

# 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

## Bevezetés

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. 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 leggyakrabban alkalmazott sugárterápiás eljárások típusai a teleterápia, avagy „távolbesugárzás”, a Kiber-kés terápia, illetve a brachyterápia, avagy „közelbesugárzás” amelynek két fő típusa az alacsony (LDR) és magas dóziszrátájú (HDR) brachyterápia.

A sugárterápia mind a daganatsejtekre, mind pedig az immunrendszer sejtjeire hatással van. A daganatok sugárzással szembeni érzékenységet 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, valamint a tumorsejtek osztódási kinetikája, 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.

Az evolúció során a fertőző ágensek, valamint a nem sajátként felismert, gazdaszervezetre veszélyes, illetve tumorossá fajult sejtek eltávolítására kétféle immunrendszer fejlődött ki, ezek a veleszületett (natív) és a szerzett (adaptív) rendszerek, amelyek szorosan és összehangoltan együttműködve biztosítják az immunhomeosztázist. A veleszületett immunrendszer sejtjei közé tartoznak többek között a monociták, makrofágok, dendritikus sejtek (DC) és a természetes ölősejtek (NK). Az adaptív immunrendszer tagjai pedig a T és B limfociták, és ezek különböző funkcionális alcsoportjai (például: effektor, regulátor, memória sejtek). Az említett immunsejtek fontos szerepet játszanak a daganatellenes immunválasz modulálásában.

A nagy dóziszú 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. A sugárzás közvetlenül és közvetve is hat az immunrendszer sejtjeire. 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 sejtjes elemei által termelt szolubilis faktorokon keresztül hat mind lokálisan, mind szisztémásan. Az immunrendszer sejtjeinek a sugárérzékenysége igen széles skálán mozog, ebből adódóan a sugárterápia során a daganatot infiltráló immunsejtek pusztulásának mértéke eltérő. Továbbá a besugárzás a túlélő immunsejtek fenotípusát és működését is jelentősen befolyásolhatja. 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.

### **Célkitűzések**

- Célunk volt vizsgálni a daganatokkal összefüggő, ionizáló sugárzás indukálta szisztémás akut és késői, veleszületett és adaptív immunfolyamatokat különböző sugárterápiás protokollal kezelt fej-nyaki és prosztata 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 immunellenőrzőpont-gátló 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.

## **Módszerek**

Vizsgálatainkba intenzitás modulált sugárterápiában részesült 23 fej-nyaki és különböző besugárzási protokollokkal kezelt 98 prosztatata daganatos férfi beteg került bevonásra. Utóbbi betegcsoport terápia szerinti megoszlása: LDR: n=31; HDR: n=32; teleterápiás: n=20; Kiber-kés terápias: n=15. Az LDR brachyterápia során alkalmazott, és a páciensek prosztatata szövetébe ültetett permanens <sup>125</sup>I izotópok kezdeti dózis rátája 1,692 Gy volt, a teljes 145 Gy dózist lassan, körülbelül 12 hónap alatt adták le a prosztatata szövetében, így a mi vizsgálati rendszerünkben ez a terápia típus testesíti meg az alacsony dózisu krónikus sugárterhelést. A HDR brachyterápia során szintén a prosztatata szövetébe juttatott izotópok segítségével adták le a kívánt dózist, amelyhez leggyakrabban <sup>192</sup>Ir izotópot használnak. A teljes 19 Gy (esetenként 21 Gy) dózis néhány perces kezelés során kapták meg a betegek távvezérelt technika segítségével. 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. A kockázati besorolás határozta meg a prosztatata daganatos betegek esetében az alkalmazandó sugárterápia típusát. A kis és közepes kockázatúak mind a négy féle kezelésben részesülhetnek,

magas kockázatú betegek esetében nem alkalmaznak brachyterápiát, kizárólag teleterápiát, vagy Kiber-kés terápiát kaphatnak.

A fej-nyaki daganatos betegek esetében csak rövid nyomon követésre volt lehetőségünk, a kezelés megkezdése előtt egy héten belül, az utolsó frakció leadása után (azt követő 6 órán belül), illetve egy hónappal a sugárterápia végét követően történt vérvétel. A prosztata 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). 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.

#### Perifériás vér begyűjtése, PBMC és plazma minták izolálása

Perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC) és plazma minták izolálásához körülbelül 10 ml/alkalom mennyiségű perifériás vért gyűjtöttünk be minden betegről. A vért Histopaque oldatra rétegeztük majd a sűrűség-gradiens centrifugálással elkülönültek a PBMC-k, mintegy „felhő” réteget alkotva a felette elhelyezkedő vérplazma és az alatta lévő Histopaque-oldat között. A kinyert PBMC-k sejtszámát meghatároztuk, majd fagyasztó médiumban lefagyasztottuk előbb  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra, majd folyékony nitrogénben tároltuk felhasználásig. A sűrűség-gradiens centrifugálás során felülúszóként elvált vérplazmát új csövekbe gyűjtve lecentrifugáltuk, hogy a mintában maradt sejtörmelégeket eltávolíthassuk. Centrifuga után a felülúszóként kinyert tiszta plazmát a kívánt térfogatokban szétosztva  $-80^{\circ}\text{C}$  hőmérsékletre helyeztük felhasználásig.

#### Prosztata daganatos betegek perifériás limfocitáiban kialakult kromoszóma sérülések vizsgálata

A limfocita kultúrákat fitohemagglutininnal (PHA, 2% v/v, Gibco), 10% FBS-sel és penicillinnel/streptomocinnal (100 U/ml/ 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) kiegészített RPMI-1640 médiumban inkubálták 46 órán át,  $37^{\circ}\text{C}$ -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.

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. 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'-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. 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.

Nagy áteresztőképességű fehérje vizsgálat protein-array módszerrel

A fej-nyaki daganatos betegek vérplazmájából 105 különböző, gyulladással összefüggésbe 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.

#### 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. A mintákat 450 nm hullámhosszon (570 nm hullámhossz korrekcióval) mértük le spektrofotométer (Biotek, Synergy HT) segítségével. Az optikai denzitás (OD) értékeket Gen5 2.09 verziójú szoftver segítségével mértük meg, majd a standard sor ismert koncentrációjú és ismert OD értékű tagjaiból felvett görbe segítségével számoltuk ki a fehérjék koncentrációit.

#### 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 plazma 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. 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.

#### 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.

#### PBMC-k feldolgozása, az immunsejtek jellemzése áramlási citometriás módszerrel

A folyékony nitrogénben tárolt PBMC mintákat felolvasztottuk, majd 5% FBS-t tartalmazó RPMI-1640 médiumban lecentrifugáltuk, majd meghatároztuk a sejtszámot tripánkékes festéssel. Ezután következett a sejtfelszíni markerek fluorokrómokkal konjugált monoklonális antitestekkel történő jelölése. Jelölés után 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. Az így megjelölt PBMC-ket áramlási citométer (FACS Calibur, Becton Dickinson, CA, USA, és Cytoflex, 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. Az egyes fluorokrómokkal jelölt antitestek pozitív/negatív határainak beállításához fluoreszcencia mínusz egy (FMO) és izotípus kontrollokat, valamint festetlen és teljesen fesett mintákat alkalmaztunk.

#### Kapuzási stratégiák

A perifériás vérben keringő monocitáknak három különböző altípusát különítettünk el a CD14 és CD16 sejtfelszíni markereik segítségével a teljes PBMC csoportban (amelyből kizártuk a limfociták csoportját). Ezek a klasszikus



(CD14<sup>magas</sup>CD16<sup>-</sup>), átmeneti (CD14<sup>magas</sup>CD16<sup>+</sup>) és a nem-klasszikus (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>magas</sup>) monocita formák. Továbbá vizsgáltuk a keringő, PSA-tartalmú, CD14<sup>+</sup>PSA<sup>+</sup> dupla pozitív makrofágokat is ugyan abból a kiindulási csoportból (PBMC-ből kivont limfocita csoport).

A mieloid és limfoid eredetű dendritikus sejtek meghatározását a teljes PBMC csoporton, majd a Lineage<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> alcsoporton belül végeztük. Mieloid DC-k CD11c<sup>+</sup>Lineage<sup>-</sup>, míg a limfoid DC-k CD123<sup>+</sup>Lineage<sup>-</sup> fenotípusúak.

NK sejtek és funkcionális alcsoportjainak kapuzása: a klasszikus limfociták csoportját fizikai paramétereik alapján, az oldalra irányuló (SSC) és az előre irányuló (FSC) fényszórási grafikonon határoztuk meg minden esetben. Az NK sejteket CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> dupla pozitív csoportként határoztuk meg a CD3<sup>-</sup> limfocita kapunk belül. További öt különböző érési és funkcionális alcsoportját különíthetjük el a két említett sejtfelszíni marker különböző expressziós szintje alapján. Ezek az éretlen prekurzorok (CD56<sup>magas</sup>CD16<sup>-</sup>), éretlen/korai érett alakok (CD56<sup>magas</sup>CD16<sup>alacsony</sup>), érett citotoxikus (CD56<sup>alacsony</sup>CD16<sup>magas</sup>), degranulált (CD56<sup>alacsony</sup>CD16<sup>-</sup>) és az anergikus NK sejtek (CD56<sup>-</sup>CD16<sup>magas</sup>). Az NK sejtek alcsoportjainak osztódási kinetikáját a Ki67 marker expressziójával határoztuk meg, és különítettük el a Ki67<sup>-</sup> (nyugvó) állapotú alakoktól.

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<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> helper és a CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> dupla pozitív citotoxikus T limfocita alcsoportokat, valamint ezek arányát. A CD3<sup>+</sup> limfocita kapunk belül határoztuk meg a CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> dupla negatív T sejteket, a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> limfocitákon belül pedig a CD3<sup>-</sup> aberráns limfocita arányt. A CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> és a CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T sejt csoportokon belül pedig a többi, később részletezett funkcionális T sejt alcsoportokat (regulátor, kifáradt, szenescens, memória) határoztuk meg.

Szuppresszív T limfociták kapuzása: a Treg sejteket a FoxP3 transkripciófaktor segítségével azonosítottuk be CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> dupla pozitív sejtnek. A PD1<sup>+</sup> T sejt alcsoportot mind a teljes CD4<sup>+</sup> T limfocita, mind a CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulátor T limfocita, mind pedig a CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> effektor T limfocita csoporton belül meghatároztuk. A CTLA4<sup>+</sup> és CD39<sup>+</sup> T sejt alcsoportokat ugyan ezen a kapuzási stratégián keresztül

vizsgáltuk. A Treg-ek csoportjának további két alcsoportját is vizsgáltuk, ezek a CD8+FoxP3+ Tregok, valamint belső festést nem igénylő, a CD25 (IL-2) és a CD127 (IL-7) sejt felszíni markerek alapján beazonosított, CD127<sup>alacsony/-</sup>CD25<sup>+/magas</sup> fenotípusú Treg sejtek. A CTLA4 aktivációs markerek expresszióját a CD4+ T sejtek, és a CD127<sup>alacsony/-</sup>CD25<sup>magas</sup> regulátor T limfociták felszínén is meghatároztuk. A CD4+FoxP3+ és CD8+FoxP3+ Treg sejtek osztódási kapacitását is meghatároztuk a már említett Ki67 sejten belüli marker expressziója segítségével.

Kifáradt T limfociták kapuzása: a T limfociták immunológiai kimerülését jelző négy legfontosabb sejt felszíni markert a teljes limfocita csoporton belül meghatároztuk CD3+CD4+ és CD3+CD8+ T limfociták kapujában végeztük. Ezek a markerek a PD1, LAG3, 2B4 és a CD160.

Aktivált és szeneszencs T limfociták kapuzása: a CD28 és a CD57 sejt felszíni 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 szeneszencs (CD28-CD57-) és a véglegesen differenciálódott szeneszencs T sejtek (CD28-CD57+) csoportja. A Tim3 és KLRG1 gátló receptorok expresszióját a CD3+CD4+ T sejtek csoportján belül vizsgáltuk.

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 alcsoportokat 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<sup>magas</sup>), centrális memória T sejtek (TCM: CD4RO+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-).

A B limfocitákat CD19+IgD+ dupla pozitív fenotípussal azonosítottuk be a teljes limfocita kapun belül. A B limfociták csoportját két markerpáros segítségével hat különböző érési és funkcionális alcsoportra osztottuk. A CD24 és CD38 markerekkel azonosítottuk be az éretlen/tranzicionális B sejteket (CD19+IgD+CD24<sup>magas</sup>CD38<sup>magas</sup>),

érett, naiv B sejteket (CD19+IgD+CD24+CD38+), illetve a memória B limfocitákat (korai formák: CD19+IgD+CD24<sup>+magas</sup>CD38-, késői formák: CD19+IgD+CD24-CD38-). A CD21 és CD86 markerekkel pedig az aktivált B sejtek (CD19+IgD+CD21+CD86+) és az ellenanyagtermelő plazma sejtek (CD19+IgD+CD21<sup>alacsony</sup>CD86+) frakciója kerültek meghatározásra.

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.

### **Eredmények**

A vizsgált gének (DDB2, GADD45, SESN1, FDXR, MDM2) expressziós szintjét qRT-PCR segítségével vizsgáltuk a sugárterápia előtt, közvetlenül az utolsó frakció leadása után, majd egy hónappal később. Az FDXR, GADD45, DDB2 és az MDM2 gének expressziója szignifikánsan megnőtt, míg a SESN1 gén expressziója szignifikánsan 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, azonban a három másik gén expressziós szintje megváltozott szinten maradt, amely egy hosszan tartó, sugárzás-indukálta gén expressziós szabályozási zavarra utalhat.

A nagy áteresztőképességű plazma fehérje profil vizsgálat célja egy szemikvantitatív 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 Acrp30, BAFF, ENA-78, C5a növekvő, míg az ApoA1, CD105 és TFF3 csökkenő tendenciát mutat a terápia utáni időpontokban. A TFF3 fehérje esetében a változás közel szignifikáns volt közvetlen a terápia utáni időpontban.

A protein-array eredmények alapján a fej-nyaki daganatos betegek (n=23) vérplazmájában szignifikánsan változott fehérjéket szendvics ELISA technika segítségével validáltuk. A kezelés előtti időpontban az ApoA1 és az endoglin fehérje szintje szignifikánsan 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 szignifikánsan 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.

A veleszületett és adaptív immunrendszer sejtjes elemeinek változása fej-nyaki daganatos betegek

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 keringő CD4+ limfociták homeosztázisa károsodott, amely egy hónappal a terápia után sem normalizálódott. 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 mindkét terápia utáni időpontban.

Vizsgáltuk a T limfociták proliferációs képességének és aktivációs állapotuknak a változását. A Ki67 sejtmagi marker 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. Érdekességképpen kiemelendő, hogy egy hónappal a kezelést követően kettévál a CD4+ limfociták csoportja: a betegek 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 ( $p=0,0196$ ) tudunk kimutatni. 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. 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. A CD39 sejt felszíni marker a Treg sejtekre jellemző funkcionális marker, amellyel az effektor T sejtek apoptózist 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 alacsony maradt a kontroll csoporthoz képest. Összehasonlítottuk a CTLA4+ sejtek arányát a teljes CD4+ T limfociták csoportjában, illetve a FoxP3+ regulátor, és a FoxP3- effektor T sejtek 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. A PD1 markerhez hasonlóan a CTLA4 aránya magasabb volt a Ki67-et magasabban expresszáló betegekben, azonban a két betegcsoport között itt sem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni.

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, amely egy hónappal a kezelést követően is magasán kontroll szint felett maradt. Vizsgáltuk a mieloid eredetű szuppresszor sejtek arányát, amely szignifikánsan alacsonyabb volt a betegekben kezelés előtt a kontroll csoporthoz képest, azonban 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 veleszületett és adaptív immunrendszer sejtes elemeinek összehasonlítása a négy prosztata daganatos betegcsoportban

Vizsgáltuk a makrofágokba aktív fagocitózissal bekerülő PSA szintjét is, amely mind a négy betegcsoportban 2-szeresen, szignifikánsan megemelkedett már terápia előtt (~7,6%) a kontroll csoporthoz képest ( $3,83\% \pm 3,01\%$ ). Három évvel a kezelést követően továbbra is szignifikánsan magasabb szinten maradt minden csoportban a kontrollhoz képest. Vizsgáltuk a kezelés előtti plazma PSA szint, és szintén kezelés előtti PSA+ makrofágok szintje közötti összefüggést Spearman-féle korrelációs teszt segítségével. Eredményképpen elmondható, hogy 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.

Vizsgáltuk a perifériás vérben keringő dendritikus sejtek két funkcionális alcsoportját (mieloid, limfoid), egyik csoport szintje sem mutatott szignifikáns változást a betegekben kezelés előtt, a kontroll csoporthoz viszonyítva. Azonban terápia után a limfoid DC-k aránya szignifikánsan lecsökkent, és szintjük 36 hónappal később is alacsony szinten marad (kivéve a Kiber-kés terápiás csoportot). 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.

Meghatároztuk a perifériás vérben keringő, CD3-CD16+CD56+ NK sejtek szintjét, amely mind a négy csoportban csökkenő tendenciát mutatott a kontrollhoz képest ( $76,45\% \pm 12,77\%$ ). Három évvel a kezelést követően csak a teleterápiás csoportban maradt szignifikánsan alacsonyan az NK sejtek frakciója ( $62,17\% \pm 20,44\%$ ), a többi betegben szintje normalizálódott. Ezután vizsgáltuk az NK sejtek különböző érési és funkcionális alcsoportjait, és összehasonlítottuk a változásokat a négy betegcsoportban. Az éretlen prekurzor NK sejtek aránya nem mutatott szignifikáns eltérést a betegekben a kezelés előtt a kontroll csoporthoz képest. Csak a teleterápiás csoportban nőtt meg terápia után szignifikánsan míg a két brachyterápiás csoportban arányuk nem szignifikánsan emelkedett. Ezzel szemben az éretlen/korai érett NK sejtek frakciója ~1,8-szorosan megemelkedett mind a négy betegcsoportban a kontroll csoport átlagához képest ( $1,83\% \pm 0,89\%$ ), amely még három évvel a kezelést követően is ezen az emelkedett szinten maradt. Az érett, citotoxikus NK sejtek frakciója ezzel

párhuzamosan szignifikánsan lecsökkent minden betegcsoportban (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 ( $70,18\% \pm 12,45\%$ ), azonban 36 hónappal a terápia után a teleterápiás csoportot leszámítva normalizálódott. A degranulált és anergikus 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. Az osztódó Ki67+ éretlen prekurzorok ~3,5-szörös, míg a Ki67+ éretlen/korai érett NK sejtek aránya ~5-szörös, szignifikáns növekedést mutatott a betegekben a kontroll csoporthoz képest a kezelés megkezdése előtt és magas szinten maradt 36 hónappal a kezelés után is. Az osztódó érett NK sejtek aránya azonban nem változott szignifikánsan egyik betegcsoportban sem a nyomon követés ideje alatt. A degranulált NK sejtek osztódási kinetikája kezelés előtt ~2-szeresen, szignifikánsan magasabb volt a betegekben a kontroll csoporthoz képest ( $6,48\% \pm 7,985$ ), azonban három évvel a terápia vége után minden betegben kontroll szint köré csökkent a sejtek aránya. Az anergikus NK sejtek osztódási képessége a kontrollhoz képest szignifikánsan lecsökkent a betegekben.

Megvizsgáltuk a teljes limfociták csoportját, illetve azon belül a CD4+ és a CD8+ frakciót, valamint ezen limfociták arányát, amely nagyon fontos mutatója az immunrendszer állapotának és működésének. Az arányszám a kontroll csoportban megállapított 1,52 értéknél minden beteg csoportban és időpontban alacsonyabb volt. 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. A CD3+CD4-CD8- dupla negatív T sejtek szintje a kontroll csoporthoz képest ( $5,48\% \pm 2,86\%$ ) csak a HDR csoportban nőtt meg, és terápia utáni későbbi időpontokban is szignifikánsan magas maradt a szintje. Ezen kívül csak a teleterápiás csoportban nőtt meg szignifikánsan az arányuk hat hónappal később.

Vizsgáltuk az immunhomeosztázis fenntartásában fontos szerepet játszó Treg sejtek három alcsoportját. A CD4+FoxP3+ Treg sejtek aránya a kontroll csoporthoz ( $0,86\% \pm 0,64\%$ ) képest több, mint kétszeresen megemelkedett a betegekben kezelés előtt (LDR:  $2,22\% \pm 0,79\%$ ; HDR:  $2,26\% \pm 0,54\%$ ; teleterápia:  $1,98\% \pm 0,54\%$ ; Kiber-kés:  $2,31\% \pm 0,53\%$ ), és mind a négy csoportban szignifikánsan magas szinten maradt még három évvel a kezelést követően. Ezzel szemben a CD127<sup>alacsony</sup>/-CD25<sup>magas</sup>

fenotípusú Treg sejtek aránya kisebb mértékben, és közvetlenül a kezelés után nőtt meg a kontrollhoz képest ( $1,16\% \pm 0,44\%$ ) szignifikánsan a HDR ( $1,93\% \pm 1,75\%$ ), a teleterápiás ( $1,92\% \pm 1,52\%$ ) és a Kiber-kés terápiás csoportban ( $1,54\% \pm 0,58\%$ ). Három évvel a terápia után szintje a teleterápiás és a Kiber-kés terápiás csoportban maradt szignifikánsan magas. A CD8+FoxP3+ Treg sejtek frakciója nem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest ( $0,41\% \pm 0,28\%$ ) a betegekben kezelés előtt (LDR:  $0,40\% \pm 0,14\%$ ; HDR:  $0,41\% \pm 0,21\%$ ; teleterápia:  $0,35\% \pm 0,12\%$ ; Kiber-kés:  $0,43\% \pm 0,15\%$ ). 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. Vizsgáltuk a FoxP3+/FoxP3- arányt mind a CD4+, mind a CD8+ T limfocita csoporton belül. Mind a négy betegcsoportban szignifikánsan megemelkedett a FoxP3+ sejtek aránya a CD4+ és CD8+ limfocitákon belül. A CTLA4+CD4+ T sejtek aránya a kontroll átlagához képest nem változott a betegekben kezelés előtt, sem a nyomon követés ideje alatt. Ezután megvizsgáltuk az osztódó CD4+ Treg sejtek frakcióját, amely szignifikánsan megnőtt a kontrollhoz képest ( $27,53\% \pm 8,65\%$ ) mind a négy betegcsoportban a terápia előtt (LDR:  $39,61\% \pm 8,65\%$ ; HDR:  $38,53\% \pm 7,92\%$ ; teleterápia:  $41,41\% \pm 10,44\%$ ; Kiber-kés:  $38,24\% \pm 14,52\%$ ), és közvetlen a terápia után is ezen a szinten detektáltuk. Ezzel szemben az osztódó CD8+ Treg sejtek szintje nem változott szignifikánsan a betegekben a kontroll csoporthoz képest sem kezelés előtt, sem azután.

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 három évvel később is emelkedett maradt. A 2B4+CD4+ T limfociták aránya 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 szignifikánsan magas maradt. 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%), míg a CD160 receptor expressziója nem változott szignifikánsan egyik betegcsoportban sem.

Vizsgáltuk a T limfociták CD28 és CD57 sejtfelszíni receptoraik segítségével beazonosított négy különböző funkcionális alcsoportját. Legnagyobb mértékben a korai és véglegesen differenciálódott szenescens CD4+ és CD8+ 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 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. Spearman-féle rang-korreláció segítségével pozitív összefüggést kaptunk a perifériás vér limfocitáiban az ionizáló sugárzás hatására kialakult, közvetlenül a sugárterápia után meghatározott kromoszóma-aberrációk száma és a limfociták szenescens irányban eltolódott immunfenotípusa között mind a négy betegcsoportban.

Vizsgáltuk a CD3+CD4+ és a CD3+CD8+ T limfociták csoportján belül a memória T sejtek alcsoportjait. Szignifikáns arány eltérést 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.

### **Következtetések**

- Egyedülálló részletességgel kidolgozott, a fej-nyaki és prosztatás 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 összehasonlítani 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 dózisszintű 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 betegeknél 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 fennmaradt szénésztercens 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.
- 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.

- Sikerült 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 sejtjei 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 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.

## 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. Ressler, 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*.