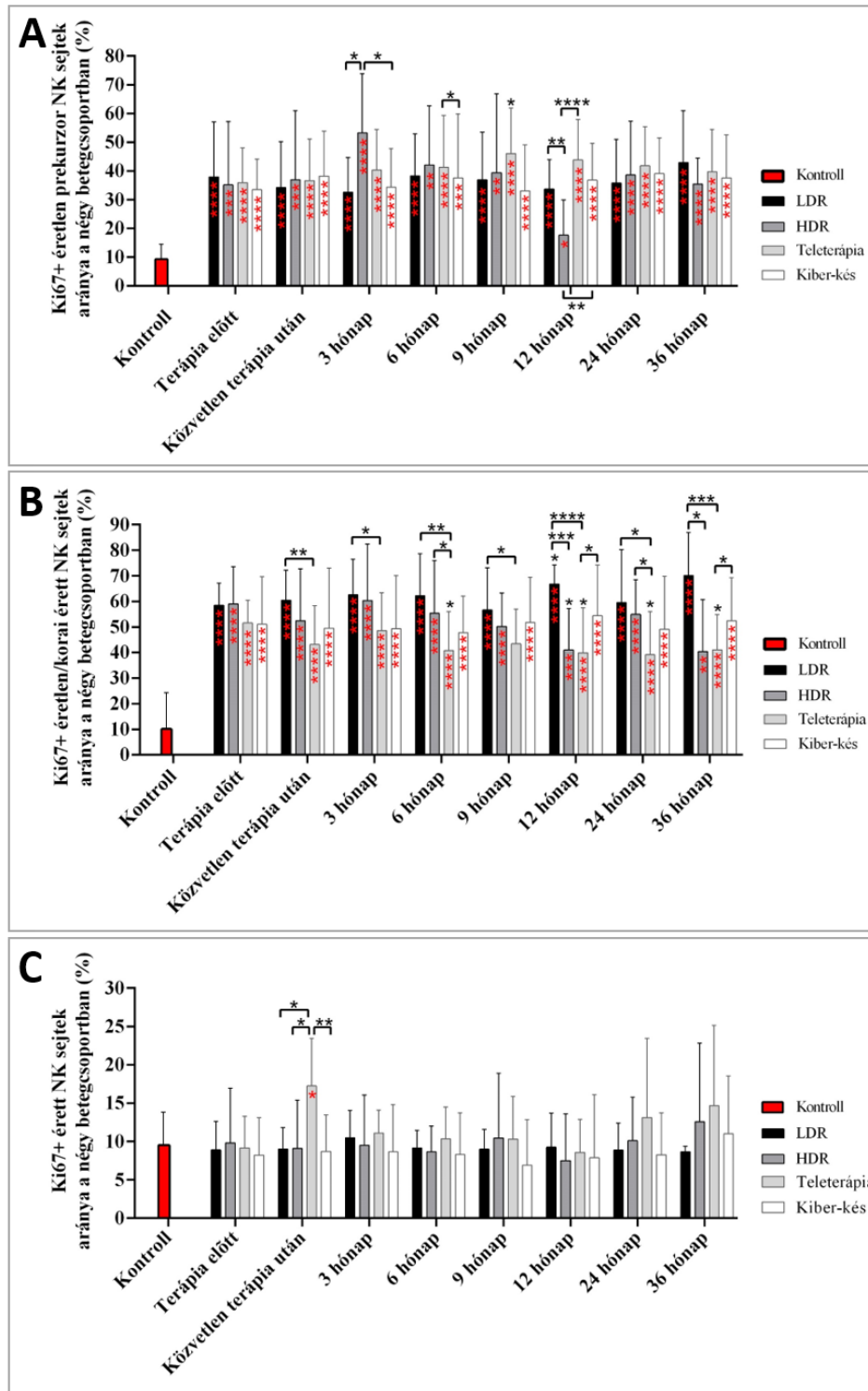
Függelék 9. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) csökkenő tendenciájú klasszikus (A) és nem-klasszikus (C), illetve szignifikánsan növekvő arányú intermediált monociták (B) csoportját detektáltuk a nyomon követés ideje alatt. Az oszlopok az adatsor átlagát jelzik és függőleges vonal jelzik az adatsorok szórását. A kontrollhoz viszonyított szignifikáns változásokat piros, míg a kezelés előtti értékhez viszonyított szignifikáns változásokat fekete csillagok jelölik. A vízszintes irányú kapocs jelzi a csoportok közötti szignifikáns különbséget (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Forrás: saját ábra.

NK sejtek változása a négy betegcsoportban



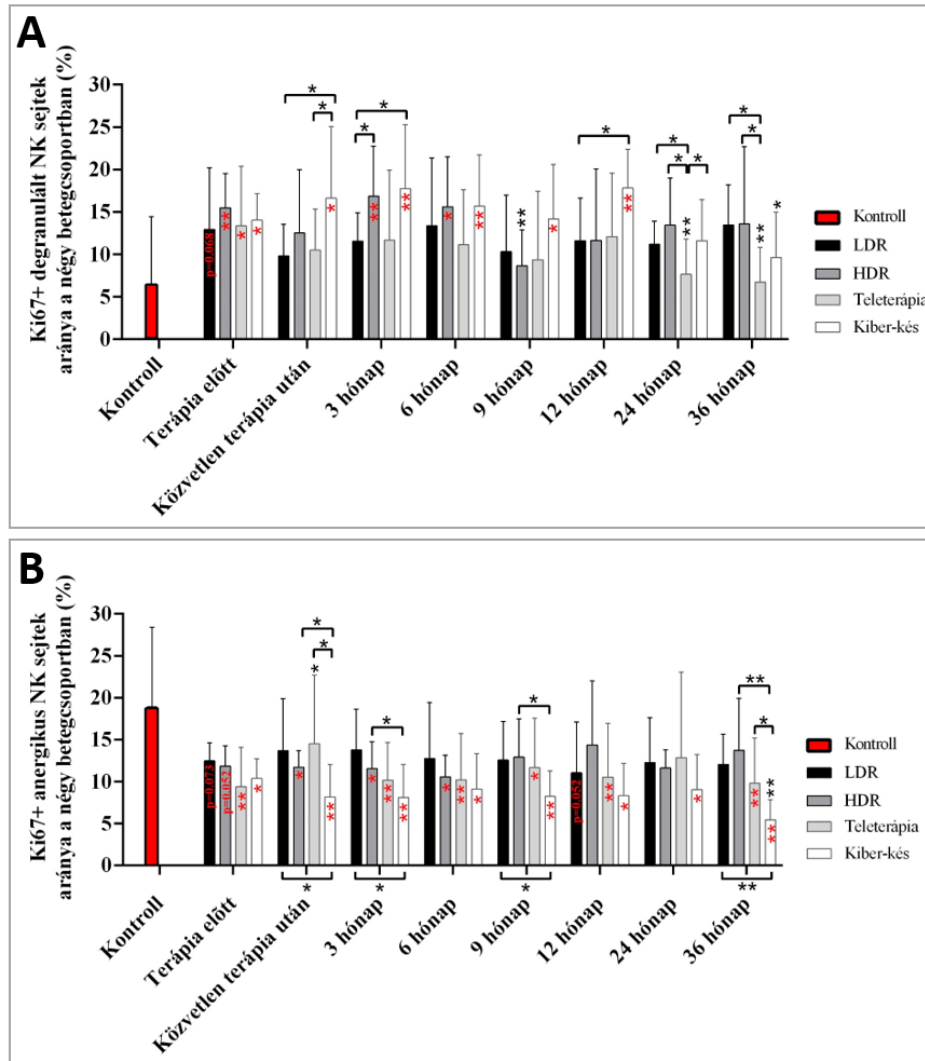
Függelék 10. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) lecsökkent a CD3-CD16+CD56+ NK sejtek frakciója a korai időpontokban a kontrollhoz képest, majd átmeneti normalizálódás után 24, illetve 36 hónappal a kezelést követően újra szignifikánsan lecsökkent a szintje a teleterápiás és Kiber-kés terápiás csoportban. Csak az LDR beteg csoportban nem történt szignifikáns mértékű változás. A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Forrás: saját ábra.

Osztódó NK sejtek változása a négy betegcsoportban



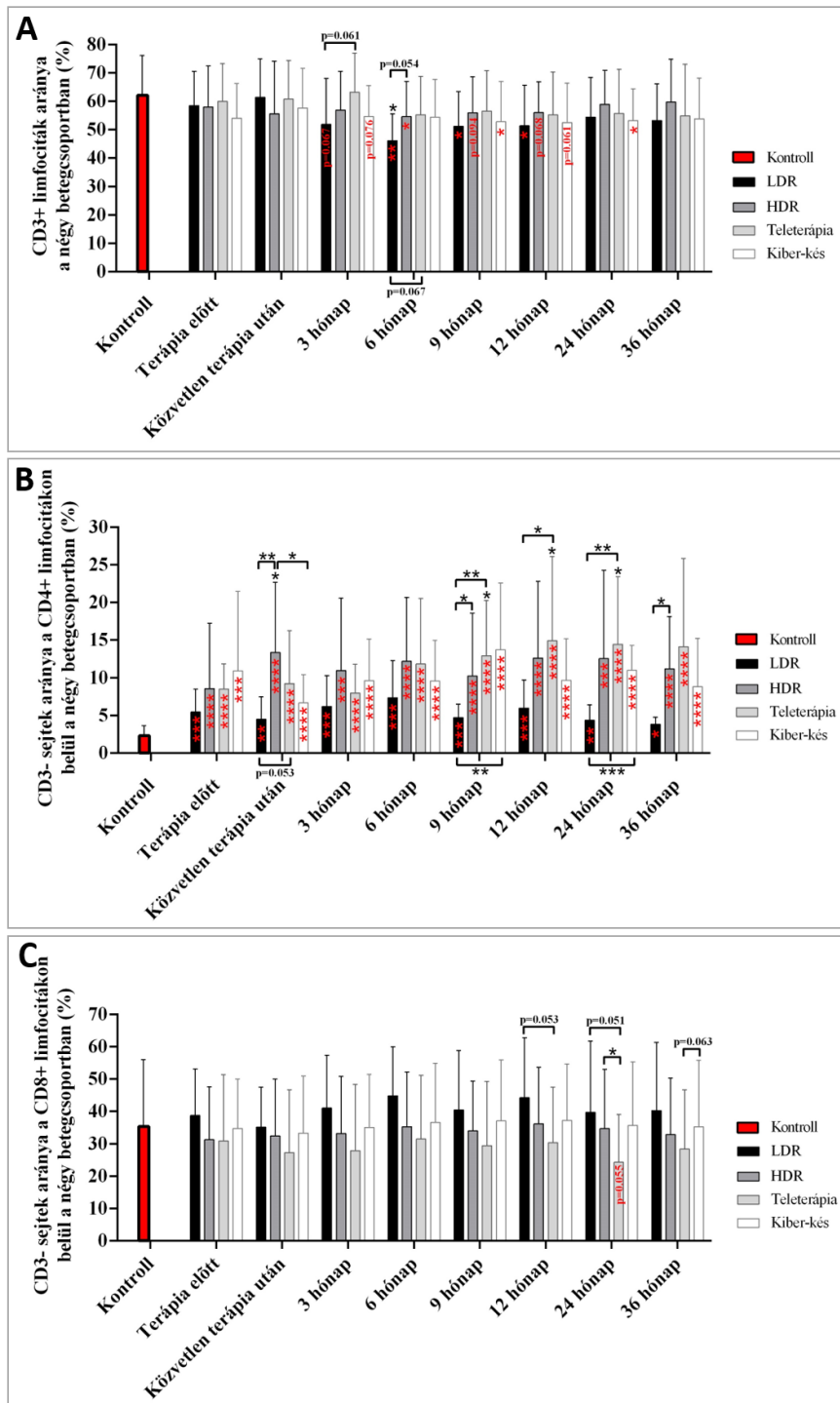
Függelék 11. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) szignifikánsan megemelkedett a Ki67+ osztódó éretlen prekursor (A) és az osztódó éretlen/korai érett NK sejtek frakciója (B), míg a Ki67+ érett, citotoxikus NK sejtek

aránya (C) nem változott a betegekben a kontrollhoz képest. A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Forrás: saját ábra.



Függelék 12. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: $n=10$; HDR: $n=10$; teleterápiás: $n=20$; Kiber-kés terápiás: $n=15$) szignifikánsan megemelkedett a Ki67+ osztódó degranulált NK sejtek aránya (A), míg szignifikánsan lecsökkent az osztódó anergikus NK sejtek frakciója (B) a betegekben a kontrollhoz képest. A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). Forrás: saját ábra.

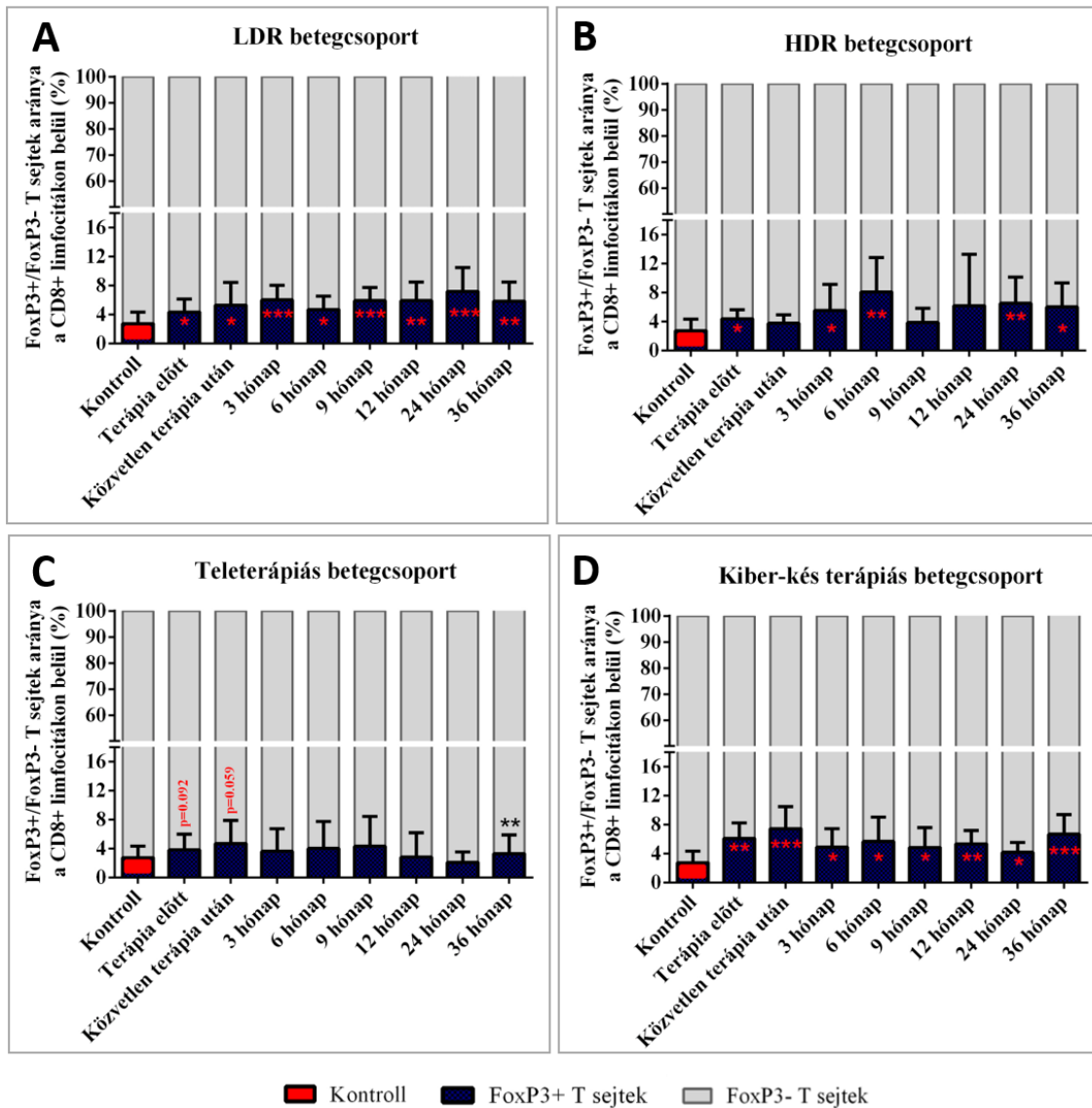
CD3- sejtek aránya a négy betegcsoportban a CD8+ T limfociták csoportján belül



Függelék 13. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) nem változott szignifikánsan a CD3+ limfociták aránya a betegekben kezelés előtt és 36 hónappal a terápia után sem (A), azonban erőteljes, szignifikáns növekedést mutatott a

CD3- aberráns sejtek aránya a CD4+ limfociták csoportján belül a nyomon követés teljes ideje alatt (B). A CD3- sejtek frakciója a CD8+ limfocitákon belül kontroll körülmények között mozgott a betegekben (C). A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$).
 Forrás: saját ábra.

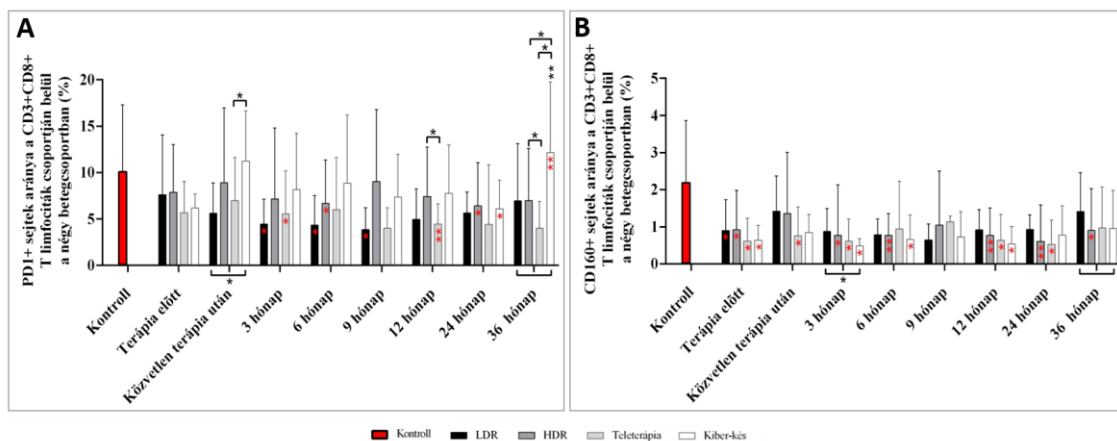
A FoxP3+/FoxP3- arány a négy betegcsoportban a CD8+ T limfocita csoporton belül



Függelék 14. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos betegcsoport (LDR: n=10; HDR: n=10; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápia: n=15) mindegyikében szignifikánsan megnőtt a FoxP3+ sejtek aránya a CD8+ T limfociták csoportján belül már kezelés előtt (a teleterápiás csoportban gyenge szignifikáns növekedést kaptunk), és ezen a magas szinten maradt a nyomon követés teljes ideje

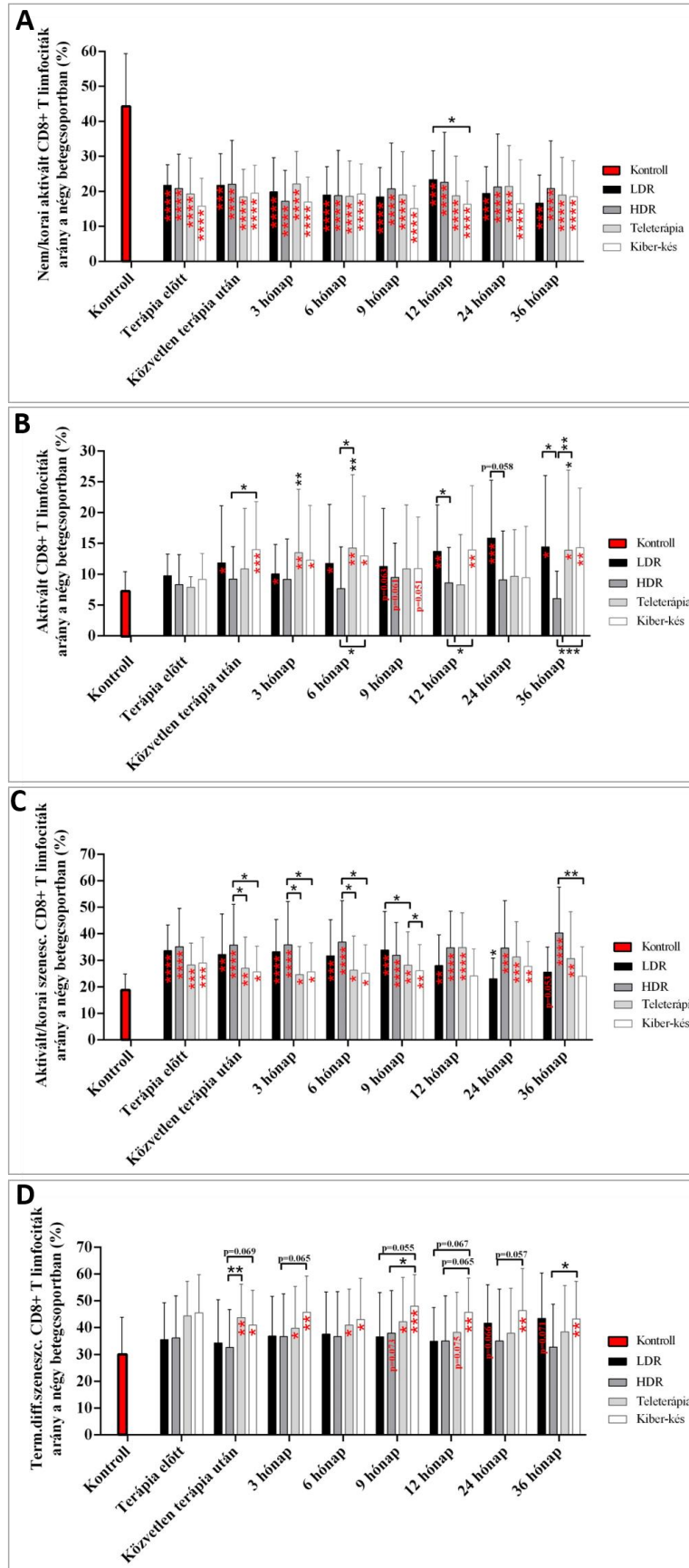
alatt. A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Forrás: saját ábra.

Kifáradt T limfociták változása a négy betegcsoportban



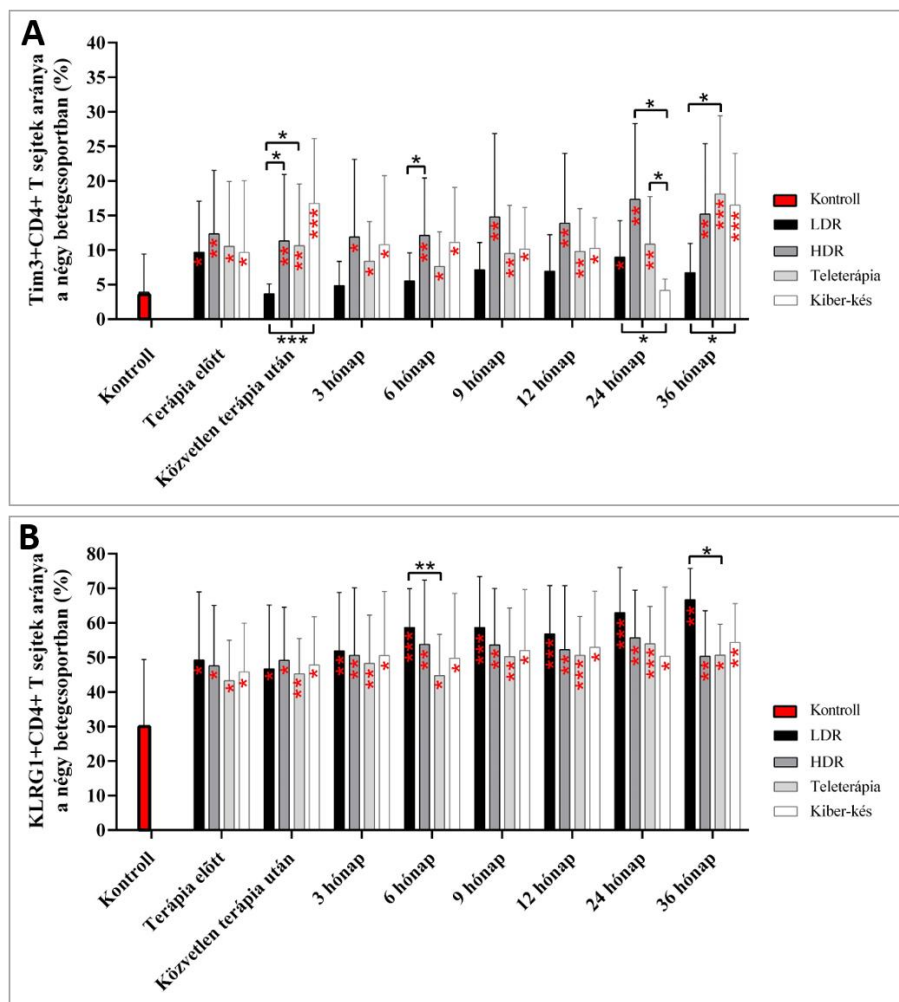
Függelék 15. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: $n=10$; HDR: $n=10$; teleterápiás: $n=20$; Kiber-kés terápia: $n=15$) vizsgáltuk az „immunológiai kifáradást” jelző sejtfelszíni receptorokat a CD8+ T limfociták felszínén. A PD1+CD8+ T limfociták frakciója szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll csoporthoz képest az LDR és a teleterápiás csoportban 3 hónappal a kezelés után, majd 9 hónappal később már mindkét csoportban normalizálódott a szintje (A). CD160+CD8+ T limfociták frakciója a kontroll csoporthoz képest mind a négy betegcsoportban szignifikánsan lecsökkent terápia előtt, de három évvel a kezelés után a HDR csoporton kívül normalizálódott a szintjük (B). A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). Forrás: saját ábra.

Aktivált és szeneszencs T limfociták változása a négy betegcsoportban



Függelék 16. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=32; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) szignifikánsan lecsökkent a nem/korai aktivált CD8+ T limfociták aránya (A), míg szignifikánsan megnőtt a korai szenescens CD8+ T limfociták frakciója (C) minden betegben kezelés előtt, és ezen a szinten maradt három évvel később is. Az aktivált (B) és véglegesen differenciálódott szenescens CD8+ T sejtek (D) aránya a Kiber-kés terápiás csoportban nőtt meg szignifikánsan és hosszú távon. A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Forrás: saját ábra.

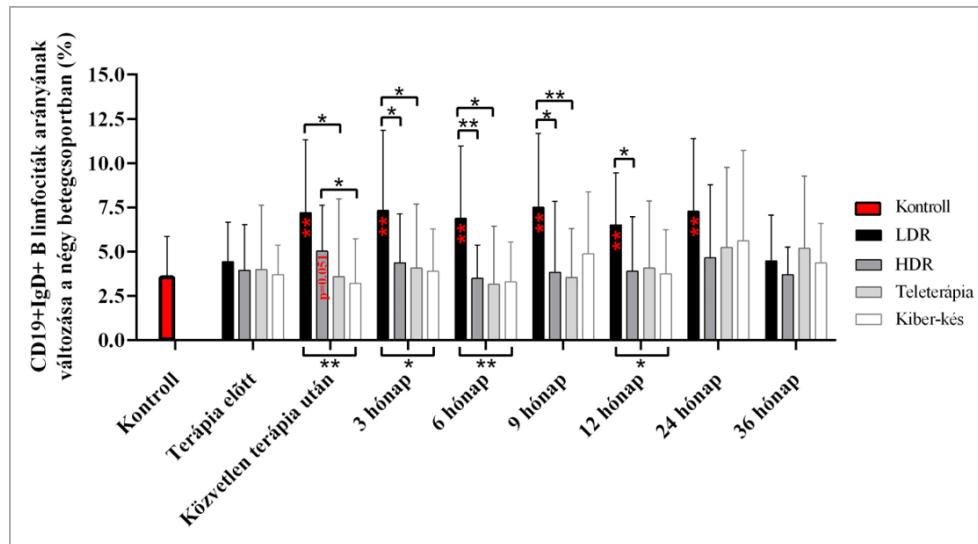
A Tim3+ és KLRG1+ T sejtek változása a négy betegcsoportban



Függelék 17. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=32; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) szignifikánsan megnőtt a Tim3+ (A) és KLRG1+ CD4+ T sejtek (B) aránya már terápia

előtt, és a nyomon követés ideje alatt magas szinten maradt a kontrollhoz képest. Forrás: saját ábra.

B limfociták változása a négy betegcsoportban



Függelék 18. ábra: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=32; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) vizsgáltuk a CD19+IgD+ B limfociták arányát, amely kezelés előtt egyik csoportban sem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest, majd terápia után csak az LDR csoportban nőtt meg, és csak három évvel később normalizálódott a szintje. A szignifikáns változásokat csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). Forrás: saját ábra.

Függelék 1. táblázat: A vizsgált gének nevét, azok rövidítésit, illetve az amplifikációhoz használt primerek szekvenciáit összefoglaló táblázat. Forrás: (Balazs, Kis et al. 2019).

A vizsgált gének és az amplifikációhoz használt primerek szekvenciái		
Gén neve	Gén nevének rövidítése	Primer szekvenciák
Hipoxantin-foszforibozil-transzferáz-1	HPRT1	F: 5' TCAGGCAGTATAATCCAAAGATGGT 3' R: 5' AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG 3' P: 5' CGCAAGCTTGCTGGTGAAAAGGACCC 3'
Sérülés specifikus DNS kötő fehérje-2	DDB2	F: 5' GTCACCTCCAGCACCTCACA 3' R: 5' ACGTCGATCGTCTCAATC 3' P: 5' AGCCTGGCATCCTCGCTACAACC 3'
Növekedést gátló és DNS sérülést indukáló fehérje	GADD45	F: 5' CTGCGAGAACGACATCAAC 3' R: 5' AGCGTCGGTCTCCAAGAG 3' P: 5' ATCCTGCGCGTCAGCAACCCG 3'
Szesztrin-1	SESN1	F: 5' GCTGTCTGTGCATTACTTGTG 3' R: 5' CTGCGCAGCAGTCTACAG 3' P: 5' ACATGTCCCACAACCTTGGTGCTGG 3'
Ferrdoxin-reduktáz	FDXR	F: 5' GTACAACGGGCTTCTGAGA3' R: 5' CTCAGGTGGGGTCAGTAGGA 3' P: 5' CGGGCCACGTCCAGAGCCA 3'
„Murine-double-minus-2” proto-onkogén	MDM2	F: 5' CCATGATCTACAGGAAGTGGTAGTA 3' R: 5' ACACCTGTTCTCACTCACAGATG 3' P: 5' CAATCAGCAGGAATCATCGGACTCAG 3'

HRRT1: belső kontroll gén Rövidítések: F-forward primer, R-reverz primer, P-próra

Növekedési faktorok és proinflammatorikus kemokinek vizsgálata vérplazmából LegendPlex módszerrel

Függelék 2. táblázat: A LDR brachiterápiában részesült prosztatata daganatos betegek (n=18) plazmájából LegendPlex módszerrel vizsgált humán növekedési faktorok és proinflammatorikus kemokinek neve és az angol névből származtatott rövidítése. Forrás: saját táblázat.

Humán növekedési faktorok	
Fehérje neve	Rövidítés
Angiopoietin-2	Ang-2
Epidermális növekedési faktor	EGF
Eritropoietin	EPO
Fibroblaszt növekedési faktor basic	FGF-basic
Granulocita kolónia stimuláló faktor	G-CSF
Granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor	GM-CSF
Hepatocita növekedési faktor	HGF
Makrofág kolónia stimuláló faktor	M-CSF
Trombocita eredetű növekedési faktor AA	PDGF-AA

Trombocita eredetű növekedési faktor BB	PDGF-BB
Őssejt faktor	SCF
Transzformáló növekedési faktor alfa	TGF- α
Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor	VEGF
Humán proinflammatorikus kemokinek	
Monocita kemoattraktáns fehérje 1	MCP-1/CCL2
Kemokin ligandum 5	CCL5/RANTES
Interferon gamma-indukálta fehérje 10	IP-10/CXCL10
Eotaxin	CCL11
Tímusz- és aktiváció-szabályozott kemokin	TARC/CCL17
Makrofág gyulladáshoz fehérje-1 α	MIP-1 α /CCL3
Makrofág gyulladáshoz fehérje-1 β	MIP-1 β /CCL4
Monokin indukálta gamma interferon	MIG/CXCL9
Makrofág gyulladáshoz fehérje-3 α	MIP-3 α /CCL20
Epitél eredetű neutrofil aktiváló fehérje-78	ENA-78/CXCL5
Növekedés szabályozott onkogén- α	GRO α /CXCL1
Interferon-indukált T sejt alfa kemoattraktáns	I-TAC/CXCL11
Interleukin-8	IL-8/CXCL8

Az alkalmazott fenotipizálási panel rendszerek felépülése

Függelék 3. táblázat: Szűkebb fenotipizálási rendszer öt különböző paneljét felépítő antitesteket és azok konjugált fluorokrómjait összefoglaló táblázat, amellyel a regulátor T sejteket, mieloid eredetű szuppresszor sejteket, dendritikus sejteket és természetes ölüsejteket vizsgáltuk. Forrás: saját táblázat.

Regulátor T sejt			
Fluorokróm	Marker	Fluorokróm	Marker
APC	CD4	APC	CD4
Alexa Fluor 488	FoxP3	PerCP/Cy5.5	CD39
PE	CTLA4	Alexa Fluor 488	FoxP3
PerCP/Cy5.5	PD-1	PE	Ki67
MDSC		DC	
Fluorokróm	Marker	Fluorokróm	Marker
FITC	CD11b	FITC	Lineage1
PE	CD14	APC	CD11c
PerCP/Cy5.5	CD33	PE	CD123
APC	HLA-DR	PerCP/Cy5.5	HLA-DR
NK			
Fluorokróm	Marker		

APC	CD3
FITC	CD16
PE	CD56

Függelék 4. táblázat: A legbővebb fenotipizálási rendszer nyolc különböző paneljét felépítő antitesteket és azok konjugált fluorokrómjait összefoglaló táblázat, amellyel a korábbi csoportokon túl kifáradt, szeneszencs, memória T sejteket, B limfociták alcsoportjait, plazma sejteket, monocitákat, PSA-tartalmú makrofágokat, illetve NK sejtek proliferációs kapacitását vizsgáltuk. Forrás: saját táblázat.

Regulátor T sejt aktiváció		NK és DC	
Fluorokróm	Marker	Fluorokróm	Marker
APC-Cy7	CD3	APC	CD16
APC	CD4	PE	CD56
BV785	CD127	APC-Cy7	CD3
FITC	CD25	FITC	Lineage1
PerCP/Cy5.5	CCR4	BV421	CD11c
PE	CTLA4	BV785	CD123
BV785	CD44	PerCP-Cy5.5	HLA-DR
B limfocita		T limfocita kifáradás	
Fluorokróm	Marker	Fluorokróm	Marker
PE	CD19	APC-Cy7	CD3
Pacific blue	IgD	APC	CD4
APC-Cy7	BAFF-R	Pacific Blue	CD8
FITC	CD24	FITC	LAG3
BV785	CD38	PE	2B4
PerCP-Cy5.5	CD21	PerCP-Cy5.5	CD160
APC	CD86	BV785	PD1
T limfocita szeneszencia		Naiv/memória T limfocita	
Fluorokróm	Marker	Fluorokróm	Marker
APC-Cy7	CD3	APC-Cy7	CD3
APC	CD4	APC	CD4
Pacific Blue	CD8	Pacific Blue	CD8
FITC	Tim3	PerCP-Cy5.5	CD45RO
PerCP-Cy5.5	CD57	FITC	CCR7
PE	KLRG1	BV785	CD28
BV785	CD28	PE	CD95
Monocita/makrofág		Proliferáció	
Fluorokróm	Marker	Fluorokróm	Marker

APC	CD14	APC-Cy7	CD3
FITC	CD16	APC	CD4
PE/unconj.	PSA	Pacific Blue	CD8
PerCP-Cy5.5	CCR2	PerCP	CD16
BV421	CD86	PE/Cy7	CD56
APC-Cy7	CD11b	Alexa Fluor 488	FoxP3
BV785	PD-L1	PE	Ki67

A fej-nyaki daganatos betegek klinikai adatai

Függelék 5. táblázat: A fej-nyaki daganatos betegek klinikai adatait összefoglaló táblázat. AMR (akut mukozális reakció): AMR=0: nincs panasz, AMR=1: legenyhébb tünetek, AMR=3: legsúlyosabb tünetek. Terápiára adott válasz: 0: nincs adat, 1: komplett tumor válasz, 2: részleges tumor válasz, 3: nincs tumor válasz, 4: helyi kiújulás, 5: nyirokcsomói kiújulás, 6: teljes kiújulás gyanúja. Forrás: (Balazs, Kis et al. 2019).

Beteg kód	Tumor lokalizáció	TNM	Nem	Kor	Teljes dózis (Gy)	Frakció szám	Dózis/frakció (Gy)	AMR	Terápiára adott válasz
23	gége	T2N0M0	nő	57	66	30	2,2	3	3
25	szájüreg (nyelv)	T2N0M0	férfi	66	57,6	36	1,6	2	1
26	száj-garat (mandula)	T3N0M0	férfi	73	70	35	2	2	1
28	gége	T2N0M0	nő	65	70,2	39	1,8	3	1
30	gége	T3N0M0	nő	68	72	40	1,8	3	1
31	szájüreg	T4N0M0	férfi	67	57,6	36	1,6	2	4
33	fültőmirigy	T1N0M0	nő	57	66	33	2	3	1
34	szájüreg (nyelv)	T2N2M0	nő	60	60	30	2	2	1
1	gége (gégefő)	T1N0M0	férfi	62	51	17	3	3	1
4	gége	T1N0M0	férfi	66	51	17	3	3	1
18	gége	T1N0M0	férfi	70	51	17	3	2	1
12	gége	T1N0M0	férfi	76	51	17	3	3	1
10	szájüreg	T1N0M0	férfi	43	52,8	33	1,6	2	1
20	szájüreg	T4N0M0	férfi	59	57,6	36	1,6	0	1
27	szájüreg	T4N0M0	nő	49	57,6	36	1,6	2	1
32	szájüreg	T2N0M0	nő	79	57,6	36	1,6	2	1
2	gége	T2N0M0	férfi	72	64,8	37	1,8	2	1
17	gége	T2N0M0	férfi	64	72	40	1,8	3	1
19	gége (gégefedő)	T2N0M0	nő	67	72	40	1,8	3	1

21	gége (gégefedő)	T3N2M0	nő	52	74	40	1,8	3	1
3	szájüreg	T2N0M0	férfi	44	52,8	33	1,6	3	4
14	szájüreg	T4N0M0	férfi	63	57,6	36	1,6	1	6
24	gége (gégefő)	T1N0M0	férfi	55	51	17	3	1	5

A prosztatata daganatos betegek klinikai adatai

Függelék 6. táblázat: A tanulmányba bevont prosztatata daganatos betegek (n=98) klinikai adatainak (kockázati besorolás, TNM klasszifikáció, Gleason értékek, a kapott hormonterápia típusainak) százalékos megoszlásait összefoglaló táblázat. Forrás: saját táblázat.

	LDR	HDR	Teleterápia	Kiber-kés
Betegszám	n=31	n=32	n=20	n=15
Átlag életkor	66	67	73	69
Medián életkor	67	68	75	71
Kockázati besorolás				
1	29%	31%	15%	20%
2	71%	69%	35%	80%
3	-	-	50%	-
TNM besorolás				
T1	26%	28%	25%	13%
T2	74%	72%	45%	87%
T3	-	-	30%	-
T4	-	-	-	-
Gleason érték				
2+2	6%	-	-	-
3+2	10%	-	5%	-
3+3	58%	56%	45%	47%
3+4	23%	40%	45%	47%
4+5	-	-	5%	-
5+5	-	-	-	6%
nincs adat	3%	4%	-	-
Hormonterápia típusa				
0	48%	41%	15%	80%
LHRH antagonistá	39%	25%	60%	20%
TAB	3%	6%	5%	-
Anti-androgén	10%	25%	20%	-
Alfuzozin	-	3%	-	-

Hormonterápia hossza				
≤ 3 hónap	67%	68%	65%	67%
≥ 3 hónap	33%	32%	35%	33%

A betegek akut és krónikus GI és GU mellékhatásai, IPSS és QoL tesztek eredményei
 Függelék 7. táblázat: A tanulmányba bevont prosztatata daganatos betegek (n=98) akut és krónikus gasztrointesztinális (GI) és genitourináris (GU) mellékhatásainak százalékos előfordulását összefoglaló táblázat. Gréd 0: nincs mellékhatás, 1: van mellékhatás, de beavatkozást nem igényel, 2: beteg gyógyszeres kezelést igényel, 3: súlyos hasmenés, nyálkahártya sérülés, alhasi felfűvódás, 4: kritikus állapot, 5: sugárzás okozta elhalálozás. Az akut tüneteket 3 hónappal a kezelést követően, míg a krónikus tüneteket 6-dik hónaptól vizsgáltuk a betegeknél, a pontokat a kezelőorvos adta. Forrás: saját táblázat.

	LDR	HDR	Teleterápia	Kiber-kés
Akut GU - 3 hónál				
Gréd 0	29%	62%	10%	13%
Gréd 1	16%	22%	20%	20%
Gréd 2	52%	16%	65%	60%
Gréd 3	3%	-	5%	7%
Akut GI - 3 hónál				
Gréd 0	90%	100%	40%	47%
Gréd 1	10%	-	45%	53%
Gréd 2	-	-	15%	-
Gréd 3	-	-	-	-
Krónikus GU - 6 hótól				
Gréd 0	32%	60%	25%	67%
Gréd 1	23%	22%	25%	6%
Gréd 2	45%	18%	45%	27%
Gréd 3	-	-	-	-
Krónikus GI- 6 hótól				
Gréd 0	74%	97%	50%	73%
Gréd 1	23%	3%	35%	20%
Gréd 2	3%	-	10%	7%
Gréd 3	-	-	-	-

Függelék 8. táblázat: A tanulmányba bevont prosztatata daganatos betegek (n=98) saját maguk által pontozott mellékhatásaiknak százalékos előfordulását összefoglaló táblázat, amelyeket a Nemzetközi Prostatata Tünetek Pontszám (International Prostate Symptom

Score - IPSS) rendszere, valamint az életminőségüket és vizeletürítési tüneteket pontozó teszt (QoL) segítségével adtak meg minden kontroll alkalmával. A táblázat a kezelés előtti, és 36 hónappal a kezelés utáni adatokat tartalmazza. Forrás: saját táblázat.

	LDR	HDR	Teleterápia	Kiber-kés
IPSS - kezelés előtt				
Enyhe (≤ 7)	61%	50%	25%	40%
Mérsékelt (8-19)	16%	44%	52%	53%
Súlyos (20-35)	3%	3%	-	7%
nincs adat	20%	3%	10%	-
IPSS - kezelés után 36 hónappal				
Enyhe (≤ 7)	55%	50%	50%	60%
Mérsékelt (8-19)	19%	28%	35%	40%
Súlyos (20-35)	3%	3%	10%	-
nincs adat	23%	19%	5%	-
QoL - kezelés előtt				
Kiváló-jó (0-1)	61%	56%	40%	60%
Kielégítő-vegyes (2-3)	13%	35%	40%	33%
Elégedetlen (4-6)	6%	6%	10%	7%
nincs adat	20%	3%	10%	-
QoL - kezelés után 36 hónappal				
Kiváló-jó (0-1)	55%	56%	45%	73%
Kielégítő-vegyes (2-3)	19%	22%	30%	27%
Elégedetlen (4-6)	3%	3%	20%	-
nincs adat	23%	19%	5%	-

A vérplazma fehérjeprofil vizsgálatának eredménye protein array technikával
 Függelék 9. táblázat: A protein-array eredmények alapján a fej-nyaki daganatos betegek (n=11) vérplazmájában szignifikánsan változott fehérjék nevét és rövidítését (az angol neve után), valamint a kezelés előtti szinthez viszonyított változás irányát összefoglaló táblázat. Szignifikáns változásokat a csillagok jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). A változásokat szendvics ELISA technikával validáltuk. Forrás: saját táblázat.

Fehérje neve	Rövidítés	Közvetlen terápia után	1 hónappal terápia után
Adiponektin	Acrp3	↑	↑ *
Apolipoprotein A1	ApoA1	↓ *	↓
B sejt aktiváló faktor	BAFF	↑ *	↑ *
Differenciációs klaszter 14	CD14	-	↑ *
Endoglin	CD105	↓ *	↓
Epitél neutrofil aktiváló fehérje-78	CXCL5/ENA-78	↑	-

Komplement komponens C5a	C5a	-	↑ **
Trefoil faktor 3	TFF3	↓	-

A vizsgálatba bevont prosztata daganatos beteg plazma PSA értékét kezelés előtti és utáni időpontokban

Függelék 10. táblázat: Az LDR kezelésben részesült prosztata daganatos betegek kezelés előtti és utáni időpontokban meghatározott plazma PSA értékei (ng/ml). Forrás: (Balazs, Kocsis et al. 2022).

Plazma PSA szint (ng/ml) az LDR betegcsoportban								
Beteg kód	Terápia előtt	Közvetlen terápia után	3 hónap	6 hónap	9 hónap	12 hónap	24 hónap	36 hónap
P053	7.00	7.00	0.57	0.28	n	0.01	0.14	0.10
P056	0.90	0.90	1.00	0.69	0.75	0.40	0.55	0.30
P057	1.64	1.64	2.07	1.36	n	1.89	1.40	0.40
P058	12.20	12.20	6.44	2.94	n	1.04	0.28	n
P061	11.40	11.40	1.87	1.07	n	0.01	0.21	0.16
P062	0.93	0.93	1.63	1.28	n	0.76	0.68	0.77
P068	0.09	0.09	0.60	0.90	n	0.60	0.60	0.40
P069	4.73	4.73	1.15	0.60	n	2,10	1.20	1.50
P071	1.14	1.14	0.50	0.34	n	0.59	0.23	1.34
P072	13.9	13.9	0.09	0.04	n	n	n	n
P080	0.09	0.09	0.30	0.33	n	0.42	1.60	5.70
P081	1.73	1.73	0.09	0.06	n	0.07	0.15	n
P083	0.75	0.75	0.38	0.41	n	1.13	0.43	0.26
P084	n	n	0,05	0,07	0.10	0,15	0,35	0,05
P085	5.01	5.01	5.50	6.60	9.41	0.15	n	n
P091	4,74	4,74	2,3	1,97	n	n	n	n
P092	0.09	0.09	0.00	0.00	n	0.16	0.27	0.11
P094	2,55	2,55	0,80	0,61	n	0,82	0,45	n
P095	8.13	8.13	0.70	0.57	n	0.27	0	n
P170	7.80	7.80	0.98	0.37	0.27	0.38	n	n
P176	12.4	12.4	1.00	0.09	0.06	0.06	n	n
P178	3.20	3.20	1.90	1.69	2.20	4.37	1.30	0.62
P179	9.52	9.52	1.09	0.70	0.76	0.80	0.70	0.16
P185	3.20	3.20	1.10	0.61	n	0.40	0.20	0.12
P196	18.90	18.90	3.00	1.48	n	n	n	5.80
P182	7.18	7.18	2.12	1.24	0.93	1.17	0.72	0.16
P198	7.10	7.10	3.22	1.37	n	1.38	2.90	n
P184	9.43	9.43	2.73	2.00	1.50	1.65	1.56	0.12

P207	0.44	0.44	0.09	0.09	n	0.09	0.09	0.09
P208	0.09	0.09	0.00	n	n	0.10	0.20	0.11
P209	6.02	6.02	0.02	n	0.18	0.25	0.25	0.12

Függelék 11. táblázat: A HDR kezelésben részesült prosztatata daganatos betegek kezelés előtti és utáni időpontokban meghatározott plazma PSA értékei (ng/ml). Forrás: saját táblázat.

Plazma PSA szint (ng/ml) a HDR betegcsoportban								
Beteg kód	Terápia előtt	Közvetlen terápia után	3 hónap	6 hónap	9 hónap	12 hónap	24 hónap	36 hónap
P104	1.07	1.07	0.48	0.50	0.62	0.95	1.00	0.45
P077	1.70	1.70	4.19	5.95	3.49	3.97	2.73	2.90
P110	12.40	12.40	3.90	2.70	1.75	1.98	1.70	2.78
P111	2.64	2.64	2.01	2.01	3.08	2.90	0.59	0.59
P113	6.40	6.40	2.78	2.30	2.22	3.07	1.20	0.73
P114	1.86	1.86	0.21	0.51	0.41	0.20	0.10	0.10
P112	0.09	0.09	0.04	0.04	0.00	0.04	0.08	0.07
P140	2.91	2.91	1.25	1.20	1.52	1.25	0.38	0.40
P142	2.37	2.37	1.72	1.78	1.90	1.20	0.98	1.12
P126	1.27	1.27	0.10	0.071	0.17	n	0.10	0.12
P132	0.90	0.90	1.20	0.50	n	0.47	0.74	0.45
P163	7.38	7.38	2.10	1.70	1.10	1.25	0.67	0.57
P177	0.23	0.23	0.77	0.92	0.95	2.80	2.20	3.05
P188	7.53	7.53	7.60	5.53	n	2.26	2.30	1.63
P191	5.6	5.6	1.16	1.37	1.37	0.92	1.12	2.25
P082	7.72	7.72	2.98	3.42	2.80	2.34	1.07	1.16
P063	4.06	4.06	2.25	2.17	n	1.67	0.50	n
P073	9.33	9.33	2.42	1.75	1.51	1.02	0.668	1.18
P118	1.43	1.43	1.80	1.12	1.58	2.49	1.58	3.35
P161	7.29	7.29	0.08	n	0.82	1.38	0.37	0.19
P203	5.90	5.90	1.48	3.21	2.00	2.50	0.09	0.43
P205	2.50	2.50	0.34	0.16	0.14	0.29	0.28	0.28
p181	9.74	9.74	n	1.85	3.11	3.94	1.1	1.42
p189	7.74	7.74	n	2.63	1.05	0.97	2.44	2.86
p210	4.60	4.60	n	2.16	0.87	0.87	0.58	0.47
p212	2.56	2.56	n	1.70	0.75	0.71	0.75	0.29
p219	13.40	13.40	n	3.89	n	1.86	2.26	2.9
p233	10.60	10.60	n	5.70	3.48	n	3.14	3.55
p224	6.60	6.60	n	3.20	n	2.50	3.00	2.58
p238	7.40	7.40	n	1.69	2.29	2.89	4.61	n
p245	4.73	4.73	n	1.88	1.32	0.20	8.86	n

p246	8.86	8.86	n	3.82	3.65	3.62	2.57	n
-------------	------	------	---	------	------	------	------	---

Függelék 12. táblázat: A teleterápiás kezelésben részesült prosztatata daganatos betegek kezelés előtti és utáni időpontokban meghatározott plazma PSA értékei (ng/ml). Forrás: saját táblázat.

Plazma PSA szint (ng/ml) a Teleterápiás betegcsoportban								
Beteg kód	Terápia előtt	Közvetlen terápia után	3 hónap	6 hónap	9 hónap	12 hónap	24 hónap	36 hónap
P064	1.95	1.95	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.27
P099	3.57	3.57	0.09	0.09	0.09	n	0.09	0.20
P101	9.80	9.80	n	2.61	n	0.64	0.45	0.25
P105	14.16	14.16	1.90	1.80	1.30	1.40	0.91	0.86
P122	5.60	5.60	2.56	1.51	0.76	0.61	0.20	0.01
P123	31.00	31.00	0.11	0.12	0.00	0.01	0.19	0.21
P125	6.86	6.86	0.01	0.01	n	0.00	0.01	0.07
P116	8.56	8.56	1.42	1.04	n	0.50	0.29	0.37
P124	2.08	2.08	0.70	0.27	n	0.18	0.13	0.10
P103	20.00	20.00	n	0.31	n	1.94	2.00	7.70
P128	8.69	8.69	0.09	0.10	n	0.13	0.14	0.10
P131	n	n	0.39	0.09	n	0.14	0.19	0.14
P133	0.77	0.77	n	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
P134	22.00	22.00	n	0.24	0.38	0.28	0.10	0.09
P135	0.30	0.30	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
P136	6.64	6.64	0.26	0.58	0.37	0.23	0.33	0.91
P137	11.78	11.78	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01
P143	24.00	24.00	0.00	0.00	0.01	0.07	n	0.16
P153	7.00	7.00	2.37	1.19	0.91	0.87	0.95	0.34
P154	0.28	0.28	0.10	0.50	n	0.10	0.09	0.09

Függelék 13. táblázat: A Kiber-kés kezelésben részesült prosztatata daganatos betegek kezelés előtti és utáni időpontokban meghatározott plazma PSA értékei (ng/ml). Forrás: saját táblázat.

Plazma PSA szint (ng/ml) a Kiber-kés terápiai betegcsoportban								
Beteg kód	Terápia előtt	Közvetlen terápia után	3 hónap	6 hónap	9 hónap	12 hónap	24 hónap	36 hónap
P149	5.67	5.67	1.98	1.38	0.70	0.66	0.30	0.17
P151	12.00	12.00	2.30	1.40	0.92	0.79	0.20	0.21
P152	9.16	9.16	3.68	2.56	1.91	4.00	0.57	0.21
P156	14.30	14.30	0.06	0.05	0.50	0.15	0.09	0.09

P157	n	n	0.00	0.03	0.00	0.09	0.01	0.09
P158	8.60	8.60	0.80	0.66	0.43	0.48	0.18	0.24
P150	7.70	7.70	1.07	0.60	0.38	0.27	0.12	0.07
P159	5.85	5.85	1.03	0.81	0.39	0.36	0.11	0.09
P164	11.60	11.60	0.70	0.20	0.40	0.20	0.01	0.09
P165	6.16	6.16	1.50	1.07	n	0.95	0.30	0.19
P166	5.60	5.60	2.80	1.28	0.74	0.42	0.12	n
P167	12.30	12.30	4.60	2.59	2.39	1.57	1.24	1.58
P168	10.00	10.00	2.47	2.30	4.63	1.05	1.05	0.30
P169	7.36	7.36	1.96	0.92	0.38	n	0.18	0.14
P172	12.00	12.00	2.42	2.03	1.33	0.49	0.42	0.28

A perifériás vér limfocitáiban kialakult kromoszóma sérülések száma a betegcsoportokban

Függelék 14. táblázat: Az LDR kezelésben részesült prosztatata daganatos betegek terápia előtti és utáni időpontokban meghatározott teljes kromoszóma aberrációinak száma /100 sejt. Forrás: saját táblázat.

Összes kromoszóma-aberrációk száma /100 sejt - LDR betegcsoport								
Beteg kód	Terápia előtt	Közvetlen terápia után	3 hónap	6 hónap	9 hónap	12 hónap	24 hónap	36 hónap
P178	0	4	7	2	15	9	3	11
P179	3	1	10	1	5	25	2	3
P185	3	9	3	3	5	6	2	
P196	1	0	3	23	7	1		
P182	4	3	7	2	7	16	7	3
P198	3	1	10	8	5	3		
P184	12	8	4	3	6	12	2	3
P207	7	2	11	11	6	7	11	1
P208	3	1	14	0	5			
P209	8	6	13	3	8	3		
átlag	4	4	8	6	7	9	5	4

Függelék 15. táblázat: A HDR kezelésben részesült prosztatata daganatos betegek terápia előtti és utáni időpontokban meghatározott teljes kromoszóma aberrációinak száma /100 sejt. Forrás: saját táblázat.

Összes kromoszóma-aberrációk száma /100 sejt - HDR betegcsoport								
Beteg kód	Terápia előtt	Közvetlen terápia után	3 hónap	6 hónap	9 hónap	12 hónap	24 hónap	36 hónap

P104	5	7	3	5	3	3	1	10
P077	6	4	9	7	12	4	3	1
P110	2	11	1	3	9	5	3	1
P111	1	1	9	5	16	3	9	8
P113	2	2	4	9	6	0	2	4
P114	2	8	2	1	1	10	3	4
P112	0	0	2	4	13	1	2	12
P140	5	8	3	5	5	9	3	5
P142	4	5	20	22	18	0	5	7
P126	5	50	11	5	11	5	0	4
P132	1	17	2	4	1	7	7	7
P163	5	3	1	1	5	1	0	2
P177	0	13	6	6	5	7	3	0
P188	2	8	25	2	8	14	1	1
P191	3	0	3	3	6	1	2	0
P082	2	6	7	7	2	2	6	4
P063	1	14	2	4	4	2	2	3
P073	2	0	2	14	4	2	0	14
P118	2	0	3	3	0	4	4	0
P161	10	8	7	6	3	5	5	6
P203	5	9	7	7	4	11	4	1
P205	0	5	2	3	14	4	9	2
átlag	3	8	6	6	7	5	3	4

Függelék 16. táblázat: A teleterápiás kezelésben részesült prosztata daganatos betegek terápia előtti és utáni időpontokban meghatározott teljes kromoszóma aberrációinak száma /100 sejt. Forrás: saját táblázat.

Összes kromoszóma-aberrációk száma /100 sejt - Teleterápiás betegcsoport								
Beteg kód	Terápia előtt	Közvetlen terápia után	3 hónap	6 hónap	9 hónap	12 hónap	24 hónap	36 hónap
P64	2	15	10	15	12	17	12	12
P99	5	19	9	9	22	10	9	9
P101	9	15	22	6	9	15	11	6
P105	5	6	20	7	5	8	13	6
P122	1	10	12	14	4	9	9	6
P123	6	10	22	14	18	10	3	6
P125	4	29	7	6	1	3	2	18
P116	3	10	8	9	14	4	4	5
P124	8	14	10	5	21	11	16	6
P103	3	6	11	11	4	30	6	
P128	12	11	50	13	9	4	0	5

P131	4	11	28	14	8	4	5	7
P133	3	15	7	30	34	19	10	10
P134	9	44	31	16	14	19	5	14
P135	8	13	15	5	9	4	5	4
P136	3	21	42	30	22	17	22	5
P137	0	14	14	18	16	18	4	6
P143	3	22	10	42	13	11	12	3
P153	4	17	18	14	19	21	3	17
P154	11	8	10	5		3	14	8
átlag	5	16	18	14	13	12	8	8

Függelék 17. táblázat: A Kiber-kés kezelésben részesült prosztata daganatos betegek terápia előtti és utáni időpontokban meghatározott teljes kromoszóma aberrációinak száma /100 sejt. Forrás: saját táblázat.

Összes kromoszóma-aberrációk száma /100 sejt - Kiber-kés terápiás betegcsoport								
Beteg kód	Terápia előtt	Közvetlen terápia után	3 hónap	6 hónap	9 hónap	12 hónap	24 hónap	36 hónap
P149	5	7	3	16	7	5	2	2
P151	0	14	8	16	11	10	9	18
P152	1	13	10	32	17	16	13	14
P156	1	15	21	25	8	5	5	8
P157	1	12	12	5	5	6	4	1
P158	10	13	3	6	3	20	10	14
P150	1	6	42	6	13	6		1
P159	1	13	9	19	12	8	7	12
P164	2	2	10	10	9	10	5	12
P165	10	22	13	18	15	2	9	
P166	8	26	25	13	3	2	9	6
P167	9	26	27	14	6	12	4	5
P168	4	14	10	8	18	14		3
P169	3	15	11	26	10	15	11	12
P172	2	18	6	5	8	12	6	1
átlag	4	14	14	15	10	10	7	8

A kromoszóma sérülések száma és az immunfenotípus változások közötti összefüggések vizsgálata

Függelék 18. táblázat: A négyféle sugárkezelésben részesült prosztata daganatos beteg csoportban (LDR: n=10; HDR: n=32; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápiás: n=15) közvetlenül a terápia után meghatározott kromoszóma sérülések száma és a terápia utáni

különböző időpontokban kapott véglegesen differenciálódott szeneszcens CD4+ és CD8+ T limfociták aránya közötti korrelációs együtthatókat („r”) összefoglaló táblázat. Az $r > 0,6$ érték esetén erős pozitív korreláció áll fenn az adatsorok között. Forrás: saját táblázat.

Terápia típusa	Term.diff. szeneszc. T sejt	Közvetlen utána	3 hónap	6 hónap	9 hónap	12 hónap	24 hónap	36 hónap
LDR	CD4+	r=0.203	r=0.141	r<0.100	r<0.100	r<0.100	r<0.100	r=0.500
	CD8+	r=0.362	r=0.546	r=0.546	r=0.669	r=0.620	r=0.536	r=0.800
HDR	CD4+	r=0.401	r=0.580	r=0.558	r=0.389	r=0.162	r=0.704	r=0.583
	CD8+	r=0.296	r=0.438	r=0.285	r=0.266	r=0.166	r=0.410	r<0.100
Teleterápia	CD4+	r<0.100	r<0.100	r<0.100	r<0.100	r<0.100	r<0.100	r<0.100
	CD8+	r=0.154	r=0.493	r=0.572	r=0.465	r=0.283	r=0.444	r=0.447
Kiber-kés terápia	CD4+	r=0.559	r=0.445	r=0.647	r=0.614	r=0.563	r=0.436	r=0.519
	CD8+	r=0.608	r=0.406	r=0.629	r=0.611	r=0.420	r=0.412	r=0.417