

Az ionizáló sugárzás hatása az immunrendszerre

Doktori értekezés

Persa Eszter

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lumniczky Katalin, PhD, osztályvezető főorvos

Hivatalos bírálók: Dr. Pállinger Éva, PhD, egyetemi docens
Dr. Balogh Lajos, PhD, csoportvezető

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Cseh Károly, DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lövey József, PhD, egyetemi docens
Dr. Voszka István, PhD, egyetemi adjunktus

Budapest
2018

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	6
2.1. Az ionizáló sugárzás biológiai hatásai	6
2.1.1. A sugárzás elsődleges célpontja a sejtben	6
2.1.2. Determinisztikus és sztochasztikus hatások	7
2.1.3. A kis dózisú sugárzás hatásai	8
2.1.4. A sugárzás célzott és nem célzott hatásai	9
2.1.5. Az extracelluláris vezikulák szerepe a bystander hatás közvetítésében	12
2.2. Az immunrendszer sejtjes elemei és az immunválasz kialakulása	15
2.2.1. A dendritikus sejtek (DC) és a T-sejtek	15
2.2.2. Az immunológiai szinapszis (IS)	17
2.2.3. A regulátor T-sejtek (Treg)	18
2.2.4. A természetes ölősejtek (NK sejtek)	20
2.2.5. A B-sejtek	20
3. Célkitűzések	22
4. Módszerek	23
4.1. Kísérleti állatok és kezelésük menete	23
4.2. Teljes vér kinyerése az egerekből és a fehérje profil meghatározása	24
4.3. Immunsejtek izolálása lépből	25
4.4. Lépsejtpopulációk jellemzése	26
4.5. Apoptózis mérése	27
4.6. γ H2AX assay	28
4.7. Sejtosztódás vizsgálata	28
4.8. Citokin génkifejeződés kimutatása	29
4.9. A CD4+Foxp3- sejtek CFSE jelölése	31
4.10. T sejtek proliferáció-gátlásának vizsgálata	31
4.11. DC sejtek antigénfelvételének és antigénbemutatásának vizsgálata	32
4.12. EV-k izolálása, validálása és az i.v. transzfer	32
4.13. A csontvelői és plazma EV-k miRNS profiljának meghatározása	34
4.13.1. miRNS profil meghatározása	34

4.13.2. miRNS array adatainak kiértékelése	34
4.14. Statisztikai elemzés.....	35
5. Eredmények.....	36
5.1. Sugárzás-indukálta apoptózis lépsejteken	36
5.1.1. A lépsejt alpopulációk eltérő mértékben pusztulnak besugárzás után	36
5.1.2. A Treg sejtek sugárrezisztensek.....	39
5.2. Sugárzás hatása a lépsejt alpopulációk arányainak változására.....	40
5.2.1. A lépsejt alpopulációk mennyisége sejttypusonként eltérően változik besugárzás után	40
5.2.2. Treg sejtek sugárrezisztenciájának lehetséges okai	44
5.3. A besugárzás megváltoztatja a lépsejtek citokin génexpresszióját.....	47
5.4. Treg sejtek funkcionális változása 2Gy besugárzás hatására	50
5.5. DC-k funkcionális változása 2Gy besugárzás hatására	54
5.6. Az izolált EV-k exoszómák és mikrovezikulumok	57
5.7. EV transzfer megváltoztatta a lépsejt alpopulációk arányát	59
5.8. In vivo EV transzfer hatására megnőtt a lépsejtekben a γ H2AX fókuszok aránya	62
5.9. EV transzfer megváltoztatta a vérben lévő fehérjék arányát	64
5.10. A besugárzás hatással van az EV-k miRNS tartalmára – a csontvelőben és a perifériás vérben is.....	65
5.10.1. Azonos miRNS-ek érintettek kis és nagy dózisú besugárzás után.....	65
5.10.2. Az EV transzfer okozta változások összefüggnek az általuk közvetített miRNS-ek jelátviteli célpontjaival	67
5.10.3. A kis és nagy dózisú besugárzás után nyert vérplazma EV-k miRNS-ei ugyanazokat a jelátviteli útvonalakat szabályozzák.....	69
5.10.4. A csontvelői és plazma EV-k különböző miRNS-eket tartalmaznak, amik azonos jelátviteli útvonalakat szabályoznak	71
6. Megbeszélés	73
8. Összefoglalás.....	94
9. Irodalomjegyzék	96
10. Saját közlemények jegyzéke.....	126
11. Köszönetnyilvánítás	127

1. Rövidítések jegyzéke

AML = akut mieloid leukémia

B7-H1 = B7 homológ 1

BE = szomszédsági vagy bystander hatás

CFSE = karboxifluoreszcein szuccinimidil észter

DAB = 3,3-diamino benzidin

DC = dendritikus sejt

DLS = dinamikus fényszórás

EV = extracelluláris vezikula

FACS = áramlásos citométer

Foxo = Forkhead box O

Foxp3 = forkhead box P3

GARP = glycoprotein A repetitions predominant

GI = genom instabilitás

GITR = glukokortikoid-indukált TNF receptorhoz kapcsolódó protein

GO = Gene Ontology

HRP = tormaperoxidáz

HTLV = humán T-sejt limfotropikus vírus

IDO = indolamin-2,3-dioxigenáz

IL = interleukin

i.p.; i.v. = intraperitoneális; intravénás

IS= immunológiai szinapszis

KEGG = Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LNT = lineáris, küszöbdózis nélküli

LPS = lipopoliszaharid

MAPK = mitogén-aktiválta protein kináz

MHC = fő hisztokompatibilitási faktor

mRNS; miRNS, miR = messenger RNS; mikro RNS

MV = mikrovezikula

NF κ B = nuclear factor κ B

NK sejt = természetes ölősejt

PD-1 = programozott sejthalál protein 1

PI3K = foszfo-inozítid-3-kináz

pTreg = periférián átalakult regulátor T-sejt

PVDF = polivinilidin-fluorid

SDS-PAGE = nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid

TCR = T-sejt receptor

TEM = transzmissziós elektronmikroszkóp

TGF β = transforming growth factor β

TNF α = tumor necrosis factor α

Treg = regulátor T-sejt

tTreg = tímusz eredetű Treg sejtek

TUNEL = terminális deoxinukleotidil transzferáz-mediálta dUTP-biotin vég-jelölés

2. Bevezetés

2.1. *Az ionizáló sugárzás biológiai hatásai*

Az ionizáló sugárzás olyan energiaközlés, amely képes a vele kölcsönhatásba lépő atomokat gerjeszteni, vagy róluk elektront leszakítva ionizálni. Az ember folyamatosan ki van téve külső és belső sugárterhelésnek. A külső sugárterhelés során a sugárforrás az emberi szervezeten kívül van, a belső sugárterhelés során a levegőből vagy a tápláléklánc elemein keresztül a sugárforrás a szervezeten belülre kerül. A sugárterhelések két fő forrásból származhatnak. A természetes eredetű háttérsugárzást az emberi tevékenység közvetlenül nem befolyásolja. A földkérgi radioaktív izotópok és a világűrbeli érkező kozmikus sugárzás tartoznak ebbe a körbe. Mesterséges eredetű sugárforrások azok, amiket az emberi tevékenység hoz létre. A mesterséges eredetű sugárexpozíció legnagyobb része az orvosi alkalmazásokból származik. Az orvosi sugaras alkalmazások száma az utóbbi évtizedekben ugrásszerűen megnőtt, 1997 és 2006 között hatszorosára emelkedett, és ez a tendencia folytatódik (Brenner és Hall 2007). Bár ennek jelentősége egyre jobban ismertté válik, a diagnosztikai és terápiás célú sugárexpozícióra vonatkozóan nem lehet dóziskorlátot megszabni, itt a sugárexpozíció mértékének a csökkentését más módszerekkel lehet elérni: olyan vizsgálati és terápiás technikákat, beállításokat kell alkalmazni, amely az adott betegre vonatkoztatva a lehető legkisebb sugárterheléssel járnak, illetve törekedni kell a felesleges, vagy orvosi szempontból nem feltétlenül indokolt vizsgálatok mellőzésére.

2.1.1. A sugárzás elsődleges célpontja a sejtben

Az ionizáló sugárzás sejtben belüli célpontja elsődlegesen a DNS. A sugárzás hatására bármilyen DNS károsodás kialakulhat, mint például egy- vagy kétláncú DNS-törések, DNS-DNS keresztkötések, DNS-fehérje kötések, de a sugárzásra a legjellemzőbb DNS károsodás típus a DNS kettős lánc törések. A sejtek sorsa azon múlik, hogy ezeket a hibákat ki tudják-e javítani a következő osztódási ciklus előtt. Nyugvó sejtek a DNS-törésekkel (ha csak nem jár létfontosságú gén kiesésével) képesek együtt élni, még akkor is, ha a hibát nem tudják kijavítani. Intenzíven osztódó sejtek viszont elpusztulnak (legnagyobb részük mitotikus sejthalállal). Habár megkísérlik a sejtosztódást, a felhalmozódó génhibák miatt végül képtelenek a sejtműködés

fenntartására. Kisebb részük a felhalmozódó mutációk ellenére túlélnek és ezeket a mutációkat az utódsejteknek továbbörökíthetik. A fentiekből következik, hogy differenciált, kifejtett sejtek (pl. idegsejtek) viszonylag sugárrezisztensek, a differenciálatlan és osztódó őssejtek (pl. csontvelői őssejtek) pedig sugárérzékenyek. Van azonban néhány differenciált, nyugalmi állapotban lévő sejtípus, amely kifejezetten sugárérzékeny (pl. limfociták), és sugárhatásra az osztódás megkísérlése nélkül, apoptózissal pusztul el (Newton és Strasser 2000).

2.1.2. Determinisztikus és sztochasztikus hatások

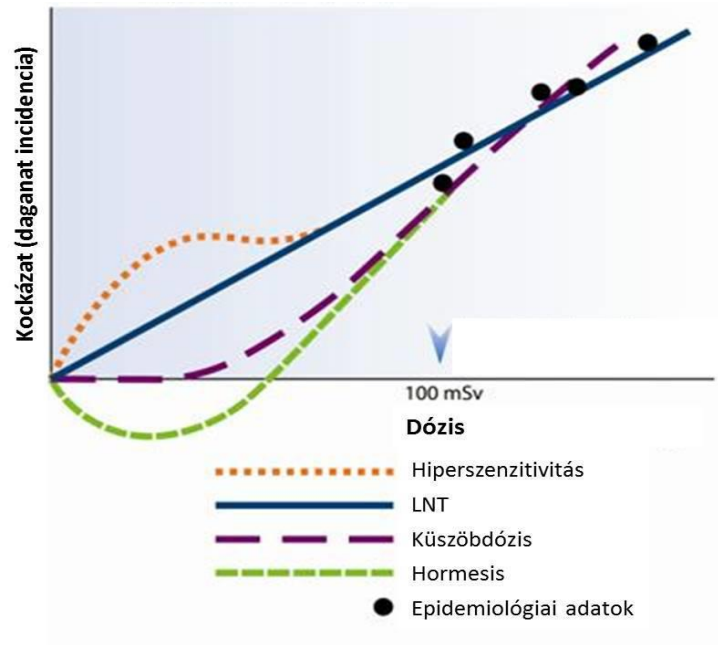
Az ionizáló sugárzás hatása a szervezet egészére nézve determinisztikus vagy sztochasztikus lehet. A *determinisztikus hatás* hátterében a nagyfokú sejtpusztulás áll. Klinikai tünetek egy bizonyos küszöbdózis felett mindig megjelennek és a dózis növekedésével a tünetek súlyossága fokozódik. A küszöbdózis nagysága az egyes szervekre, szövetekre jellemző és azok sugárérzékenységétől függ. A sugárhatást követő korai szövetkárosodások mind determinisztikusak. Ilyen a nagy dózisu besugárzás után megjelenő, az egyes szervrendszereket érintő akut sugárbetegség, mely csontvelői szindróma, gasztrointesztinális, illetve központi idegrendszeri szindrómák formájában jelenik meg az elszenvedett dózis nagyságától függően. Determinisztikus hatások a lokális besugárzás hatására kialakuló akut sugársérülések is, melyek a krónikus sugárdermatitisz, szürkehályog, vagy a magzatot érő besugárzás esetén különböző teratogén elváltozások. A *sztochasztikus hatások* statisztikai valószínűség szerint megjelenő hatások. A hatás kialakulásának valószínűsége az elszenvedett dózis nagyságával arányos. Ez esetben küszöbdózisról nem beszélhetünk, még egyetlen sugártalálat is – igen kis valószínűséggel, de - okozhat hatást. A sztochasztikus hatás a sejtekben sugárzás következtében létrejövő mutációk eredménye. A változások a besugárzást követő későbbi időpontokban, évek, akár évtizedek múlva várhatóak (daganatos megbetegedések formájában), és a következő generáció(k)ban is megjelenhetnek (ha az ivarsejteket érő mutációkról van szó). Előbbi esetben azt mondhatjuk, hogy az elszenvedett dózis a daganatos incidenciát növeli meg. Hangsúlyozni kell, hogy míg a determinisztikus hatások biológiai módszerekkel kimutathatók, a sztochasztikus hatások csak epidemiológiai módszerekkel mérhetők. A küszöbdózis nélküli jellegből következik, hogy bármilyen kis dózis okozhat hatást, ezért

a sugárvédelem alapvető törekvése ezen kockázatok minimalizálása, a sugárterhelés mértékének az ésszerűen elfogadható legalacsonyabb szintre való szorítása.

2.1.3. A kis dózisú sugárzás hatásai

A *kis dózisok* tartományának meghatározása máig vitatott területe a sugárbiológiának, ugyanakkor a nemzetközi szakirodalom adhat támpontot, megállapodás szerint a 100 mGy dózis alatti tartományt tekinthetjük kis dózisoknak. A sztochasztikus hatások jellemzésére és a sugárvédelemben a dóziskorlát meghatározására az ún. lineáris, küszöbdózis nélküli modellt (LNT) alkalmazzák. Ez alapján a kis dózisok biológiai hatását a nagy dózisokból levezetve, extrapolálva kapjuk meg. A megközelítés lineáris összefüggést feltételez, ám az utóbbi évek intenzív kutatásai alapján a relatív kockázatnövekedés nem egyértelműen mutat ilyen összefüggést a dózis nagyságával (1. ábra). A görbe lefutása a tudományos irodalomban megjelent eredmények alapján többféle jelleget mutathat, és négy különböző modellel jellemezhető. Az első modell a sugárzás kis dózisú tartományában mérhető hiperszenzitivitást alapul véve a lineáristól eltérően magasabb kockázatot jósol. A második az említett LNT modell. A harmadik a küszöbdózis modell, mely szerint egy bizonyos dózis alatt nincs kockázata a sugárzásnak. A negyedik modell a hormesis modell, mely a kis dózisú sugárzásnak előnyt, hasznot tulajdonít.

Látjuk tehát, hogy a kis dózisok biológiai hatásai kevésbé egyértelműek, és a tudományterület évek óta a sugárbiológiai kutatások középpontjában áll. A téma jelentőségét mutatja az orvosi sugaras diagnosztikai berendezések használatának elterjedése, melyek alkalmazása során az elszennvedett dózis néhány μSv -tól, eljárástól függően akár 50 mSv is lehet. A sugárexpozícióval járó orvosi alkalmazások népszerűségének köszönhetően a lakosság sugárterhelése évről évre nő. Fontos megjegyezni, hogy mind a klinikum, mind a sugárbiológiai kutatások, mind a gyakorlati sugárvédelem más-más nézőpontból és hozzáállással közelítenek a kérdéskörhöz, és emiatt lehet, hogy gyakran egymásnak ellentmondó eredmények jelennek meg a szakirodalomban a kis dózisok káros vagy jótékony hatását illetően. A kis dózisok hatásának tanulmányozása során több új biológiai mechanizmusra derült fény, amelyek számba vételét és tisztázását fontosnak tartom, és a következő alfejezetben részletezem.



1. ábra. A kis dózisú ionizáló sugárzás lehetséges kockázatait és előnyeit. A 4 modell különböző hatást feltételez, a hiperszenzitivitás a kis dózisú besugárzás káros, a hormesis pedig hasznos végkimenetelét jósolja. (Az eredeti kép forrása: Canadian Nuclear Safety Commission)

2.1.4. A sugárzás célzott és nem célzott hatásai

A sugárzás elsődleges célpontja a DNS. A DNS-károsodásokat és az ennek következtében kialakuló folyamatokat a sejten *DNS célpontú válaszoknak* nevezzük. Újabban egyre nagyobb jelentőséget tulajdonít a tudomány a *nem DNS célpontú válaszoknak*. A DNS károsodása nélkül aktiválódó különböző jelátviteli útvonalak, melyeket a sugárzás indukál, közel olyan jelentőséggel bírnak, mint a közvetlen DNS-károsodás (Georgakilas és mtsai. 2015).

A sugárzás hatását nem csak a sugártalálalatot elszenvedett sejten tapasztalhatjuk, hanem annak utódsejtjein, vagy annak közvetlen vagy tágabb környezetében lévő sejteken is. Előbbi hatást a sugárzás *célzott*, utóbbit *nem célzott hatásainak* nevezzük. A nem-célzott hatások felfedezése a kutatások fókuszát a tisztán DNS-célpontú megközelítésről a sokkal dinamikusabban változó rendszerek felé fordította, így a sejten belüli válaszok, a mikro- és makrokörnyezet változása, és a szervezetszintű (szisztémás) hatások

legalább olyan fontossá váltak, mint az ionizáló sugárzás közvetlen sejtkárosító hatása (Kadhim és mtsai. 2013, Martin és mtsai. 2009). A sugárzás-indukálta gyulladást elősegítő és gyulladásgátló hatások a közvetlen DNS-károsodásokkal egyenlő súlyúak a szervezetben és a kialakulásukért felelős molekuláris útvonalak tanulmányozása intenzíven folyik. Egy újabb átfogó vizsgálat több gén és útvonal kapcsolatát írta le a sugárzással összefüggésben. A sugárválaszban résztvevő immunológiai folyamatokban szerepet játszik a transforming growth factor β (TGF β) jelátviteli útvonal, az interleukin útvonal, illetve a nuclear factor κ B (NF κ B) mint kulcsfontosságú transzkripciós faktor, és a DNS-károsodások javítását irányító mikro RNS-ek (miRNS) szerepét is megerősítették (Georgakilas és mtsai. 2015). Candeias és Testard összefoglaló cikkükben a sugárzás hatására kialakuló immunválaszban a toll-like receptorok (TLR) és a gyulladásos citokinek aktivációjában szerepet játszó NF κ B és p53 gének fontosságát hangsúlyozzák (Candeias és Testard 2015).

A sugárzás nem-célzott hatásai között a *genom instabilitást* (GI) és a *szomszédsági vagy bystander hatást* (BE) (annak részeként az *abszkopális hatást* és az *adaptív választ*) említhetjük (Kadhim és mtsai. 2013). A GI-t és a BE-t nem csak a sugárhatásra bekövetkező DNS sérülések válthatják ki, hanem akkor is kialakulhatnak, ha a sugárzás csak a citoplazmát éri (Tartier és mtsai. 2007), vagyis a nem célzott hatások létrejöttében a nem DNS célpontú válaszoknak is szerepe lehet.

Az utóbbi években bebizonyosodott, hogy a látszólag egészséges, sugárzás által nem károsodott sejtek is hordozhatnak elváltozásokat. A sugárzás közvetlenül vagy közvetett módon (szomszéd) érte sejtek egy részében később, akár 40-50 generáció múlva (az utódsejtjeiben) is megnőhet a spontán mutációk gyakorisága, vagyis a sugárzás a genom instabilitását okozhatja (Little 2003). A GI már kis dózisok hatására is kimutatható, de kialakulásának a pontos mechanizmusa még nem ismert.

A sugárzás-indukálta BE azokban a sejtekben alakul ki, melyeket nem érte közvetlenül sugárzás. Beszélhetünk lokális BE-ről, amikor a sugártalálatot szenvedett sejt 5 mm-es környezetében található sejtekben alakul ki az elváltozás, és disztális vagy más néven szisztémás BE-ről, ha a sugártalálatot szenvedett sejttől legalább 5 cm-re vannak a bystander sejtek (Nikitaki és mtsai. 2016). A sugárzás-indukálta BE okozhat DNS-károsodást, a gén-expresszió megváltozását, apoptózist, vagy sejthalált is (Lorimore és

mtsai. 2001, Zhou és mtsai. 2002). A sugárzás-indukálta BE a kis dózisok tartományában is megjelenik (Nuta és Darroudi 2008). Közvetítésében olyan szolubilis faktorok játszanak szerepet, mint a TGF β , (interleukin-) IL6, IL8, tumor nekrozis faktor α (TNF α), reaktív oxigén gyökök vagy a miRNS-ek, amiket a sejtek az extracelluláris térbe bocsátanak (Chaudhry és mtsai. 2012). Fontos megjegyezni, hogy a BE aktiválhatja az immunrendszer sejtjeit, amelyek így eltávolíthatják a sérült sejteket is. Egy nemrég megjelent összefoglaló cikk több *in vivo* tanulmányt vetett egybe, melyeknél azt találta, hogy a BE-nek immunválaszt módosító hatása van, és számos jelátviteli útvonalat talált, amelyek a T-sejt aktivációval (vagy gátlással), az antigénbemutató sejtek és NK sejtek serkentésével állnak kapcsolatban (Hekim és mtsai. 2015).

A BE a sugárkezelések alkalmával is megfigyelhető az expozíciós mezőn kívül eső szöveteken, ez az ún. *absztróptális hatás* (Siva és mtsai. 2015). Az absztróptális hatást a sugárterápia következtében kialakuló szisztémás tumorelles hatás aktiválásaként írták le a klinikumban, ami végeredményben a tumor összezsugorodásához vezet (Brix és mtsai. 2017). Kiderült, hogy a kialakulásáért az immunrendszer tumorelles aktivitása áll (Demaria és mtsai. 2004), emiatt immunogén tumorok és kombinált terápia során figyelhető meg leginkább (Reynders és mtsai. 2015).

Az utóbbi években több tanulmány kimutatta, hogy ha egy sejtet kis dózissal besugárzzák, majd utána rövid időn belül egy nagy dózissal, akkor a nagy dózis károsító hatása kisebb lesz, mintha a sejtet egyből csak a nagy dózissal sugárzták volna be. Ezt nevezik *sugáradaptációnak* (Wolff 1998, Luo-Owen és mtsai. 2012). Az adaptív válasz legvalószínűbb magyarázata, hogy a kis dózissal besugárzás aktiválja a sejt hibajavító mechanizmusait.

A sugárzás nem célzott hatásainak felismerése egyértelművé tette, hogy a sugárzás sokkal több sejt működését és túlélését befolyásolja, mint amennyit a célzott hatások elve szerint várnánk. A nem célzott hatásoknak a kis dózisok tartományában nagyobb jelentősége lehet, hiszen ezek függetlenek a dózistól és a sugárérzékenységtől (Joiner és mtsai. 2009). Mindezek a megfigyelések fontos következményekkel járhatnak a sugárvédelem szempontjából, így valamelyest megkérdőjelezzük a lineáris, küszöbdózis

nélküli modell létjogosultságát a kis dózisok tartományában. A kis dózisok biológiai hatásainak tisztázására tehát további vizsgálatokra van szükség.

2.1.5. Az extracelluláris vezikulák szerepe a bystander hatás közvetítésében

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) membránnal határolt testek, melyeket a sejtek aktívan bocsátanak ki az extracelluláris térbe, ahonnan más sejtek felveszik azokat. Méretük és a szervezeten belüli eloszlásuk alapján az EV-ket elkülöníthetjük exoszómákra (50-100 nm átmérőjű vezikulák), mikrovezikulákra (MV) (100-1000 nm átmérőjű membránnal határolt részecskék) és apoptotikus testekre (1000-5000 nm átmérőjű testek, melyek az apoptózis során válnak le) (El Andaloussi és mtsai. 2013). Az extracelluláris vezikulák (EV) elkülönítésénél a méret mellett fontos tényező az eredet és a leírt szerep. Az exoszómák homogén csoport, kis vezikulák, melyek endocitotikus eredetűek, vagyis a sejten belüli „újrafeldolgozási” útvonal részei, így jellegükből adódóan a legtöbb sejt termeli. Az endocitózis során az endocitotikus vezikula a plazmamembránnal egyesülve alakítja ki a korai endoszómát, mely később késői endoszómává alakul. Az exoszómák az intracelluláris tér felől a késői endoszómába befűződéssel keletkeznek, így kialakítva az ún. multivezikuláris testet. A multivezikuláris testek egy része nem lizoszómával egyesülve megemésztődik, hanem tartalmát a plazmamembránnal fuzionálva kiüríti a sejten kívülre (Pant és mtsai. 2012). Az exoszómák biogenezéséhez, fehérje-szállítmányának kiválogatásához és sejtől kijuttatásához szükségesek olyan fehérjék, mint az ESCRT-komplex (Raiborg és Stenmark 2009) vagy a TSG101 (Nabhan és mtsai. 2012), melyekkel jellemezhetők. Az exoszómák kibocsátását immunsejtekkel (Théry és mtsai. 2009) és tumorsejtekkel kapcsolatban írták le. Ezzel ellentétben az MV-k nem csak nagyobb, de sokkal heterogénebb csoportja is az EV-knek. A MV-k közvetlen membránlefűződéssel keletkeznek és jutnak ki az extracelluláris térbe, és így a vezikulák felszíni markerei annak a sejtnak a felszíni marker-összetételét tükrözik, amelyből származnak (Baj-Krzyworzeka és mtsai. 2006). Az MV-k eltávolítják a sejtekből pl. hibásan feltekeredett fehérjéket, metabolikus melléktermékeket vagy citotoxikus ágenseket. Spontán kibocsátása tumorsejtekre jellemző csak (Smalley és mtsai. 2008), egészséges sejtekben sejt felszíni receptorok aktiválása vagy apoptózis során indukálódik MV-termelés (Kahner és mtsai. 2008). Mind az exoszómák, mind az MV-k messenger RNS-eket

(mRNS-eket), miRNS-eket, fehérjéket és lipideket szállítanak a recipiens sejtnak (Hurley és mtsai. 2010). A genetikai anyag horizontális transzferjével az exoszómák és MV-k részt vesznek a sejt-sejt közötti kommunikációban. Az EV-k tartalma függ a termelő sejt típusától, metabolikus állapotától és az őt ért stimulusoktól. Az EV-k így szerepet játszhatnak olyan fiziológiás folyamatokban, mint a T-sejtek aktiválása (Théry és mtsai. 2002), immuntolerancia kiváltása (Shen és mtsai. 2017), regulátor T-sejtek (Treg-ek) aktiválása (Chen és mtsai. 2016), gyulladások (Bourdonnay és mtsai. 2015) vagy gyulladás csökkentő (Kim és mtsai. 2005) hatásuk lehet, valamint pro-apoptotikus jelzéseket közvetíthetnek (Beloribi és mtsai. 2012), illetve szerepet játszhatnak a vaszkularizációban és a tumorsejtek növekedésének és migrációjának indukálásában is (Grange és mtsai. 2011). Egyre több olyan közlemény jelenik meg, amely az EV-k szerepét hangsúlyozza a sugárzás-indukálta BE kialakulásában (Al-Mayah és mtsai. 2015, Jella és mtsai. 2014, Xu és mtsai. 2015), jóllehet ezek a tanulmányok *in vitro* kísérletekre hivatkoznak.

A miRNS-ek evolúciósan konzerváltak, kicsi (kb. 22 nukleotid hosszú) nem-kódoló RNS-ek, melyek a biológiai folyamatok transzkripció és poszttranszkripció szabályozásáért felelősek (Catalanotto és mtsai. 2016). Korábban kimutatták, hogy az EV-k gazdag forrásai a miRNS-eknek, és mivel az EV-kben ezek a miRNS-ek membránnal körülvett vezikulákba vannak csomagolva sokkal ellenállóbbak az RNázokkal szemben, mintha szabadon lennének (Lötvall és Valadi 2007, Zhang és mtsai. 2015). Az EV-k miRNS-tartalma nem feltétlenül tükrözi az azt kibocsátó sejt miRNS-tartalmát, mivel néhány miRNS nagyobb arányban található meg az EV-kben (Ratajczak és mtsai. 2006, Valadi és mtsai. 2007, Skog és mtsai. 2008, Nolte és mtsai. 2012). Az EV-kbe kerülő miRNS-ek, melyeket különböző testfolyadékokból izoláltak, leginkább a különböző patofiziológiai állapotokat tükrözték, és jellegzetes mintázatot mutattak (Backes és mtsai. 2016). Ebből arra következtethetünk, hogy a miRNS-k specifikus csomagolása zajlik az EV-kben, nem véletlenszerű (Mittelbrunn és mtsai. 2011). Feltételezések szerint az EV-kbe kerülő RNS-ek olyan „motívumokat”, cisz-regulátor elemeket tartalmaznak, melyek alapján az EV-kbe kerülnek (Batagov és mtsai. 2011). Leírtak 3 olyan specifikus, miRNS-ekre jellemző motívumot is, amely a hnRNPA2B1 ribonukleoproteinhez való kötődést segítik elő, ez a fehérje az exoszómákban aktív (szumoilált) formában van jelen (Villarroya-Beltri és mtsai. 2013). A hnRNPA2B1

fehérjéről azt is leírták, hogy sugárzás hatására fokozódik a termelődése (Haley és mtsai. 2009). Ismerve azt, hogy a sejtből kibocsátott EV-k mennyisége sugárzás hatására megnő (Hazawa és mtsai. 2014), könnyen párhuzamot tudunk vonni a miRNS-ek EV-kbe való „csomagolásáért” felelős fehérje mennyiségének megnövekedése és a kibocsátott EV-k mennyisége között. Az említett miRNS-ekre jellemző exomotívumokhoz egy másik fehérje, a SYNCRIP is nagy affinitással kapcsolódik, amely az exoszómákba való miRNS-csomagolást irányíthatja; a génkiütött sejtvonalban a „csomagolás” gátolt (Santangelo és mtsai. 2016). Az utóbbi két fehérje (hnRNPA2B1 és SYNCRIP) együttműködését is megerősítették a folyamatban. Az ESCRT-II fehérjéről, mely az exoszómák képződésénél fontos szerepet tölt be, kiderült, hogy RNS-kötő tulajdonsággal is rendelkezik, ez alapján elméletileg lehet irányítója egy specifikus „csomagolásnak” (Irion és St Johnston 2007). Az ESCRT komplexhez az exoszómák keletkezésekor kapcsolódó Alix fehérjéről humán májössejtekben leírták, hogy az Ago2 miRNS-szállító fehérjéhez kapcsolódik (Iavello és mtsai. 2016). Ezek alapján mind a miRNS-ek specifikus szekvenciárészletei, mind a célbajuttatásukban szerepet játszó fehérjék specifikus kötődése elősegítheti a „tervezett csomagolást”. A miRNS-eket összefüggésbe hozták a sugárzás okozta szöveti válasszal (Korpela és mtsai. 2015) és a sugárzás-indukálta BE lehetséges közvetítőjeként írták le (Chaudhry és Omaruddin 2012, Dickey és mtsai. 2011, Koturbash és mtsai. 2007, Xu és mtsai. 2014). A miRNS-ek átfogó szerepét igazolta a sejtek sugárválaszában, hogy a miRNS-ek szintézisében kulcsszerepet játszó két polimeráz (Dicer és Drosha) „kiütése” a sugárzás-okozta DNS-károsodások javítását csökkentette a sejtekben (Francia és mtsai. 2012) és ezzel együtt megnőtt a sejtek sugárérzékenysége is (Kraemer és mtsai. 2011). Számos közlemény leírta, hogy a miRNS-eket mind a kis, mind a nagy dózisú besugárzás befolyásolja különböző szövetekben, így a hematopoetikus rendszerben is (Chaudhry és mtsai. 2012, Ilnytsky és mtsai. 2008, Wagner-Ecker és mtsai. 2010). Újabb tanulmányok feltételezik, hogy az EV-szállította miRNS-ek a sugárzás okozta hatások fontos közvetítői. Xu és mtsai. kimutatták, hogy miRNS-ek exoszómákon keresztül a besugározott sejtől a bystander sejtekbe átvivődni, és képesek a sugárzás-okozta BE-t közvetíteni *in vitro* rendszerben (Xu és mtsai. 2015). Al-Mayah és mtsai. leírták, hogy RNázokkal kezelve mind a sejt felülűszo, mind az exoszóma elveszti a képességét a BE és GI indukálására MCF7 sejtekben (Al-Mayah és mtsai. 2012).

2.2. *Az immunrendszer sejtjes elemei és az immunválasz kialakulása*

Az immunrendszer feladata, hogy az idegen és a megváltozott saját szerkezeteket felismerje a szervezetben, és ellenük aktív immunválaszt kialakítva elpusztítsa azokat.

2.2.1. A dendritikus sejtek (DC) és a T-sejtek

Az immunválasz első fázisában az idegen vagy megváltozott saját struktúrák a dendritikus sejtekkel (DC-k) kerülnek kapcsolatba. A DC-k az immunsejtek egy kisszámú csoportját alkotják, vérben előfordulásuk 0,2%-ra tehető, a szövetekben ez az arány még ennél is kisebb (Banchereau és Steinman 1998). Jelentőségük annál nagyobb, a DC-k a veleszületett immunrendszer leghatékonyabb antigén prezentáló sejtjei; képesek az idegen antigének felismerésére, feldolgozására és bemutatására, a T-sejtek aktiválására, az ellenanyag-termelés fokozására, és az immunológiai memória kialakítására és fenntartására. A „konvencionális” vagy mieloid DC-k CD11c+ sejtek, csontvelői eredetű őssejtekből alakulnak ki, és érésük során a perifériára, a szövetek közé vándorolnak. A legtöbb szövetben szóróványosan fordulnak elő, összefüggő hálózatokat csupán a külvilággal érintkező felületeken, légutak és bélcsatorna nyálkahártyáin alkotnak, illetve a bőr felszíni és mélyebb rétegeiben. Ezeknek a nyugvó, éretlen szöveti DC-knek a feladata a környezetből érkező molekulák felvétele és feldolgozása. Ehhez a sejtfelszíni mintázatfelismerő receptoraikat [(pl. DEC205, toll-like receptor 4 (TLR4)] használják. A felvételre (fagocitózisra) kerülő részecskék között találunk szöveti bomlástermékeket, előregedett, apoptózis, nekrozis vagy stresszhatás által elpusztult sejteket, tumorsejteket, valamint a külső környezetből bekerülő kórokozókat is. Meg kell jegyezni azonban, hogy a folytonos környezeti „mintavétel” ellenére a szervezetben a legtöbb DC nyugvó állapotban marad, nem aktiválódik. Az éretlen DC-ken az fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) kifejeződése kismértékű, és ko-stimulációs molekuláik [(cluster of differentiation) CD40/80/86] is alacsony mértékben expresszálódnak. Az aktiválódáshoz egyéb szöveti komponenseknek, citokineknek vagy különböző bomlástermékeknek a jelenléte szükséges. A nyálkahártya felszínek alatt megtelepedő DC-k aktiválódásuk után a felvett antigének részleges proteolízissel lebontott epitópját őrzik meg és fejezik ki, ezt a sejten belül „tárolva” és szállítva a környező nyirokcsomókba vándorolnak. A vándorlásuk során érettekké váló DC-k a nyirokcsomóba érkezve a funkcionálisan érett T-sejtekkel találkoznak. A

nyirokcsomókban lévő DC-k antigénfelvevő képessége már nem jelentős, viszont a T-sejtekkel kapcsolatba kerülve ezek lesznek az egyik leghatásosabb antigén bemutató sejtek. Antigénhez kötött MHC molekuláik nagy számban jelennek meg a sejtfelszínen a ko-stimulációs CD40/80/86 fehérjékkel együtt. A DC-k a feldolgozott antigéneket sejtfelszíni MHCI és MHCII molekuláikon keresztül mutatják be a sejtes immunválasz végrehajtó fázisában lévő T-sejteknek. Az immunválasz végrehajtó szakaszában részt vevő aktivált T-sejteket feladatuk miatt effektor T-sejteknek is nevezzük. A T-sejtek az idegen fehérjét ugyanis natív formában nem képesek felismerni, ehhez azok előzetes feldolgozására van szükség.

Az MHCI molekulán keresztül a citotoxikus CD8⁺ T-sejteket aktiválják, melyek direkt sejttölő hatású fehérjét (perforin, granzim-A és -B) kezdenek el termelni. Ezek az anyagok a megtámadott sejt hártáján rést képeznek, és ezzel utat nyitnak a sejtet lebontó enzimek számára (Zhang és Bevan 2011). Az aktiválódott CD8⁺ T-sejtek gyulladások kiváltó IFN γ citokint is termelnek, melynek tumorellenes hatása ismert (Schroder és mtsai. 2004). Tumoros környezetben a CD8⁺ T-sejtek közvetlenül a tumorsejtek felszínén megjelenő MHCI molekulákon keresztül is aktiválódnak (Martínez-Lostao és mtsai. 2015, Garrido és mtsai. 2017). Tumor specifikus CD8⁺ T-sejtek izolálhatók daganatok gyulladásos infiltrumaiból, és ezek a sejtek képesek azokat a daganatokat lizálni, amelyekből származnak (Mami-Chouaib és mtsai. 2002).

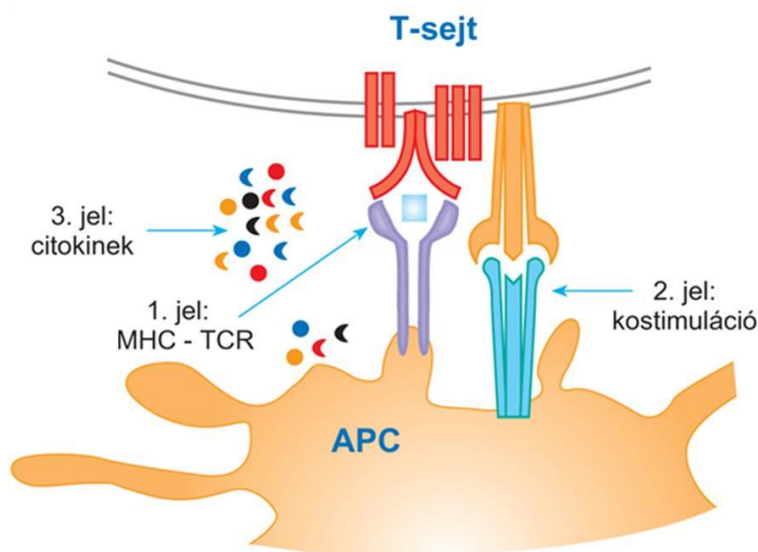
A DC-k az MHCII receptoron a CD4⁺ T-sejtek számára mutatják be a feldolgozott antigént. A T-sejtek aktiválódás után citokineket kezdenek termelni. Ezek a citokinek elősegítik a humorális immunválaszban szereplő B-sejtek ellenanyag-termelő plazmasejttéérését és a CD8⁺ T-sejtek pusztító aktivitásának kialakulását. TNF α és IFN γ citokinek termelésével fokozzák a tumorsejtek MHCI expresszióját, és így azok „láthatóbbá válnak” a CD8⁺ T-sejtek számára. Az aktivált CD4⁺ T-sejtek a DC-kérésére is visszahatnak, működésüket támogatják. Az érett DC-k citokineket is termelnek; amelyek például a gyulladásos millió kialakulásáért felelős CD4⁺ T-sejteket aktiválják vagy a T-sejtek differenciálódásáért felelősek. Az aktiválódó T-sejtek a nyirokcsomót elhagyva aztán abba a szövetbe vándorolnak, ahol az aktivációjukat kiváltó fertőzött vagy tumoros sejt van, ott fejtik ki aktivitásukat.

2.2.2. Az immunológiai szinapszis (IS)

A T-sejtek T-sejt receptoraikon (TCR) keresztül kapcsolódnak a DC-khez, ez a hatékony, funkcionálisan aktív T-sejt létrejöttének első feltétele. A MHC komplex TCR-hez való kötődése elengedhetetlen lépés, ez azonban még nem vezet a T-sejtek aktivációjához, ellenkezőleg, az MHC-TCR kötődés önmagában átmeneti válaszképtelenséget (anergiát) hoz létre. Az aktiváció hosszú ideig tartó kontaktust igényel a két sejt között. Ennek kialakulásához az DC-k felszínén kifejeződő adhéziós és kostimuláló molekulák szükségesek, melyek aktivációs jeleket közvetítenek a T-sejtek felé. Az aktivált DC és a T-sejt stabil kölcsönhatása mindkét sejtben citokinek termelését váltja ki, ami tovább erősíti a T-sejt-aktiváció hatékonyságát. Az antigén bemutató sejt és a T-limfocita membránjának érintkező részét immunológiai szinapszissnak (IS) nevezzük (2. ábra). A DC-T-sejt kölcsönhatás jellege (tumorsejt elimináció vagy tolerancia) végső soron tehát azon múlik, hogy az IS létrejön-e, illetve hogy milyen ko-stimulációs vagy ko-inhibíciós kölcsönhatások lépnek fel a sejtek között. A DC felszínén található CD40, CD80 és CD86 molekulák a T-sejteken megjelenő CD28 molekulákhoz kapcsolódva az effektor funkciók végrehajtásában szerepet játszó T-sejtek érését segítik elő.

A DC-k a T-sejtek anergiáját, apoptózisát is okozhatják, vagy a T-sejtek gátló fenotípusának kialakításában is részt vehetnek (Steinman és mtsai. 2003). A gátlás egyik formája, amikor a DC-k felszíni ko-stimulációs molekulái (CD80/86) helyett a B7 homolog 1 (B7-H1) ko-inhibíciós fehérje fordul elő. Ez a fehérje részben homológ az előzőkkel, viszont a CD80/86-CD28 kötődést gátolja, helyette a B7H1-programozott sejthalál fehérje 1 (PD-1) kapcsolat jön létre a DC-k és T-sejtek között. A T-sejt PD-1 aktivációja a CD4⁺ T-sejtet Treg irányú differenciációra, vagy apoptózisra készíti (Chen 2004). A ko-inhibíciós molekulák kifejeződése a szöveti környezetben termelődő citokinek, jellemzően az IL-10-en és a TGFβ-n keresztül valósul meg (Brown 2001). A ko-stimulációs felszíni molekulák csökkenésére tumoros környezetben is láthatunk példákat (Gao és mtsai. 2015, Harimoto és mtsai. 2013). A daganatszövetben termelődő IL-10-nek szerepe van a DC-k érésében, vagyis abban, hogy a DC-k felszínén ko-inhibíciós képletek jelenjenek meg (Fiorentino és mtsai. 1991, Steinbrink és mtsai. 1997). Egy nemrég megjelent tanulmány arra hívja fel a figyelmet, hogy a DC-k

stimuláns vagy tolerogén fenotípusa a tumornövekedés korai és későbbi fázisaiban is eltéréseket mutat (Nakahara és mtsai. 2016).



2. ábra. Immunológiai szinapszis és a T-sejt válasz létrejöttének feltételei: 1. az antigén-felismerő receptor MHC-komplexekhez való kötődése 2. a kostimuláló molekulák által közvetített jelek, és 3. a sejtosztódást és az effektor T-sejtté történő differenciálódást elősegítő citokinek jelenléte. Forrás: Erdei A, Sármai G, Prechl J. Immunológia. Medicina, Budapest, 2012.

2.2.3. A regulátor T-sejtek (Treg)

A Treg sejtek a CD4⁺ limfociták egy egyedi csoportját alkotják, vérben 5-10% az arányuk a CD4⁺ sejteken belül (Sakaguchi és mtsai. 1995, Dieckmann és mtsai. 2001), és fontos szerepük van az immunhomeosztázis fenntartásában. A Treg sejtek azonosítására számos marker áll rendelkezésünkre, így a CD25 (IL-2 receptora), a citotoxikus T-sejtekhez kapcsolódó protein 4 (CTLA4), a glukokortikoid-indukált TNF receptorhoz kapcsolódó protein (GITR), a glycoprotein A repetitions predominant (GARP) és a forkhead box P3 (Foxp3). Mindről ismert, hogy az aktivált nem-Treg T-sejteken is megjelenhet, ebből következik, hogy a Treg-ek gátló hatásának létrejöttéhez elengedhetetlen a sejtek aktivációja is. A Foxp3 transzkripciós faktor a legszélesebb körben használt markere a szupresszor aktivitással rendelkező CD4⁺ sejteknek. A Foxp3 kötődése a TCR körüli szignáltranszdukciót befolyásolja (Corthay 2009). A

CTLA-4 molekula az aktivált Treg sejtek felszínén fejeződik ki fokozott mértékben (Takahashi és mtsai. 2000), és a GARP sejtfelszíni fehérje jelenléte is a Treg sejtek aktivációs állapotával függ össze (Tran és mtsai. 2009, Wang és mtsai. 2009). A GITR marker az immunrendszer többféle sejtjének felszínén is megtalálható, mint például az effektor T-sejteken és a Treg sejteken is (Nocentini és Riccardi 2005, Hanabuchi és mtsai. 2006). A fehérje kifejeződése aktiváció hatására megnő; a T-sejtek koaktivációját stimulálja és a Treg sejtek immungátló képességét növeli (Shimizu és mtsai. 2002, Ronchetti és mtsai. 2004).

A Treg sejtek a tímuszban alakulnak ki, itt jön létre a T-sejteken a TCR repertoár, amely az immunválasz széles skálán elérhető specificitását adja. A kialakulás során a T-sejt előalakok pozitív és negatív szelekciós lépések nyomán jutnak el az érett, antigén-felismerő képességgel rendelkező T-sejt keletkezéséig. A pozitív szelekciós lépés célja, hogy csak azok a T-sejtek differenciálódjanak, amelyek TCR molekulái képesek a saját MHC molekulákat felismerni. Egészséges szervezetben egy második lépésben az alloreaktív T-sejtek válogatódnak ki; ezek a sejtek a saját fehérjékkel szemben mutatnak válaszreakciót, ezzel egy káros hatású, autoimmun folyamatot indítanak el kóros esetben. A Treg sejtek pozitív szelekciójuk során a saját antigének iránt nagy affinitással rendelkező sejtekként maradnak meg. Ezeket a sejteket tímusz eredetű Treg sejteknek (tTreg) nevezzük (Jordan 2001). A limfociták Treg irányba való fejlődését a feltételezések szerint a tímuszban a saját antigénekkal való találkozás a TCR és az MHCII közötti kapcsolat révén befolyásolja (Fehérvári és Sakaguchi 2004). A tTreg sejtek a tímuszban immunregulátor szerepet töltenek be, az alloreaktív T-sejteket gátolják meg a differenciálódásban (Itoh és mtsai. 1999). A differenciálódott Treg sejtek perifériára jutva a megváltozott, vagy a tímusz „szűrőjén” átjutott, alloreaktív T-sejteket gátolják. Treg sejtek a periférián is kialakulhatnak naív CD4+Foxp3- T-sejtekből. Ez az átalakulás különböző környezeti feltételek mellett spontán létrejöhet; ilyen körülmények lehetnek a szuboptimális antigén stimuláció vagy a nem megfelelő ko-stimuláció, vagy leginkább a TGF β szöveti jelenléte (Oliveira és mtsai. 2011, Shevach és Thornton 2014). Úgy tűnik, hogy a periférián átalakult Treg sejtek (pTreg) egy nagyobb csoportját teszik ki a vérben keringő Treg-eknek (Bilate és Lafaille 2012). A Treg sejtek a DC-vel kapcsolódva az immunválaszban résztvevő T-sejtek gátlásában játszanak szerepet (Arce-Sillas és mtsai. 2016). Ezt több módon tehetik meg: gátló hatású

citokineket (IL-10, TGF β) termelnek (Taylor és mtsai. 2006), citolízist okoznak (Gondek és mtsai. 2005), a T-sejt anyagcserezavarát okozzák (pl. IL-2 elvonással, cAMP transzferrel) (Burchill és mtsai. 2007, Whiteside és mtsai. 2011), vagy a DC-k érésének gátlásával (Yang és mtsai. 2014).

2.2.4. A természetes ölüsejtek (NK sejtek)

Az NK sejtek a veleszületett immunrendszer végrehajtó sejtjei. A csontvelői eredetű limfoid őssejtből képződnek, éretten a periférián, a nyirokszervekben, és a lépben is megtalálhatók. Nagy granulált limfociták, melyek nem antigén-specifikusak, az idegen antigént hordozó sejtet azonnal elpusztítják. Az NK sejtek a célsejteket vagy a perforin/granzim útvonalon keresztül pusztítják el, vagy a TNF-családba tartozó ligandokat termelnek, melyek apoptózist indukálnak a célsejtekben (Lodoen és Lanier 2006). Fontos biológiai szerepük abban áll, hogy még a CD8⁺ T-sejtek előtt képesek a vírussal fertőzött, illetve a megváltozott antigénstruktúrájú saját sejteket felismerni és elpusztítani, hiszen a veleszületett immunrendszer sejtjes elemeként a periférián azonnal interakcióba léphetnek velük.

2.2.5. A B-sejtek

A B-sejtek az adaptív immunrendszer végrehajtó sejtjei, arányuk a vérben 5-15% között van. A B-sejtek a csontvelőben fejlődnek ki, és érésük során az érett, naív (antigénnel még nem találkozott) sejtek a perifériára vándorolnak. A T-sejtekkel ellentétben a B-sejtek az antigént natív formában ismerik fel, ezért nincs szükségük arra, hogy az antigénprezentáló sejtek bemutassák azokat. A vérből a nyirokcsomókba kerülnek a B-sejtek, ahol az antigénnel találkozáskor megtörténik az aktiváció, melynek következtében az adott antigént felismerő, ellenanyagtermelő klónok alakulnak ki. Az antigén természetétől függően beszélhetünk T-sejtfüggő és T-sejt független aktivációról. A fehérje természetű antigének elleni antitesttermelés feltétele, hogy a B-sejtekkel egyidejűleg a CD4⁺ T-sejtek aktivációja is megtörténjen. A B-sejtek az antigént felveszik, és a T-sejteknek bemutatják (még hozzá azoknak a T-sejteknek, amelyeknek azelőtt ugyan azt az antigént már prezentálta a DC), közben pedig a T-sejtek felszínén olyan ko-stimulációs molekulák (pl. CD40 ligand) jelennek meg, melyek segítik a B-sejtek aktivációját és citokintermelésük megszabja, hogy az affinitásérés során milyen

antitesttermelő plazmasejtté alakuljanak (Clark és Ledbetter 1994). A T-sejt independens antigének poliszacharidok, nukleinsavak, de ide sorolható a Gram-negatív baktériumok sejtfalában található lipopoliszaharid (LPS) is. Ezek az antigének önmagukban is képesek B-sejt válasz kialakítására, viszont az affinitásérés, izotípusváltás és memória hiánya (mivel az T-sejthez kötött) miatt ez a válasz kevésbé hatékony.

3. Célkitűzések

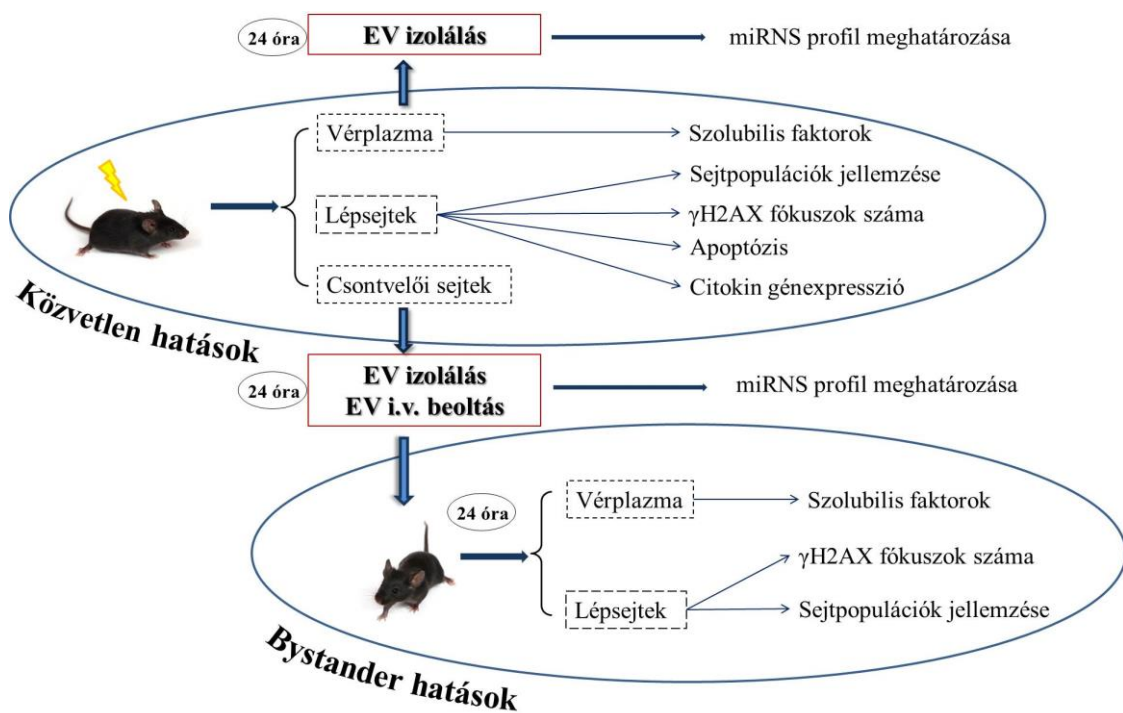
Míg a nagy dózisu ionizáló sugárzás egészségkárosító hatásai jobban ismertek, addig a kis dózisok biológiai hatásairól és ezek (rövid és hosszútávú) egészségügyi következményeiről sokkal kevesebbet tudunk. A téma ma a közegészségügyben kulcsfontosságú a diagnosztikai célú sugárterheléssel járó alkalmazások egyre szélesebb körben való elterjedése miatt, de aktuális a néhány évvel ezelőtti Fukushimai atomerőművi baleset kapcsán az emberek gondolkodásában kialakult „radiofóbia” (a sugárzás, mint potenciális veszélyforrás) okán is (Sutou 2016). A kis dózisu sugárzás hatásainak felderítése az utóbbi évtizedekben a sugárbiológia egy forró pontjává vált. Egyes tanulmányok eredményei alapján nem csak gyulladást, hanem a veleszületett immunrendszer aktiválódását és a DNS hibajavító mechanizmusok serkentését is okozhatja (Hekim és mtsai. 2015). Másrésről, atombomba túlélőkön és CT vizsgálatokon átesett egyéneken (Little és mtsai. 2009, Pearce és mtsai. 2012) végzett epidemiológiai vizsgálatok bizonyítják, hogy a sugárzás megnöveli a daganatos incidenciát nem csak a nagy dózisok tartományában (Kamiya és mtsai. 2015), hanem a kis dózisu besugárzás után is (Watanabe és mtsai. 2008). Azért, hogy a kis dózisu ionizáló sugárzásbiológiai hatásait megismerjük, fontos megérteni a létrejöttükért felelős mechanizmusokat. Kutatásainkban ennek megértésére helyezzük a hangsúlyt, és arra keresünk választ, hogy a kis és nagy dózisu ionizáló sugárzás milyen hatással van az immunrendszer sejtjeinek számbeli és funkcionális változásaira.

Az EV-k szerepét és az EV-k által közvetített miRNS-ek aktív részvételét a BE kialakulásában *in vitro* modellen már bizonyították, az *in vivo* modell kidolgozása viszont még váratott magára. Mi egy olyan rendszert dolgoztunk ki, melyben az EV-k szerepét tudtuk vizsgálni a sugárzás-indukálta szisztémás BE kialakulásában *in vivo*. A besugarazott egerekből izolált EV-ket intravénásan (i.v.) naív, ún. bystander állatokba oltottuk, és a hatást a bystander egerek lépsejtjein mértük. A besugarazott egerek csontveléből illetve vérből származó EV-k miRNS-tartalmát is elemeztük, és a sugárzás hatására bekövetkező változásokból a szabályozott jelátviteli útvonalakra következtettünk.

4. Módszerek

4.1. Kísérleti állatok és kezelésük menete

6-10 hetes C57Bl/6 egereket használtunk a kísérletekhez. Az állatokat 60 mg/kg ketamin és 10 mg/kg xilazin együttes intraperitoneális (i.p.) injektálásával altattuk el a besugárzási protokoll alkalmazásához. A besugárzást nem kapott egereket is hasonló eljárásnak vetettük alá. Az állatokat egyesével elkülönítve helyeztük el egy erre a célra készített, műanyag tárolóban (méretei: 8 cm hosszú x 5 cm széles x 4 cm magas) a besugárzás idejére.



3. ábra. Sematikus ábra a kísérletek menetéről. C57Bl/6 egereket besugarasztunk, majd a csontvelői és lépsejteket, valamint a vérplazmát begyűjtöttük. A csontvelői sejtek felülúszójából és a vérplazmából EV-t izoláltunk, és ezek miRNS-tartalmát elemeztük. A BE kialakulását úgy követtük nyomon, hogy a csontvelői EV-eket egészséges egerekbe oltottuk intravénásan, és 24 óra múlva vizsgáltuk a lépsejteket, valamint a vérplazmát.

A teljes test besugárzást (lépsejtpopulációk és Treg-ek vizsgálatához) ^{60}Co - γ besugárzó készülékkel (Gammatron-3) végeztük, a dózisteljesítmény: 0,517 Gy/perc volt. A röntgen-besugárzást (DC-k és BE vizsgálatához) terápiás röntgen-készülékkel (THX-250) végeztük. Az állatokkal végzett kísérletek menetét és a különböző vizsgálati végpontokat összefoglalva a 3. ábrán mutatom be. A kísérletek időtartama alatt az állatokat elkülönített ketrecekben tartottuk, ahol táphoz és vízhez *ad libidum* jutottak. Az egerek életének kíméletes kioltása letális dózisú (200 mg/kg) pentobarbital i.p. adagolásával történt. Minden állatkísérletet az 1998. évi XXVIII. az állatok védelméről és kíméletéről szóló törvény és a 40/2013 (II. 14.) állatkísérletekről szóló kormányrendelet rendelkezései és iránymutatása alapján terveztünk meg és hajtottunk végre. Az állatkísérletes engedélyünket a Pest megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatalának Állat-egészségügyi és Állatvédelmi Igazgatósága hagyta jóvá.

4.2. Teljes vér kinyerése az egerekből és a fehérje profil meghatározása

A teljes vért az állatok májkapueréből vettük 3,2%-os Na-citrátos 22G-s tű segítségével. A plazmát a teljes vérből 2200 RPM-mel törénő centrifugálás után nyertük. A plazma egy részéből EV-t izoláltunk, a maradékot fehérje profil meghatározására használtuk.

A fehérje profil meghatározását a közvetlen besugarazott és bystander állatok vérplazmájából végeztük. Csoportonként 5 állat plazmáját egyesítettük, és ebből mintánként 850 μl -t tettünk fel a proteome profiler antibody array membránokra (Mouse XL Cytokine Array Kit), a gyártó utasításai alapján. A membránokat mosás után biotinilált sztreptavidin-tormaperoxidáz (HRP) és kemolumineszcens ellenanyag koktéllal inkubáltuk az ajánlott módon. A membránokat ezután röntgen filmre (CL-XPosure Film, 34088) exponáltuk, majd digitalizálásuk után ImageJ szoftverrel értékeltük. Három független kísérlet eredményeit átlagoltuk.

A képek kiértékelésekor a háttérrel levontuk és a membránon lévő referenciapontokhoz normalizáltunk. A fehérje expressziós szint változását a közvetlen besugarazott állatok esetén a 0 Gy-es, a bystander állatok esetén a 0 Gy bystander mintákhoz hasonlítottuk, páronként.

4.3. Immunsejtek izolálása lépből

Az egerek életét a besugárzás után különböző időpontokban kioltottuk. Az állatok lépét eltávolítottuk, mechanikus roncsolással szike és fecskendő segítségével egysejtes szuszpenziót készítettünk. A vörösvérsejteket 1,66 %-os ammónium-klorid oldattal történő lízissel eltávolítottuk, majd az így nyert szuszpenzióhoz RPMI-5 sejtenyésztő médiumot (RPMI-1640 médium 5 % borjúsavó tartalommal, 10 mM hepes, 20 μ M β -merkaptoetanol, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin és 2,5 μ g/ml amfotericin B hozzáadásával) adtunk. Az élő sejtek számát hemocitóméterrel határoztuk meg, tripánkék festéssel kizárva az elpusztult sejteket. Az egysejtes lépsejtszuszpénziót használtuk a továbbiakban fenotipizáláshoz, apoptózis vizsgálatához, sejtcsoportok további izolálásához és a funkcionális tesztekhez.

A CD4+CD25+ Treg sejteket és CD4+CD25- effektor sejteket mágneses szeparálással választottuk szét a Miltényi Biotec CD4+CD25+ sejtzisoláló kittel (CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit), a gyártó utasításai szerint. Röviden, az egysejtes szuszpenzióból első lépésben a CD4- sejteket távolítottuk el. Ezután a CD4+ sejteket tartalmazó frakciót mágneses PE-vel konjugált CD25+ ellenanyaggal jelöltük. A jelölt sejteket egy mágneses gyöngyökkel teli oszlopra tapasztottuk ki, majd a mágneses tér hatása alól kivéve, kétszeri pufferes lemosással nyertük a CD4+CD25+ Treg sejteket. A sejtek tisztasága 95% feletti volt, amit áramlásos citométerrel (FACS) ellenőriztünk. A CD25+ ellenanyaggal nem jelölt sejtek a CD4+CD25- effektor T-sejtek voltak, de ezeknek a tisztasága 60% körüli volt. Ezért a funkcionális tesztekhez a CD4+CD25- effektor T-sejteket az R&D Systems Treg sejt izoláló kitjével (MagCollect Rat CD4+ CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit) nyertük, a gyártó utasításai szerint. A mágneses szeparálás nagyon hasonló a Miltényi kit módszeréhez, de itt a CD25- effektor T-sejtek tisztasága sokkal nagyobb volt (95 % feletti).

A DC sejtek izolálásakor a lépét nem csak mechanikusan roncsoltuk, hanem enzimatis emésztésnek is alávetettük. A DC sejtek jellemzően kötőszöveti elhelyezkedésűek, az enzimatis emésztés segítségével nagyobb számban nyerhetők ki az adott szervből. A lépékbe fecskendő segítségével 100 U/ml-es kollagenáz D oldatot fecskendeztünk (az enzimet HBSS-ben oldottuk), mechanikusan szeparáltuk a sejteket, majd a maradék szövetdarabokat, melyekből már szuszpenziót nem tudtunk kinyerni, 1

ml 400 U/ml kollagenáz D oldattal inkubáltuk 30 percig 37°C-on. Az inkubációs idő letelte után fecskendővel begyűjtöttük a sejtizátumot. Az így kapott lépsejtsuszpenziót a fentiekkel megegyező módon vértelenítettük. A CD11c+ DC sejteket pozitív szelekció elvén, mágneses szeparáció módszerével válogattuk ki, a Miltényi Biotech anti-PE microbeadje (CD11c MicroBeads UltraPure, mouse) segítségével, a gyártó utasításai szerint. Röviden, a CD11c+ PE antitesttel jelölt szuszpenzióhoz anti-PE mágneses gyöngyöket adtunk, és a fentiekhez hasonló módon izoláltuk a keresett sejteket. A DC sejteket RPMI-10 tápoldatba (RPMI-1640 táp 10 % hőinaktivált borjúsavó tartalommal, egyebekben az RPMI-5 táppal megegyező összetétellel) gyűjtöttük be, melyben az együtt-tenyésztés során is tartottuk azokat.

4.4. Lépsejtpopulációk jellemzése

Az összlépsejtek fenotipusos jellemzését és az egyes alcsoportok egymáshoz viszonyított arányának meghatározását a sejtek felszíni és sejten belüli fehérjéinek azonosításával végeztük. Az immunfenotipizáláshoz a lépsejtsuszpenziót vagy a vizsgálandó sejtfrakciót jelöletlen anti-Fc γ III/II CD16/CD32 receptor ellenes antitesttel inkubáltuk, hogy a jelölt antitestek aspecifikus Fc-receptor kötődését megakadályozzuk. A sejtfelszíni fehérjék jelölését a megfelelő specifikus antitestekkel 4°C-on 20 percig végeztük az 1. táblázatban szereplő monoklonális ellenanyagokat használva. A sejtmagi fehérjék kimutatásához a sejtet permeabilizálni kellett, melyet a BioLegend Fc γ 3 Fix/Perm pufferével végeztünk, a gyártó utasításai alapján. Az immunfenotipizálást FACSCalibur áramlásos citométerrel végeztük (Becton Dickinson). Minden FACS mérésnél az alkalmazott beállítási kapukat az Eredmények fejezet megfelelő ábrájának jelmagyarázata mutatja be. Az eredmények értékelése a CellQuest™ szoftver 3.1 verziójával történt. Az összlépsejt és csontvelői sejtfrakciók fenotipizálásához használt ellenanyagokat az 1. táblázat mutatja be.

A Treg sejtek beazonosításához a CD4 és CD25 markerek mellett a Fc γ 3 markert is használtuk. Ennek oka, hogy a CD25 marker az aktivált nem-Treg CD4+ sejteken is kifejeződik. Ez alapján tehát nem különíthető el egyértelműen a két sejtcsoport egymástól.

1. táblázat. A lépsejt- és csontvelői sejtpopulációk jellemzésére használt ellenanyag kombinációk

sejttípus	antitest fluoreszcens jelöléssel
mind	CD16/CD32 (jelöletlen)
CD4 ⁺ T-sejt	CD3 ϵ -PE, CD4-PerCP
CD8 ⁺ T-sejt	CD3 ϵ -PE, CD8 α -FITC, CD44-APC
Treg sejt	CD4-PerCP, CD25-PE, Foxp3-FITC/PE, CTLA4-PE, GITR-PE, GARP-PE
DC	CD11c-PE, I-A ^b -FITC, CD40-APC, CD80-PECy5, CD86-PECy5, B7-H1-APC, DEC205-PerCPCy5.5, TLR4-PE/Cy7
NK	NK1.1-FITC
B-sejt	CD19-PE

4.5. Apoptózis mérése

Az apoptózis vizsgálatához a TUNEL (terminális deoxinukleotidil transzferáz-mediálta dUTP-biotin vég-jelölés) módszeren alapuló Mebstain apoptózis kitet használtunk. A módszer lényege, hogy a DNS-törésekhez a kettős lánc 3' végén a deoxinukleotidil transzferáz segítségével fluoreszcensen jelölt dUTP-t kötünk és a fluoreszcenciát áramlásos citométerrel detektáljuk. A vizsgálati időpontjaink besugárzás után 4 órával, 1 nappal és 3 nappal voltak. Ezeket az időpontokat előkísérletekkel állítottuk be, melyek során az apoptózist 2, 4, 18 és 24 órával a besugárzás után mértük. Azt találtuk, hogy az apoptózis maximuma besugárzás után 4 órával mérhető, míg a lecsengése 24 óra már kimutatható.

Az egysejtes lépszuspenziót az 1. táblázatban leírt markerekkel jelöltük figyelve arra, hogy a sejtpopulációk jelölésére olyan fluoreszcens festékkel kötött antitesteket használjunk, mely a TUNEL assay FITC-jelölt dUTP-jével kompatibilisen mérhető. A jelölt sejtekre ezután 250 μ l jéghideg sóoldat (foszfát só puffer, PBS) és 750 μ l etanol

keverékét adtuk. A sejtek fixálása 1 ml 1%-os paraformaldehiddel történt. A fixált sejteket centrifugálás után mintánként TdT puffer, dUTP-FITC és TdT enzim oldatelegybe vettük fel. A mintákat áramlásos citométerrel mértük és értékeltük.

4.6. γ H2AX assay

A besugarazott és a bystander állatok lépsejtjein végeztük el az assay-t mind immuncitokémiával, mind áramlásos citometriával.

Immuncitokémiához mintánként 10^6 sejtet tettünk ki 13 mm-es kerek fedőlemezre, 24 lyukú plate-re. A plate-eket $35 \times g$ -vel 5 percig centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük, és a sejteket 0,5 ml 2%-os PFA-val fixáltuk a lemezeken 5 percig szobahőn. PBS-sel történő mosás után a sejteket permeabilizáltuk: 0,5 ml 0,25%-os Triton-X 100 oldat és 0,1% glicin elegyével 15 percig szobahőn. Újabb PBS-es mosások után 3%-os BSA-val blokkoltuk (30 percig szobahőn) a sejteken az aspecifikus festődést, majd a γ H2AX ellenes elsődleges antitesttel (foszfo-hisztón H2A.X (Ser139) nyúl monoklonális ellenanyag) inkubáltuk 40 percig szobahőn. Fluoreszcensen jelölt ellenanyagként nyúl Ig-ellenes AlexaFluor 488-cal kötött másodlagos antitestet használtunk, amivel 30 percet inkubáltuk a sejteket szobahőn. Háromszori mosás után a fedőlemezeket felszedtük a plate aljából és egy csepp DAPI-val jelölt fedőanyaggal tárgylemezre tapasztottuk. A kiértékelés Zeiss Axio Imager fázis-kontraszt mikroszkóppal, 100x-os nagyítású objektív alatt történt, Zen2012 program felhasználásával. Tárgylemezenként legalább 100 sejtet vagy 50 fókuszot értékeltünk.

A γ H2AX áramlásos citometriás elemzéséhez a lépsejteket 4%-os PFA-val fixáltuk 37°C -on 10 percig. A permeabilizáláshoz 90%-os jéghideg metanolt használtunk, és 30 percig inkubáltuk a sejteket vele. Az elsődleges és másodlagos antitestekkel való jelölés a fentieknek megfelelően történt. A γ H2AX+ sejtek arányát FACSCalibur áramlási citométerrel határoztuk meg és CellQuest Pro szoftverrel értékeltük.

4.7. Sejtosztódás vizsgálata

A lépsejtek osztódási kinetikájának kimutatásához a Ki67 intracelluláris proliferációs marker expresszióját mértük áramlásos citométerrel. A Ki67 fehérje a sejtciklus valamennyi fázisában kifejeződik a sejtmagban a G0 kivételével, ami alkalmassá teszi

arra, hogy jelenlétével következtetni tudjunk a sejtosztódás tényére. A lépsejtszuspenziót a fent leírtak alapján izoláltuk a besugárzás után több időpillanatban. Az összlépsejt szuspenziót először a specifikus külső markerrel jelöltük, majd egy belső festés következett, mely során Ki67-PE antitestet használtuk. A citometriás mérés során a Ki67+ (osztódó) és Ki67- (nyugvó állapotú) frakciókat különítettük el egymástól.

4.8. Citokin génkifejeződés kimutatása

A lépsejtek citokintermelésének vizsgálatához a lépeket a meghatározott időpontokban (besugárzás után 4 órával, 1 nappal vagy 3 nappal) távolítottuk el. A lépsejtszuspenzióból illetve az izolált alpopulációkból RNS-t izoláltunk oszlopos szeparáció elvén alapuló kitek segítségével (pl. Qiagen RNeasy Mini Kit), a gyártó utasításai szerint. Az RNS koncentrációját és tisztaságát spektrofotométerrel (Synergy HT) és gélelektroforézissel határoztuk meg. cDNS szintézishez 0,5 µg RNS-t használtunk, a reakciót a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint. Az elkészült cDNS-ből kvantitatív RT-PCR reakciót végeztünk, melyet a következő reakciós eleggyel futtattunk: 2 µl cDNS, 1,2 µl primer párral (12,5 pM), 12,5 µl Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix és 9,3 µl víz. A reakció egy Rotor-Gene RG-3000A Real Time Thermal Cycler-ben zajlott. A ciklusprofil: kezdeti denaturáció 95°C-on 15 percig, majd 40 ciklus: denaturáció (95°C, 15 s), kitapadás (annealáció) (60°C, 30 s), lánchosszabbítás (elongáció) (72°C, 30 s). A végső lánchosszabbítás 72°C-on 10 percig zajlott. Az olvadási görbe kiértékelés (72-95°C) után az egyszálú DNS-láncok végső összekapcsolódása 72°C-on 10 perc alatt megtörtént. A PCR termék specificitását poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük. A RT-PCR reakcióhoz legalább két technikai párhuzamost mértünk össze minden esetben, és legalább 3 különböző biológiai mintát használtunk egy kezelési csoportból. Az expressziós mintázatot β -aktinhez normalizáltuk, komparatív C_t módszerrel a Roto-Gene 6.0.33 verziójú szoftverének segítségével.

A primereket Primer3 szoftver (<http://frodo.wi.mit.edu/>) segítségével terveztük, a szekvenciákat pedig a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat. A valós-idejű PRC reakció során használt primerek szekvenciája

Citokin (termék hossza)	Szekvencia
β -actin (314 bp)	forward: 5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCGT-3' reverse: 5'-CGTACATGGCTGGGGTGTGA-3'
GDF15 (136 bp)	forward: 5'-AACACGCATGCGCAGATCAAAGC-3' reverse: 5'-AAGTCTGCA-GTGACACACCACTGT-3'
GM-CSF (338 bp)	forward: 5'-AAAGAAGCCCTGAACCTCCTGGAT -3' reverse: 5'-AGCAGCAGTCTGAGAAGCTGGATT -3'
IFN- γ (237 bp)	forward: 5'-GCTTTGCAGCTCTTCCTCAT-3' reverse: 5'-GGAAGCACCAAGGTGTCAAGT-3'
IL-2 (214 bp)	forward: 5'-CCCAAGCAGGCCACAGAATTGAAA-3' reverse: 5'-AGTCCACCACAGTTGCTGACTCAT-3'
IL-4 (256 bp)	forward: 5'-TCACTGACGGCACAGAGCTATTGA-3' reverse: 5'-AATATGCGAAGCACCTTGGAAGCC-3'
IL-5 (125 bp)	forward: 5'-GATGGAACCCAAGGCTTTGTGCAT-3' reverse: 5'-TCACCCTTGGCTACACACTGAGTT-3'
IL-6 (134 bp)	forward: 5'-ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3' reverse: 5'-TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT-3'
IL-10 (119 bp)	forward: 5'-GGGTTGCCAAGCCTTATCGGAAAT-3' reverse: 5'-TCTTCAGCTTCTCACCCAGGGAAT-3'
IL-12 (210 bp)	forward: 5'-GAAGTCCAATGCAAAGGCGGGAAT-3' reverse: 5'-AAAG-CCAACCAAGCAGAAGACAGC-3'
LT- β (378 bp)	forward: 5'-TACTTCCCTGGTGACCCTGTTGTT-3' reverse: 5'-TCAGGGTTGAGGTCAGTTTCTGGT-3'
TGF β (186 bp)	forward: 5'-TACGTCAGACATTGCGGAAGCAGT-3' reverse: 5'-AAAGACAGCCACTCAGGCGTATCA-3'
TNF- α (143 bp)	forward: 5'-CCAACGGCATGGATCTCAAAGACA-3' reverse: 5'-TGAGATAGCAAATCGGCTGACGGT-3'

4.9. A CD4+Foxp3- sejtek CFSE jelölése

Azért, hogy megvizsgáljuk, hogy a besugárzás hatására az effektor T-sejtek átalakulnak-e Treg sejtekké, a sejteket karboxifluoreszcein szuccinimidil észterrel (CFSE) festettük. A CFSE egy sejtek jelölésére szolgáló fluoreszcens ágens. A sejtekbe való diffúzióját követően az intracelluláris térben stabilan felhalmozódik, a sejtosztódás során a festék az utódsejtekbe egyenletesen oszlik meg, ugyanakkor nincs hatással a sejtek működésére, emiatt *in vivo* és *in vitro* jelölésre és a sejtosztódás nyomon követésére egyaránt alkalmas. A tisztított CD4+CD25- sejteket 5 μ M CFSE-rel jelöltük, a reakció 0,1% BSA tartalmú Ca⁺⁺ és Mg⁺⁺mentes PBS oldatban zajlott szobahőn 5 percig. A festést 5-szörös mennyiségű 10% BSA-t tartalmazó jéghideg RPMI-1640 hozzáadásával állítottuk le 5 perc inkubációval. A sejteket háromszor mostuk, majd Hank's pufferben vettük fel az oltáshoz. 1×10^7 sejtet injektáltunk állatonként i.v.. Két csoportunk volt, az egyikben kontroll (besugárzást nem kapott) egerekből izolált T-sejteket adtunk be az állatoknak, a másikban 2 Gy besugárzás után 1 nappal izolált T-sejteket. Az oltás után 6 nappal az állatokat leöltük, és a lépsejtjeikből szuszpenziót készítve, áramlásos citométerrel mértük a CFSE+ Foxp3+ sejtek arányát a beoltott sejtekben korábban (beoltás előtt) mért Foxp3+ sejtjeihez viszonyítva.

4.10. T sejtek proliferáció-gátlásának vizsgálata

Annak érdekében, hogy a Treg sejtek funcionális épségét besugárzás után megvizsgáljuk, a sejteket a besugárzás utáni első napon szeparáltuk a lépsejtekből. A T-sejt szupressziós assay során CD4+CD25- sejteket tenyésztettük együtt 1:1 arányban besugarazott vagy nem besugarazott egerekből származó CD4+CD25+ Treg sejtekkel. A 96-lyukú U-aljú tenyésztőedényen a sejteket 1×10^5 sejt/lyuk sűrűségben RPMI-5 tápban 0,5 μ g/ml koncentrációjú anti-CD3 ϵ jelenlétében inkubáltuk 37°C-on 5 napig. A T-sejt proliferációt a tenyésztés utolsó 16-18 órában hozzáadott 1 μ Ci metil-³H-timidin beépülésének arányából határoztuk meg. A ³H-timidin inkorporáció méréséhez a sejteket begyűjtöttük, Soluene-350 lízis pufferrel (4 rész puffer, 1 rész víz) kezeltük, majd Ultima Gold szcintillációs koktélt adtunk a mintákhoz. A beépült radioaktivitást Packard Tri-Carb 2900 TR folyadékszscintillációs számláló segítségével mértük. A CD4+CD25- T-sejtek relatív proliferációját %-ban fejeztük ki, ahol a 100% a Treg

sejtek nélkül tenyésztett T-sejtek proliferációjának cpm-ben kifejezett értéke. Az eredményeket 3 független kísérlet adatainak átlaga adta.

4.11. DC sejtek antigénfelvételének és antigénbemutatásának vizsgálata

Az antigénfelvételt 0 Gy és egy nappal korábban 2 Gy dózissal besugarazott állatokból izolált DC sejteken vizsgáltuk, melyeket a korábban említett mágneses szeparációval különítettünk el. Ehhez egy FITC-jelölt SIINFEKL elleni antitestet használtunk, mely a B16-OVA egér melanóma sejtvonal által termelt ovalbumin fehérje egyik epitópja elleni antitest fluoreszcensen jelölve. A sejteket az antitesttel inkubáltuk, mostuk és a felvett fehérje mennyiségét áramlásos citométerrel mértük.

Az antigénbemutatás vizsgálatához a sejteket hőinaktivált savót tartalmazó RPMI-10 tápban 30 μ M végkoncentrációjú SIINFEKL peptid jelenlétében inkubáltuk 2 órán át. Pufferrel történt egyszeri mosás után a sejteket H2b-SIINFEKL-FITC (MHCI-hez kötött fehérje) antitesttel jelöltük a gyártó utasítása szerint. A festődött / összes sejt arányából következtettünk az antigénfelvétel hatékonyságára.

4.12. EV-k izolálása, validálása és az i.v. transzfer

A csontvelői sejteket az állatok combcsontjából és sípcsontjából izoláltuk besugárzás után 24 órával. A csontokról levágtuk az epifízist és a csontvelőt jéghideg PBS-sel, fecskendő segítségével kimostuk a diafizisből. Az így nyert mintából pipettával szuszpendálva nyertük az egysejtes szuszpenziót. Egyszeri centrifugálás (500 x g, 4°C, 10 perc) után a sejtfelülűszóból EV-t izoláltunk. Ehhez minimum 8 állat / dózis sejtfelülűszót egyesítettük, és az ExoQuick-TC kit-et használtuk, a gyártó utasításai szerint. Az ExoQuick-TC egy olyan polimerháló, amely precipitálja az EV-ket. Az izolálás folyamata röviden: a felülűszót összegyűjtöttük és éjszakán át inkubáltuk az ExoQuick oldattal a megadott arányban 4°C-on. Másnap 30 percig, 1500 x g-n centrifugáltuk a mintát, majd 200 μ l PBS-ben szuszpendáltuk fel a csapadékot. Az így nyert EV-t GE Healthcare SpinTrap G-25 oszlopon tisztítottuk meg, hogy az ExoQuick polimerjét eltávolítsuk az EV-szuszenzióból.

A plazma EV-ket az Exiqon exoszóma izoláló kitje (miRCURY Exosome isolation kit – Serum and Plasma) segítségével nyertük a kezelt és kontroll állatok vérplazmájából, a

gyártó utasításai szerint. A megfelelő mennyiség kinyeréséhez 5 állat mintáját egyesítettük csoportonként.

Az EV-k hidrodinamikai méretét dinamikus fényszórás (DLS) módszerrel határoztuk meg, Avid Nano W130i DLS készülékkel. A DLS elve, hogy a lézer fényt áteresztve a minta-oldaton a fény szóródásán keresztül számoljuk a méreteloszlást.

A transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvételhez az EV mintákat 3%-os paraformaldehidben (PFA) fixáltuk, réz mikrorostélyra (gridre) kerültek, és 0,5% uranil-acetát oldattal kezeltük 2 percig. A grideket levegőn szárítottuk 10 percig és Hitachi H-7650 transzmissziós elektronmikroszkóppal készítettük a felvételt.

Az EV minták fehérje tartalmát Bradford fehérjeméréssel határoztuk meg és Synergy HT spektrofotométerrel értékeltük.

Az EV-specifikus fehérjék meghatározása Western Blot módszerrel történt. Az EV mintákat RIPA pufferben (2% proteáz inhibitor tartalmaz) emésztettük, 20 percig 4°C-on. Mintánként azonos mennyiségű fehérjét futtattunk meg 10%-os nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid (SDS-PAGE) gélen, majd a fehérjéket polivinilidín-fluorid (PVDF) membránra blottoltuk. A csontvelői sejt mintákkal ugyanígy jártunk el. Fehérje standardként Prism Ultra fehérje létrát használtunk. A membránt ezután 3%-os BSA oldatban blokkoltuk. A CD9, TSG101 és calnexin antitesteket a gyártó ajánlása szerinti hígításban alkalmaztuk, és 90 percig inkubáltuk a membránt az elsődleges ellenanyagokkal, majd 60 percet nyúl Ig-ellenes HRP-kötött másodlagos ellenanyaggal, szobahőn, billegtetőn. A keresett fehérjéket a membránon 3,3-diamino benzidin (DAB) szubsztráttal jelenítettük meg.

A bystander állatok kezelését a következőképpen végeztük: egészséges egerekbe farokvénán keresztül 10 µg EV-t injektáltunk, melyet 100 µl PBS vivőanyaggal jutattunk be. Az állatokat 24 óra után leöltük és perifériás vért és lépsejteket gyűjtöttünk be belőlük további vizsgálatokhoz.

4.13. *A csontvelői és plazma EV-k miRNS profiljának meghatározása*

4.13.1. miRNS profil meghatározása

A miRNS profil meghatározásához a csontvelői EV-ket csoportonként 5 állatból izoláltuk, és csoportonként 3 független mintát küldünk el elemzésre az ExiqonServices céghez. A cég végezte az RNS-izolálást, a miRNS profil felvételét PCR reakció segítségével és az adatok kiértékelésének első fázisát is elkészítette.

Az RNS-izolálást az EV-kből az Exiqon a Qiagen miRNeasy kit-jével végezte. Röviden, az EV mintákat Qiazol lízis pufferrel emésztették szobahőn 2 percig. A felülúszót 100% etanollal kezelték és RNeasy Mini spin oszlopra centrifugálták. Az oszlopot a megadott pufferekkel centrifugálták tovább, majd 50 µl RNS-mentes vízbe eluálták a mintát.

A miRNS-ek elemzése RT-PCR array módszerrel történt, melyet szintén az Exiqon végzett. 19 µl RNS-t írtak át 95 µl reakciós térfogatban miRCURY LNA Universal RT microRNS PCR, poliadeniláció és cDNS szintézis kittel. A cDNS-t 50-szeresre hígítva 10 µl reakciós térfogatú PCR reakcióba tették, a gyártó utasításait követve. A qPCR-t a miRNS Ready-to-Use PCR Mouse&Rat panel I + II segítségével, ExiLENT SYBR Green master mix-szel végezték. A negatív kontrollok ugyanezen protokollok alapján kerültek elemzésre. Az amplifikáció egy LightCycler 480 Real-Time PCR rendszerű berendezésben, 384-lyukú plate-en zajlott. Az amplifikációs görbéket a Roche LC szoftvere segítségével elemezték, mind a kvantifikációs görbéket, mind az olvadási görbéket. Az amplifikációs hatékonyságot az Exiqon egy, a LinReg-hez hasonló algoritmussal számolta.

4.13.2. miRNS array adatainak kiértékelése

A miRNS array adatainak elemzéséhez az Exiqon által számolt Ct értékeket vettük alapul. Az expressziós változást a 0 Gy mintákhoz páronként hasonlítva kaptuk, és 3 független minta elemzéséből átlagoltunk. A szignifikancia értéket Student t-teszttel számoltuk.

A 0,1 Gy és 2 Gy mintákban megtalálható, eltérően expresszálódó miRNS-ek lehetséges biológiai szerepének elemzéséhez a DIANA-miR-Path szoftvert használtuk (Vlachos és

mtsai. 2015). A DIANA-mikroT-CDS célpont jósló algoritmus arra dolgozták ki, hogy a miRNS-ek lehetséges célpontjait adja meg, a miRNS és a célpont RNS szekvencia azonossága alapján. A program a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) és a Gene Ontology (GO) adatbázisokkal összevetve határozza meg a miRNS-ek által szabályozott jelátviteli útvonalakat.

4.14. Statisztikai elemzés

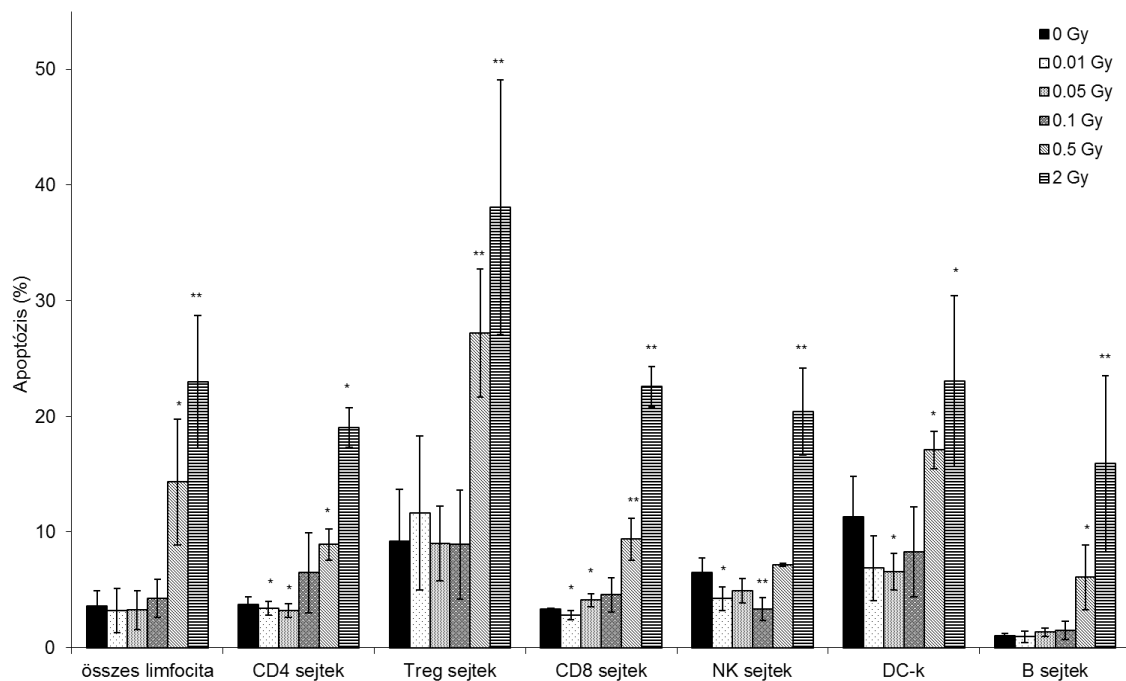
A statisztikai elemzést kétmintás Student t-tesztel végeztük GraphPad Prism 5 programmal. A szórásokat (standard deviation) az ábrákon hibasávokkal, a táblázatokban pedig számszerűsítve tüntettük fel. Az adatok szignifikánsak, ha $p < 0,05$. Az ábrákon $p < 0,05$ esetén *, és $p < 0,001$ esetén **, $p < 0,0001$ esetén *** jelölést alkalmaztunk.

5. Eredmények

5.1. Sugárzás-indukálta apoptózis lépsejteken

5.1.1. A lépsejt alpopulációk eltérő mértékben pusztulnak besugárzás után

Elsőként azt vizsgáltuk, hogy az akut kis és nagy dózisú besugárzás hogyan befolyásolja a lépsejtek apoptózist (4. ábra).



4. ábra. Apoptózis gyakorisága egér lépsejteken egésztest besugárzás után. Az egereket egésztest besugárzásnak vetettük alá az ábrán jelölt dózisokkal. A lépsejteket a besugárzás után 4 órával izoláltuk, a sejtpopulációkat a megfelelő fluoreszcens ellenanyagokkal jelöltük, és az apoptózist TUNEL módszerrel mértük. Az eredmények 4 független kísérlet adataiból származnak. A függőleges tengelyen a megfelelő sejtcsoportokon belül az apoptotikus sejtek százalékos arányát tüntettük fel. A hibásávok a szórásokat jelenítik meg, $p < 0,05$ esetén *, és $p < 0,001$ esetén ** jelölést alkalmaztunk.

Az alábbi lépsejt alpopulációkat tanulmányoztuk: CD3+CD4+ segítő T-sejtek, CD3+CD8+ citotoxikus T-sejtek, CD4+CD25+ Treg sejtek, NK sejtek, CD11c+ DC

sejtek és CD19+ B-sejtek. A lépsejteket a besugárzás után 4 órával izoláltuk, és közvetlenül használtuk fel az apoptózis vizsgálatához. Az összlépsejtek spontán apoptózisa 3,6% volt, de ezen belül az egyes sejtpopulációk apoptózisa jelentős eltéréseket mutatott. A CD4+ és CD8+ sejtek spontán apoptózisa hasonló volt az összlépsejtekéhez (3,74% a CD4+ sejtek és 3,37% CD8+ sejtek esetén), viszont a B-sejteké sokkal alacsonyabb (1%), míg az NK sejteké (6,5%), Treg sejteké (9,3%) és DC sejteké (11,3%) sokkal nagyobb volt.

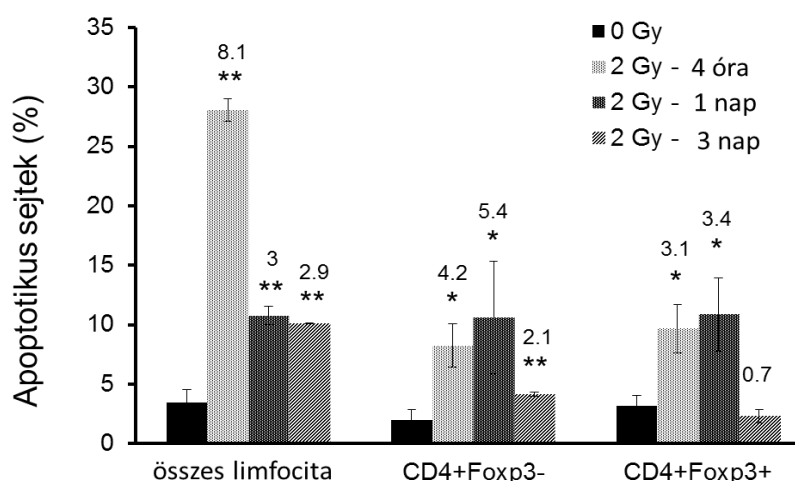
A kis dózisú besugárzás a legtöbb vizsgált populációban csökkentette az apoptózis mértékét. A legszembetűnőbb az NK és különösen a DC sejtek esetén 0,01 Gy és 0,1 Gy dózisok között volt, ahol 25-50%-al esett vissza az apoptotikus sejtek aránya a nem-besugárzott sejtekhez képest (3. táblázat). Érdekes megfigyelés, hogy a CD8+ és B-sejtek populációjában már 0,05 Gy dózisú besugárzás után is enyhén emelkedett az apoptózis. Nagyobb dózisú (0,5 Gy – 2 Gy) besugárzás következtében a legtöbb vizsgált populációban megnőtt az apoptózis. 2 Gy besugárzás után az összlépsejtek 23%-a elpusztult, ez 6,6-szoros emelkedés a kontrolhoz képest. A B-sejtek bizonyultak a legérzékenyebbeknek, 15,5-szörösre emelkedett az elpusztult sejtek aránya a kezdeti állapothoz képest 2 Gy besugárzást követően. A CD4+ T-sejtek, Treg sejtek és CD8+ sejtek rezisztensebbek voltak az összlépsejtekhez képest, a CD4+ T-sejtek esetén 5,1-szeresre, a Treg sejtek esetén 4,1-szörösre és a CD8+ T-sejtek esetén pedig 6,9-szeresre emelkedett az apoptózis mértéke. Az NK és a DC sejtek pusztultak a legkevésbé, a kontrolhoz képest mindössze 3,3-szoros, ill. 2,3-szoros volt az apoptózis mértékének növekedése.

3. táblázat. Apoptózis relatív változása a különböző egér lépsejt populációkban egésztest besugárzás után. A relatív változást a nem besugározott kontrolhoz viszonyítva adtuk meg. Az eredmények 4 független kísérlet adataiból származnak. A zárójelben a szórást tüntettük fel. A szignifikancia értékét a 0Gy kontrolhoz viszonyítva határoztuk meg, $p < 0,05$ esetén *, és $p < 0,001$ esetén ** jelölést alkalmaztunk.

Dózis	Vizsgált sejtípus						
	Összes lépsejt	CD4 sejtek	Treg sejtek	CD8 sejtek	NK sejtek	DC-k	B sejtek
0 Gy	1	1	1	1	1	1	1
0.01 Gy	0.86 (± 0.06)*	0.91 (± 0.01)*	1.13 (± 0.37)	0.9 (± 0.1)	0.73 (± 0.29)	0.65 (± 0.28)	0.91 (± 0.2)
0.05 Gy	0.91 (± 0.18)	0.85 (± 0.01)*	0.94 (± 0.33)	1.27 (± 0.18)	0.74 (± 0.02)*	0.59 (± 0.05)**	1.32 (± 0.06)
0.1 Gy	1.17 (± 0.56)	1.68 (± 0.65)	0.91 (± 0.11)	1.42 (± 0.58)	0.52 (± 0.26)	0.74 (± 0.21)	1.44 (± 0.34)
0.5 Gy	4.2 (± 2.11)*	2.39 (± 0.47)*	3.1 (± 1.2)*	2.93 (± 0.63)*	0.94 (± 0.04)	1.68 (± 0.67)	5.94 (± 1.07)*
2 Gy	6.62 (± 3.53)*	5.13 (± 0.41)*	4.15 (± 1.24)**	6.95 (± 0.71)**	3.26 (± 1.35)	2.25 (± 1.25)	15.52 (± 2.99)*

5.1.2. A Treg sejtek sugárrezisztensek

Mivel a Treg sejtek sugárrezisztenciája jelentős mértékben befolyásolhatja a sugárzás-indukálta immunválasz kimenetelét, a továbbiakban a CD4+Foxp3+ (Treg) sejtek apoptotikus rátáját határoztuk meg 2 Gy dózisú egésztest besugárzás után 4 órával, 1 nappal és 3 nappal. Az összes lépsejtpopulációt együtt vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az apoptózis ráta a besugárzás után 4 órával volt a legnagyobb (8,1-szerese a kontrollnak), és még 3 nappal a besugárzás után sem állt vissza kezdeti értékre. Ezzel szemben az összlépsejtek apoptozisánál kisebb mértékű változást tapasztaltunk a CD4+Foxp3- (effektor) és CD4+Foxp3+ (Treg) sejtek esetében, és az apoptózis kinetikája is eltérő volt. A sejtpusztulás relatív maximumát mindkét vizsgált sejtesoport egy nappal a besugárzás után érte el (5,4-szeres az effektor T-sejtek és 3,4-szeres a Treg sejtek esetén), és a harmadik napra kezdett normalizálódni az értéke (5. ábra).



5. ábra. Apoptózis gyakorisága egér lépsejtekben egésztest besugárzás után. Az egereket 2 Gy dózisú egésztest besugárzásnak vetettük alá. A lépsejteket a besugárzás utáni különböző időpontokban izoláltuk, a T-sejteket a megfelelő fluoreszcens ellenanyagokkal jelöltük, és az apoptózist TUNEL módszerrel mértük. Az eredmények a megfelelő sejtpopulációkon belül mért apoptotizált sejtek %-os arányát mutatja. Az oszlopok felett feltüntetett értékek a 0 Gy kontrolhoz viszonyított apoptózis gyakoriságának növekedését mutatják. Az eredmények 3-5 független kísérlet adataiból származnak, egy kísérletben 2 állatot használtunk csoportonként. A hibásávok a

szórásokat jelenítik meg. A szignifikancia értékét a 0Gy kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg, $p < 0,05$ esetén *, és $p < 0,001$ esetén ** jelölést alkalmaztunk.

Az effektor T-sejtek spontán apoptózisa kisebb mértékű volt, mint a Treg sejteké. A besugárzást követően azonban minden vizsgált időpontban az effektor T-sejtek esetén nagyobb mértékű relatív sejthalált tudtunk mérni, a Treg sejtekhez hasonlítva, noha ez a különbség a harmadik napon vált szignifikánssá. A besugárzás utáni harmadik napon a Treg sejtek apoptózisa a kontrol szint alá csökkent (0,7-szerese a 0 Gy értékének), az effektor T-sejtek esetében ez még nem figyelhető meg ebben az időpillanatban (2,1-szerese a 0 Gy értékének). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a Treg sejtek kevésbé érzékenyek a sugárzás-indukálta apoptózisra, mint az effektor T-sejtek, és a sejtek regenerálódása is hamarabb megtörténik.

5.2. Sugárzás hatása a lépsejt alpopulációk arányainak változására

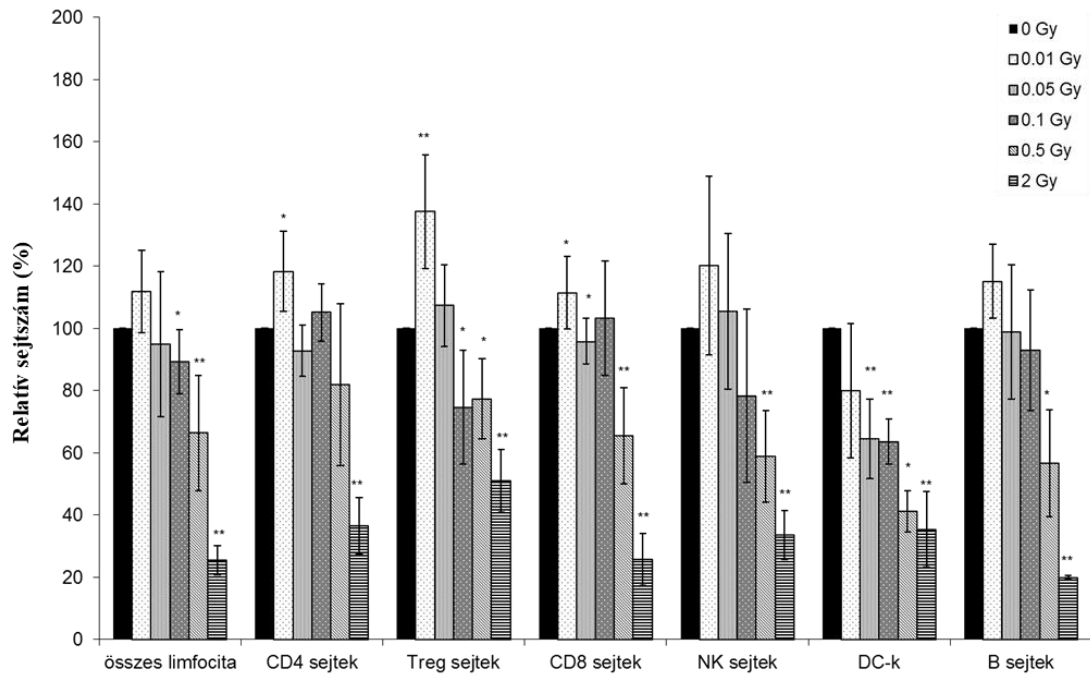
5.2.1. A lépsejt alpopulációk mennyisége sejttípusonként eltérően változik besugárzás után

Az egyes limfocita alpopulációk apoptózisra való hajlamánál azt vettük észre, hogy az jelentős mértékben változott a vizsgált sejttípustól függően. Ezért a továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a már említett lépsejt alpopulációk mennyisége a besugárzás hatására 1 nap, 3 nap és 7 nap után hogyan változott (6A, B és C. ábra, összefoglalva a 4. táblázatban.).

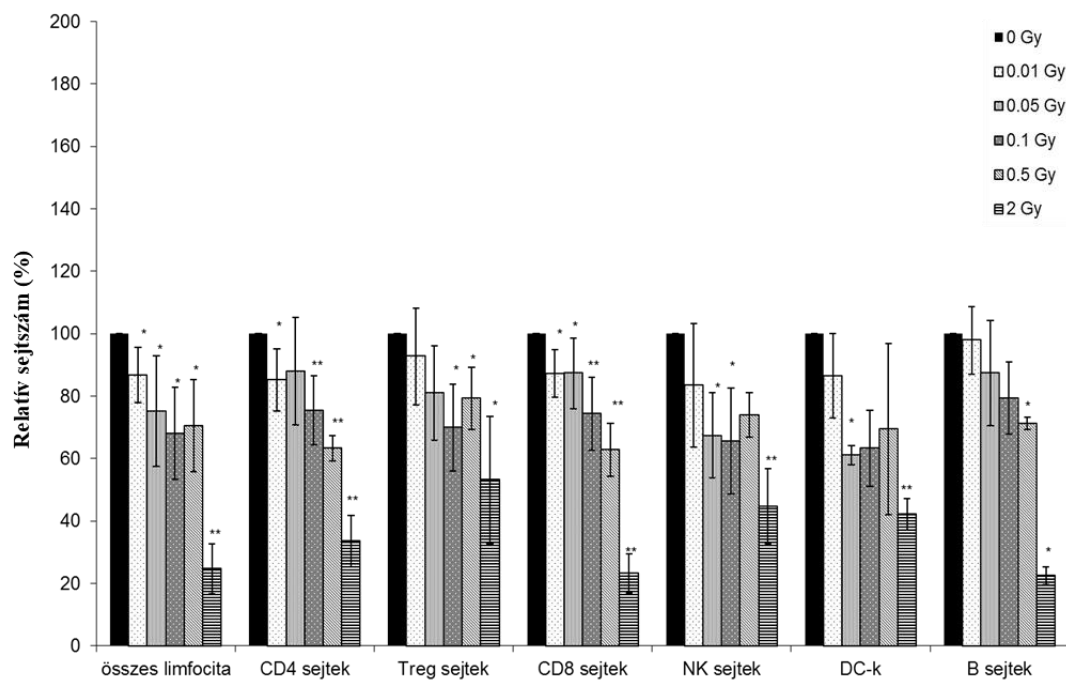
Egy nappal a 0,01 Gy dózisú besugárzás után sejtszámnövekedést figyeltünk meg a lépsejtekben, és a legtöbb vizsgált sejtpopulációban is hasonló volt a tendencia (6A. ábra). Nagyobb dózisokkal (0,05 Gy – 0,5 Gy) történő besugárzás után dóziszfüggő csökkenést mértünk a lépsejtekben, és ez a változás hasonló volt az NK, a B- és a Treg sejtekben is. A CD4⁺ és CD8⁺ sejtek sokkal kevésbé bizonyultak érzékenynek kis dózisú besugárzásra, míg a DC sejtek száma csökkent. A 2 Gy besugárzás jelentős sejtszám csökkenést idézett elő a lépsejtekben, de az egyes alpopulációk között szembetűnő különbségeket találtunk. Az összes lépsejt 25%-a maradt életben a besugárzást követő első napon. A CD8⁺ sejtek hasonló tendenciát mutattak, de a CD4⁺ sejtek, az NK sejtek, a DC-k és különösen a Treg sejtek szignifikánsabban nagyobb

túlélő frakcióval rendelkeztek. A B-sejtek szignifikánsan érzékenyebbek voltak a 2 Gy besugárzásra, mint bármelyik másik sejttípus (19,8% túlélő sejt).

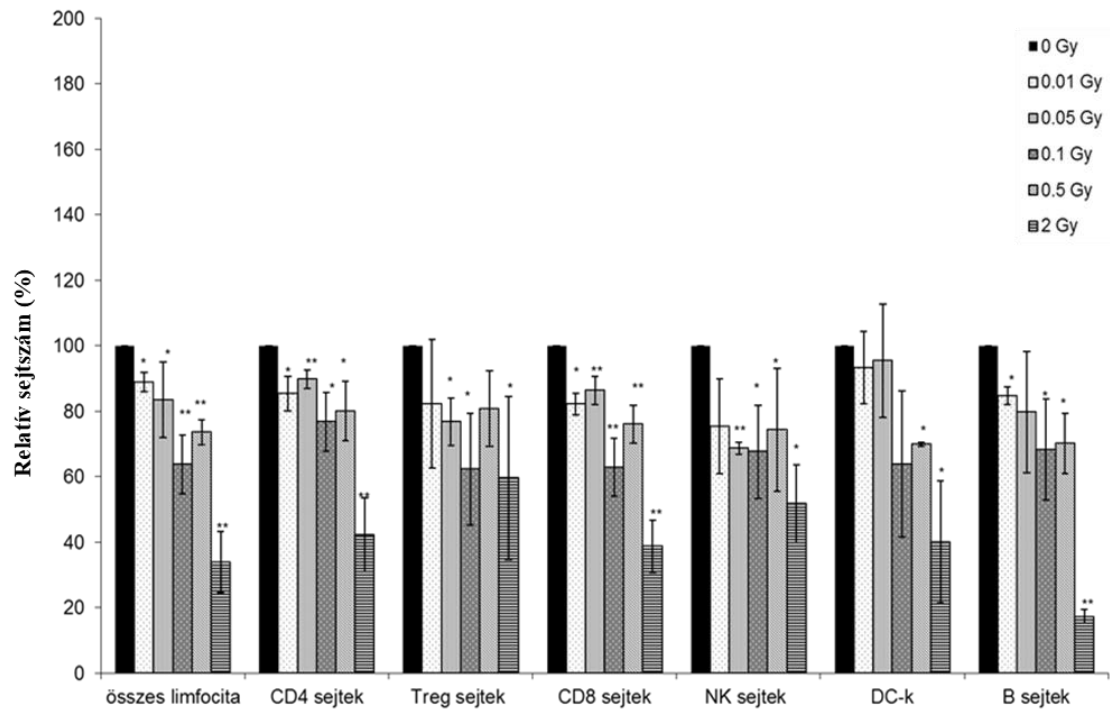
6A. ábra



6B. ábra



6C. ábra



6. ábra. Egér lépsejt-populációk relatív változása egésztest besugárzás után. Az egereket egésztest besugárzásnak vetettük alá az ábrán jelölt dózisokkal. A lépsejteket a besugárzás után 1 nappal (A), 3 nappal (B) és 7 nappal (C) izoláltuk, majd a sejtpopulációkat a megfelelő fluoreszcens ellenanyagokkal jelöltük és áramlósos citométerrel elemeztük. A lépsejt-populációk arányainak változását a megfelelő 0Gy kontrollhoz viszonyítva ábrázoltuk. Az eredmények 6 (A és B) illetve 4 (C) független kísérlet adataiból származnak. A hibasávok a szórásokat jelenítik meg, $p < 0,05$ esetén *, és $p < 0,001$ esetén ** jelölést alkalmaztunk.

4. táblázat. Egér lépsejt-populációk százalékos aránya egésztest besugárzás után különböző időpontokban. Az eredmények 4 független kísérlet adataiból származnak. A zárójelben a szórást tüntettük fel. A szignifikancia értékét a 0Gy kontrolhoz viszonyítva határoztuk meg, $p < 0,05$ esetén *, és $p < 0,001$ esetén ** jelölést alkalmaztunk.

	CD4 sejtek	Treg sejtek	CD8 sejtek	NK sejtek	DC-k	B sejtek
nem besugarazott kontrol	16.74 (± 3.36)	1.84 (± 0.48)	10.71 (± 2.37)	6.37 (± 1.72)	5.79 (± 1.87)	55.87 (± 6.26)
0.01 Gy	16.05 (± 2.77)	2.02 (± 0.62)	10.07 (± 1.96)	5.98 (± 1.73)	5.58 (± 1.85)	61.94 (± 3.06)*
0.05 Gy	15.8 (± 2.24)	2.04 (± 0.68)	10.05 (± 1.52)	6.33 (± 1.32)	5.03 (± 0.57)*	58.86 (± 1.5)*
1. nap: 0.1 Gy	15.96 (± 3)	1.81 (± 0.59)	10.23 (± 1.44)	5.77 (± 1.59)	5.86 (± 2.26)	59.65 (± 4.76)
0.5 Gy	17.67 (± 4.36)	2.63 (± 0.8)*	10.53 (± 2.8)	6.15 (± 1.58)	6.12 (± 2.07)	56.82 (± 4.52)
2 Gy	19.68 (± 2.99)	4.04 (± 1.46)**	7.85 (± 0.57)**	9.36 (± 1.8)**	8.86 (± 1.47)*	49.44 (± 5.17)
0.01Gy	21.35 (± 3.18)*	2.22 (± 0.32)*	13.19 (± 1.42)**	6.33 (± 0.8)	5.35 (± 1.37)	53.31 (± 5.24)
0.05Gy	22.22 (± 2.62)**	2.26 (± 0.13)**	13.61 (± 2.52)*	6 (± 0.9)	4.86 (± 0.28)	51.55 (± 5.4)
3. nap: 0.1Gy	21.01 (± 2.41)**	2.35 (± 0.24)**	12.7 (± 2.2)*	5.7 (± 0.9)	4.65 (± 0.44)	54.9 (± 4.49)
0.5Gy	21.46 (± 2.79)*	2.44 (± 0.29)**	12.98 (± 1.78)*	7.71 (± 1.08)*	5.37 (± 1.84)	41.79 (± 3.42)*
2Gy	30.90 (± 3.23)**	5.03 (± 1.07)**	12.61 (± 2.75)	13.67 (± 2.34)**	6.537 (± 2.6)	31.18 (± 9.42)*
0.01Gy	17.64 (± 1.59)	1.76 (± 0.29)	12 (± 1.67)	5.11 (± 1.92)	5.21 (± 1.63)	50.1 (± 1.52)*
0.05Gy	18.51 (± 1.45)*	1.92 (± 0.25)	12.14 (± 1.28)*	6.2 (± 2.57)	5.25 (± 2.21)	53.37 (± 11.15)
7. nap: 0.1Gy	16.7 (± 3.07)	1.97 (± 0.11)*	11.11 (± 2.29)	5.56 (± 1.85)	4.45 (± 1.49)	51.12 (± 2.43)*
0.5Gy	17.7 (± 1.1)	2.1 (± 0.28)	11.12 (± 1.52)	5.24 (± 1.05)	5.23 (± 2.13)	54.19 (± 1.96)
2Gy	21.19 (± 3.09)*	3.18 (± 0.89)*	13 (± 2.09)*	8.34 (± 2.39)	7.24 (± 1.24)	36.08 (± 9.64)*

A besugárzást követő harmadik napra a lépsejtszám elérte a minimumát (6B. ábra), 0,05 Gy dózisú besugárzás kb. 25%-kal csökkentette a lépsejtek számát, és az nem változott 0,1 Gy és 0,5Gy besugárzás után sem. A Treg sejtek, az NK sejtek és a DC-k relatív száma alacsonyabb volt 0,1 Gy besugárzás után, mint 0,5 Gy után, ami egy esetleges hiperérzékenységre utalhat kis dózis hatására, bár a változások nem voltak szignifikánsak. A CD4+, a CD8+ és a B-sejtek száma hasonló tendenciát mutatott, dózisfüggően csökkent a kis dózisok tartományában. A besugárzás utáni napon tapasztalt különbségek 2 Gy besugárzás után a harmadik napon is fennálltak; a CD4+/CD8+ és CD4+/CD4+CD25+ arány csak enyhén változott a korábbi időponthoz képest. A legrezisztensebbnek a Treg sejtek, az NK sejtek és a DC-k bizonyultak, a túlélő frakciók rendre 53%, 45% és 42% voltak.

Hét nappal a besugárzás után a lépsejtek száma csekély mértékben változott ahhoz képest, amit a besugárzást követő harmadik napon leírtunk (6C. ábra), bár a változások jellege különbözött a kis és nagy dózisok tartományában. A nagy dózisú (0,5 Gy – 2 Gy) besugárzás után a hetedik napra az összes vizsgált sejtcsoportban enyhe visszatérés volt tapasztalható a besugárzás előtti sejtszámok irányába.

5.2.2. Treg sejtek sugárrezisztenciájának lehetséges okai

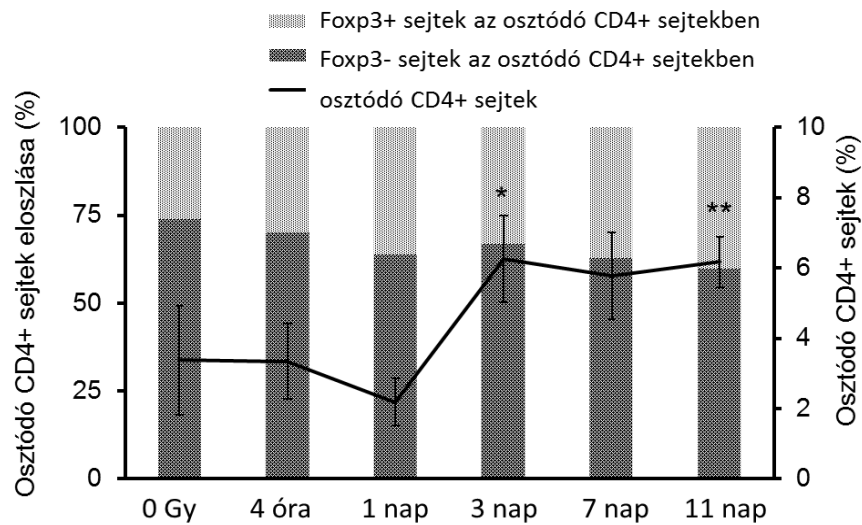
Az eredmények azt mutatják, hogy a CD4+ sejtek sokkal rezisztensebbek a sugárzással szemben, mint az összlépsejt populáció, ezen belül a Treg sejtek pedig még ellenállóbbak. Ez a különbség azt eredményezte, hogy a nagy dózisú (2 Gy) besugárzás hatására a Treg sejtek aránya a CD4+ T-sejteken belül megemelkedett. E jelenség hátterét vizsgálva lépből izolált CD4+CD25+Foxp3+ sejtek számát és arányát mértük besugárzás után. A masszív sejtszám csökkenés már egy nappal a besugárzás után megjelent a lépsejtek között (a nem besugarazott kontrollhoz képest 4,24-szeres csökkenés), és tovább folytatódott a harmadik nap is (5,38-szoros csökkenés a kontrollhoz képest), míg a hetedik napra egy enyhe regenerációt tapasztaltunk (3,78-szoros csökkenés). Hasonló sejtszám csökkenést kaptunk a CD4+ lépsejtek és a CD4+CD25+Foxp3+ Treg sejtek populációjában is, de a sejtszám csökkenés kevésbé volt jelentős (3,9-szeres, 4,58-szoros, ill. 3,11-szeres a CD4+ sejtek között, és 2,92-szeres, 3-szoros, ill. 1,98-szoros a Treg sejtek között) (5. táblázat).

5. táblázat. Lépsejt populációk sejtszámainak időbeli változása besugárzás után egérben. Az abszolút sejtszámokból a CD4+CD25+Foxp3+ sejtek arányát és annak változását határozhatjuk meg a CD4+ sejtek populációján belül. A lépsejteket a besugárzás után különböző időpontokban izoláltuk, majd a sejtpopulációkat a megfelelő specifikus fluoreszcens ellenanyagokkal jelöltük. Abszolút sejtszámokat ($\times 10^6$) adtunk meg, zárójelben a szórásokat tüntettük fel. Az eredmények 4 független kísérlet adataiból származnak. A besugárzás után 3 és 7 nappal számolt szignifikancia értékeket az 1 napos és 3 napos adatokkal összehasonlítva számoltuk, $p < 0,05$ esetén * jelölést alkalmaztunk.

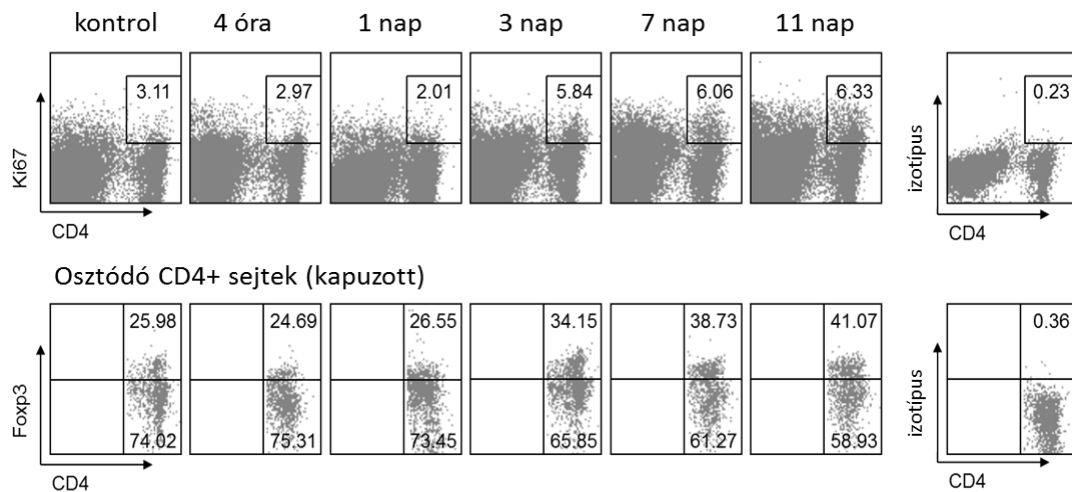
Besugárzás utáni nap	Összes limfocita	CD4+ sejtek	CD4+Foxp3+CD25+ Treg sejtek
kontrol	125.32 (± 26.06)	22.21 (± 4.91)	1.93 (± 0.53)
1	29.55 (± 3.27)	5.7 (± 0.62)	0.66 (± 0.12)
3	23.28 (± 2.57)*	4.85 (± 1.04)	0.64 (± 0.16)
7	33.17 (± 9.49)*	7.15 (± 1.96)*	0.97 (± 0.37)*

A nagyfokú limfopénia után a sejtek homeosztatisztikus osztódása biztosítja a sejtszám helyreállítását a szervezetben. Az egyenlőtlen mértékű osztódás szerepet játszhat a limfocita populációk időleges arányváltozásaiban is, ezért megvizsgáltuk a CD4+Foxp3- effektor T-sejtek és a CD4+Foxp3+ Treg sejtek proliferációs rátája közötti különbséget. Ehhez az intracellulárisan kifejeződő Ki-67 markert használtuk. A nem-besugarazott állatokban a CD4+ populáción belül 3,4% osztódó CD4+ sejtet találtunk. Ez az érték 2 Gy besugárzás utáni napra fokozatosan lecsökkent, majd a harmadik napra 6,2%-ra emelkedett az osztódó sejtek aránya, és a későbbi vizsgálati időpontokban gyakorlatilag változatlan maradt (7A és B. ábra).

7A. ábra



7B. ábra



7. ábra. CD4+ alpopulációk sejtosztódási kinetikájának változása 2 Gy besugárzás hatására egér lépben. A Ki67+ sejtek arányát a CD4+ populáción belül határoztuk meg 4 órával, 1, 3, 7 és 11 nappal a besugárzás után. **(A)** A vízszintes vonal a CD4+Ki67+ sejtek százalékos arányát mutatja a CD4+ populáción belül az idő függvényében. Az oszlopok a CD4+Foxp3- és CD4+Foxp3+ sejtek százalékos megoszlását mutatják az osztódó CD4+ sejteken belül. Az adatok 3-5 független kísérlet eredményét mutatják, egy kísérletben 2 állatot használtunk csoportonként. **(B)** Egy tipikus kísérlet áramlamos citometriás elemzését mutatja az ábra. A számok az adott markerre pozitív sejtek százalékos arányát jelentik.

Az osztódó sejteken belül a Foxp3⁻/Foxp3⁺ sejtek aránya a kezdeti 74/26-ról a besugárzás utáni 11. napra 59/41-re változott. Ezekből az adatokból arra következtethetünk, hogy a besugárzott egérben a Treg sejtek proliferációs dinamikája jóval nagyobb volt, mint a Foxp3⁻ T-sejteké, amely a csökkent apoptotikus rátával együtt eredményezi a fentiekben tapasztalt mértékű Treg feldúsulást a lépben.

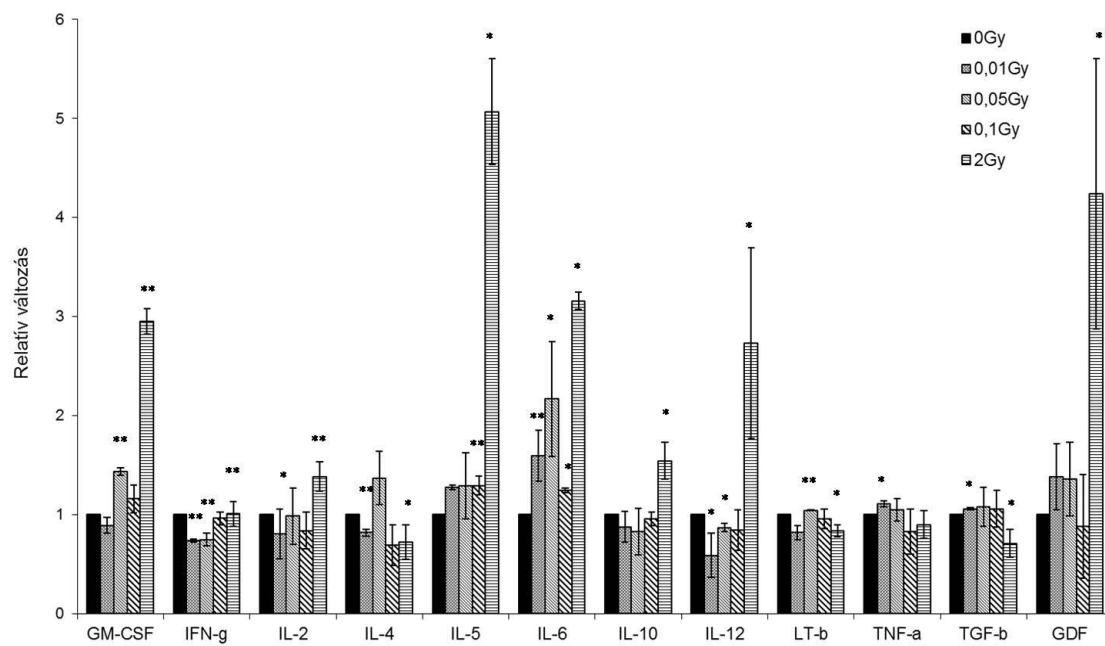
Hogy megvizsgáljuk annak a lehetőségét, hogy a Treg sejtek CD4⁺ sejteken belüli szelektív arányváltozása nem a Foxp3⁻ sejtek *in vivo* konverziójának következménye-e, egereket i.v. oltottunk izolált, CFSE-jelölt effektor T-sejtekkel, és 1 nappal később 2 Gy dózissal besugárztuk őket. A besugárzást követő 5. napon meghatároztuk a CFSE⁺ sejtek fenotípusát. A CFSE⁺ sejtek aránya a lépben mind a besugárzott, mind a kontroll állatokban kb. 0,5%-a volt az összes lépsejtnek. A CFSE⁺ Treg sejtek aránya a lépben a kísérlet kezdetén 0,73% volt. Konverzióról akkor beszélhetnénk, ha ez az arány jelentősen megnőtt volna, így arra következtethetünk, hogy a CD4⁺Foxp3⁻ effektor T-sejtek nem alakultak át CD4⁺Foxp3⁺ Treg sejtekké besugárzás hatására.

5.3. A besugárzás megváltoztatja a lépsejtek citokin génexpresszióját

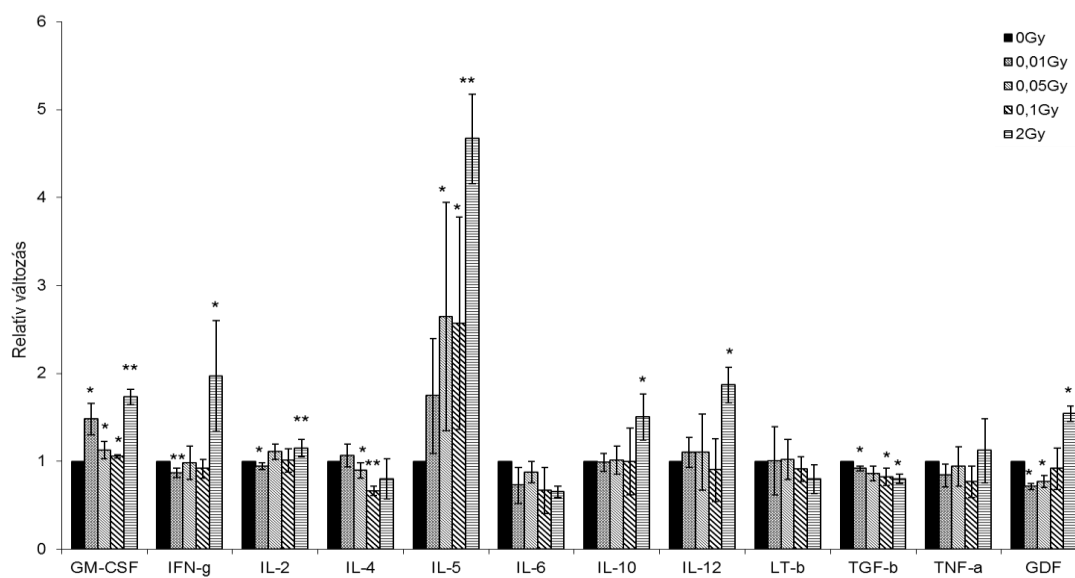
A besugárzott egerek lépsejtjeiből RNS-t izolálva meghatároztuk a citokin génexpressziós profiljukat. A különböző citokinek relatív mennyiségét qRT-PCR segítségével mutattuk ki. A citokintermelés időfüggésének vizsgálatához több kísérleti végpontot használtunk: besugárzás után 4 órával, 1 nappal, 3 nappal (8A, B és C. ábra). A vizsgált citokinek között a Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ , LT- β és TNF- α), Th2 (IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β) és hematopoetikus növekedési faktor jellegűek (GM-CSF, IL-5) is voltak. A Th1 sejtek által termelt citokinek a gyulladásos folyamatok elindításában játszanak szerepet, a Th2 sejtek által termelt citokinek pedig az ellenanyagok termelését segítik elő. Vizsgáltuk továbbá a GDF15 expressziójának a változását a sugárzás hatására. A GDF15 egy citokin-jellegű fehérje, melynek a limfocitákra gyakorolt biológiai funkciója nem pontosan ismert. Vizsgálataink szempontjából azért volt érdekes, mert korábbi eredményeink (Kis és mtsai. 2006, Sándor és mtsai. 2015) és irodalmi adatok (Schiegnitz és mtsai. 2016) alapján a fehérje expressziója dózisfüggő változásokat mutatott, tehát lehetséges, hogy egy sugárválasz génről van szó.

A nagy dózisú (2 Gy) besugárzás a legtöbb vizsgált citokin kifejeződését megváltoztatta jellemzően növelve azt. Kis dózisú besugárzás után is kimutathatók voltak változások, de azok sokkal kisebb mértékűek és kevésbé egyértelműnek bizonyultak, mint a nagy dózisú besugárzás hatására végbement változások. IFN- γ és az IL-2 expresszió csökkent kis dózisú besugárzás után, és nőtt 2 Gy besugárzás után minden vizsgálati időpontban, jóllehet a legkifejezettebb a változás a besugárzást követő negyedik órában és harmadik napon volt. Az IL-12 expresszió csökkent kis dózis és nőtt nagy dózis hatására a besugárzás utáni legkorábbi időpontban, és 3 nap múlva visszaállt a kontroll szintre. Az LT- β citokin expressziója majdnem 50%-kal csökkent a 2 Gy besugárzást követő harmadik napra, ám a kis dózisú besugárzás nem volt hatással rá. Az IL-4 génkifejeződése mind a kis, mind a nagy dózis hatására csökkent 4 órával a kezelés után. A kis dózisú besugárzás okozta változás még 3 nappal később is mérhető volt, ezzel szemben 2 Gy besugárzás után visszatért a normál szintre. Az IL-6 expressziója kétfázisos jelleget mutatott: 4 órával a besugárzás után szignifikáns emelkedést detektáltunk minden dózissra. Később, egy nappal a besugárzás után a szintje a kontroll érték alá csökkent, és a kezelés utáni harmadik napra állt vissza a normál értékre. Az IL-10 citokin a kezdeti időpontokban nem változott, a legjelentősebb dóziszfüggő expresszió-növekedést a besugárzás után 3 nappal mértük. A GDF-15 expressziója csökkent a kis dózisú besugárzás hatására a kezelést követő napon, míg 2 Gy besugárzás hatására a szintje tartósan megemelkedett, egészen a harmadik napig. A GM-CSF génkifejeződésre nem volt hatással a kis dózisú besugárzás. Két Gy dózis után azonban kétfázisú görbét mutatott (de az IL-6-hoz képest eltérő lefutású): a legjelentősebb overexpresszió a besugárzás után 4 órával és 3 nappal mutatkozott, a besugárzás után 1 nappal azonban a gén kifejeződésének mértéke visszaesett. Mind a kis, mind a nagy dózisú besugárzás az IL-5 expresszió növekedését okozta, minden vizsgált végpontban.

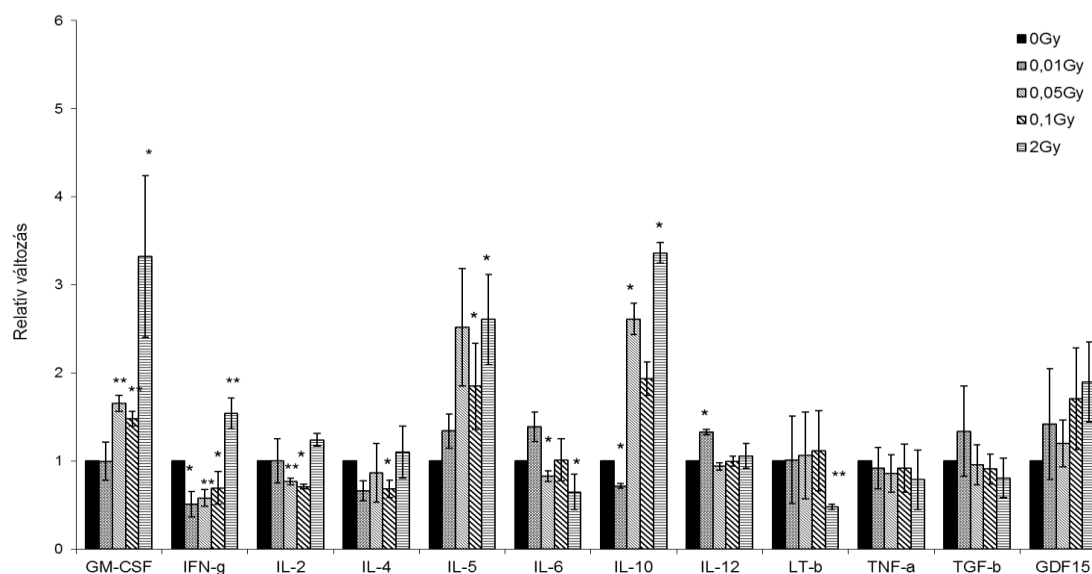
8A. ábra



8B. ábra



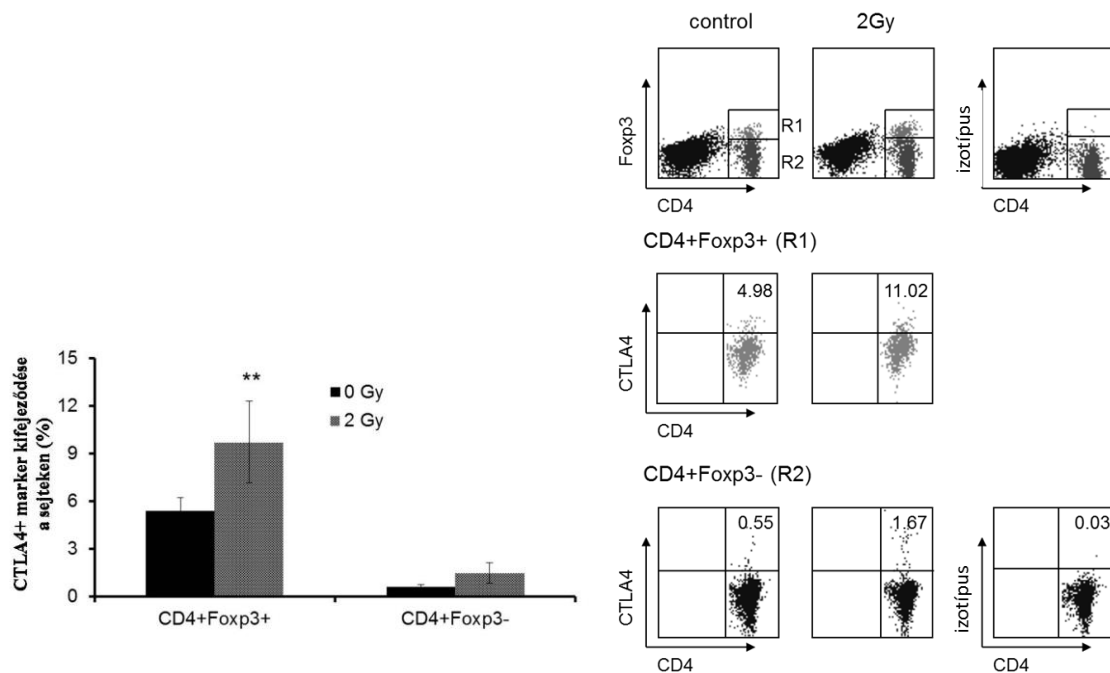
8C. ábra



8. ábra. Egér lépsejtek citokin génexpressziójának változása besugárzás után. Az egésztest besugárzás után 4 órával **(A)**, 1 nappal **(B)** és 3 nappal **(C)** a lépkekből RNS-t izoláltunk, és a citokin expressziós mintázatot qRT-PCR-rel vizsgáltuk. Az adatok 3 független kísérlet eredményei, ahol minden kísérletben dózisonként 2-2 állat lépsejtjeit átlagolva értékeltük. A hibasávok a szórást tüntetik fel. A szignifikancia értékét a 0Gy kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg, $p < 0,05$ esetén *, és $p < 0,001$ esetén ** jelölést alkalmaztunk.

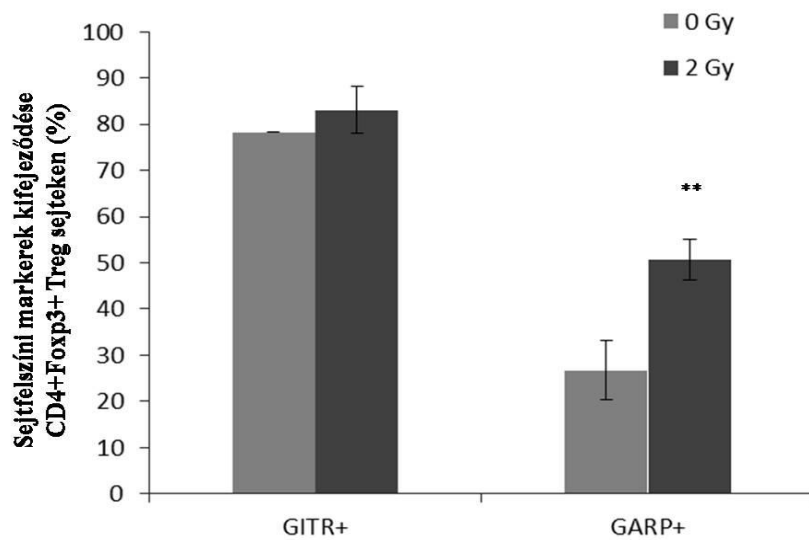
5.4. Treg sejtek funkcionális változása 2Gy besugárzás hatására

A besugárzás a Treg sejtek funkcionális épségét több módon is megváltoztathatja: a sejtfelszíni receptorok mennyiségének csökkentésével vagy növelésével, illetve a citokintermelés módosításával. Három, a T sejtek aktivációs szintjét jellemző sejtfelszíni fehérje kifejeződését követtük nyomon, a CTLA-4, a GARP és a GITR molekuláét. Az *in vivo* egésztest besugárzás után 3nappal izolált lépben festettük a sejteket a megfelelő markerekkel. Eredményeink szerint a CTLA-4 molekulát expresszáló Treg sejtek aránya a besugárzás előtt 5,3% volt, amely 2 Gy besugárzás hatására 10,5%-ra nőtt. Érdekes módon a CTLA-4 expresszió az effektor T-sejteken is növekvő tendenciát mutatott (9. ábra).



9. ábra. A CTLA4 sejtfelszíni marker növekedése a CD4+ alpopulációkban 2 Gy besugárzás után egér lépben.(A) A frissen izolált lépsejteken a megfelelő markerek jelölése után a CTLA4+ sejtek arányát határoztuk meg a CD4+Foxp3- (T effektor) és CD4+Foxp3+ (Treg) sejtpopulációkban. Az adatok 3 független kísérlet eredményeit mutatják, csoportonként 2 állattal. A hibasávok a szórást tüntetik fel. A szignifikancia értéket $p < 0,001$ esetén ** -al jelöltük. (B) Egy tipikus kísérlet áramlási citometriás elemzését és kapuzási stratégiáját mutatja az ábra. A számok az adott markerre pozitív sejtek százalékos arányát jelentik.

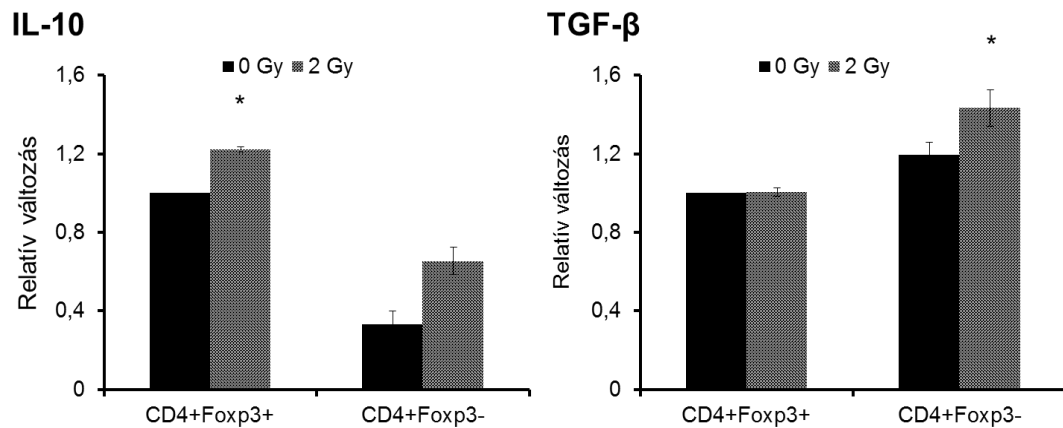
A GARP fehérje szintje 26,77%-ról 50,65%-ra nőtt a Treg sejteken a besugárzás hatására. Hasonlóképpen a besugárzás fokozta a GITR marker sejtfelszíni megjelenését is a Treg sejteken (78,24%-ról 83,05%-ra) (10. ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy 2 Gy besugárzás hatására mérsékelten megnőtt az aktivációs markerek expressziója a Treg sejteken.



10. ábra. A GITR és GARP sejtfelszíni marker növekedése a CD4+Foxp3+ Treg sejteken 2 Gy besugárzás után egér lépben. A frissen izolált lépsejteken a Treg sejtek azonosítására szolgáló markerek jelölése után a GITR+ és GARP+ sejtek arányát határoztuk meg. Az adatok 3 független kísérlet eredményeit mutatják, csoportonként 2 állattal. A hibásávok a szórást tüntetik fel. A szignifikancia értéket $p < 0,001$ esetén ** -al jelöltük.

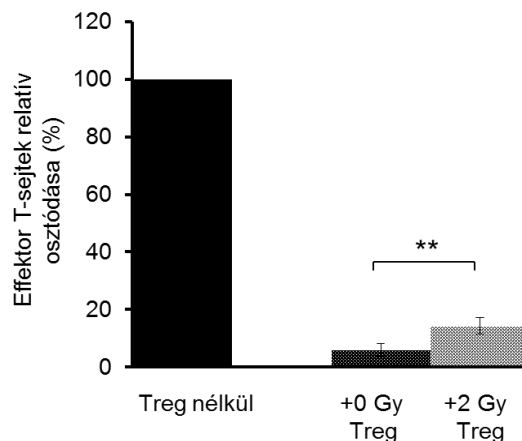
A T-sejt gátlásban résztvevő sejtfelszíni markereken kívül a Treg sejtek több olyan citokint is kifejeznek, melyeknek a szupressziós fenotípus fenntartásában jelentőségük van. Ezek közül mi az IL-10 és a TGF β citokinek expressziós változását vizsgáltuk 2 Gy besugárzás hatására izolált Treg és effektor T-sejtekben. Az IL-10 mRNS-expresszió alapszintje magasabb volt Treg sejtekben, mint effektor T-sejtekben. Besugárzás hatására enyhe (1,2-szeres) emelkedést tapasztaltunk Treg sejtekben (11. ábra). Érdekes módon az effektor T-sejtek esetén is ki tudtunk mutatni expresszió növekedésre utaló tendenciát, amely egy kicsit nagyobb mértékű (1,4-szeres) volt, mint a Treg sejtekben. A TGF β expresszió alapszintje a CD4+Foxp3- effektor T sejtekben nagyobb volt a Treg sejtekben mért szinthez képest, és a besugárzás csak tovább növelte a génkifejeződést, míg Treg sejtekben változatlan maradt. Az eredményeink alapján megállapítható, hogy az effektor T-sejtekben az IL-10 és a TGF β expresszió jelentősebb mértékben nőtt meg, mint a Treg sejtekben, bár hozzá kell tenni, hogy ezek a

különbségek relatíve kicsik, és nem feltétlenül tükrözik a szekretált citokin mennyiségének aktuális változását.



11. ábra. CD4+ sejtpopulációk IL-10 és TGFβ citokin génkifejeződésének változása egér lépben. 2 Gy besugárzás után 3 nappal szeparált Treg és effektor T-sejtekből RNS-t izoláltunk, majd a citokin expressziós mintázatot qRT-PCR-rel mértük. Az adatok 2 független kísérlet eredményei, ahol minden kísérletben 2 mintát értékeltünk. A hibasávok a szórást tüntetik fel. A szignifikancia értékét a 0Gy kontrolhoz viszonyítva határoztuk meg, $p < 0,05$ esetén *jelölést alkalmaztunk.

A Treg sejteknek a T effektor sejtek proliferációját gátló képességét *in vitro* funkcionális tesztekkel vizsgáltuk. Treg sejteket a 2 Gy dózissal besugarazott és a nem besugarazott kontroll állatokból izoláltunk a besugárzás után 3 nappal, majd együtt tenyésztettük nem besugarazott effektor T-sejtekkel. A T-sejtek proliferációjának mérése volt a kísérlet végpontja. Azt tapasztaltuk, hogy míg a kontroll Treg sejtek 6%-ra lecsökkentették az osztódó effektor T-sejtek arányát, addig a besugarazott állatból származó Treg sejtek csupán 14%-ra tudták csökkenteni a proliferáló T-sejtek arányát (12. ábra). Ez a szignifikáns szuppressziós kapacitás-csökkenés arra utal, hogy a 2 Gy besugárzás kárt tesz a Treg sejtek funkcionális épségében.

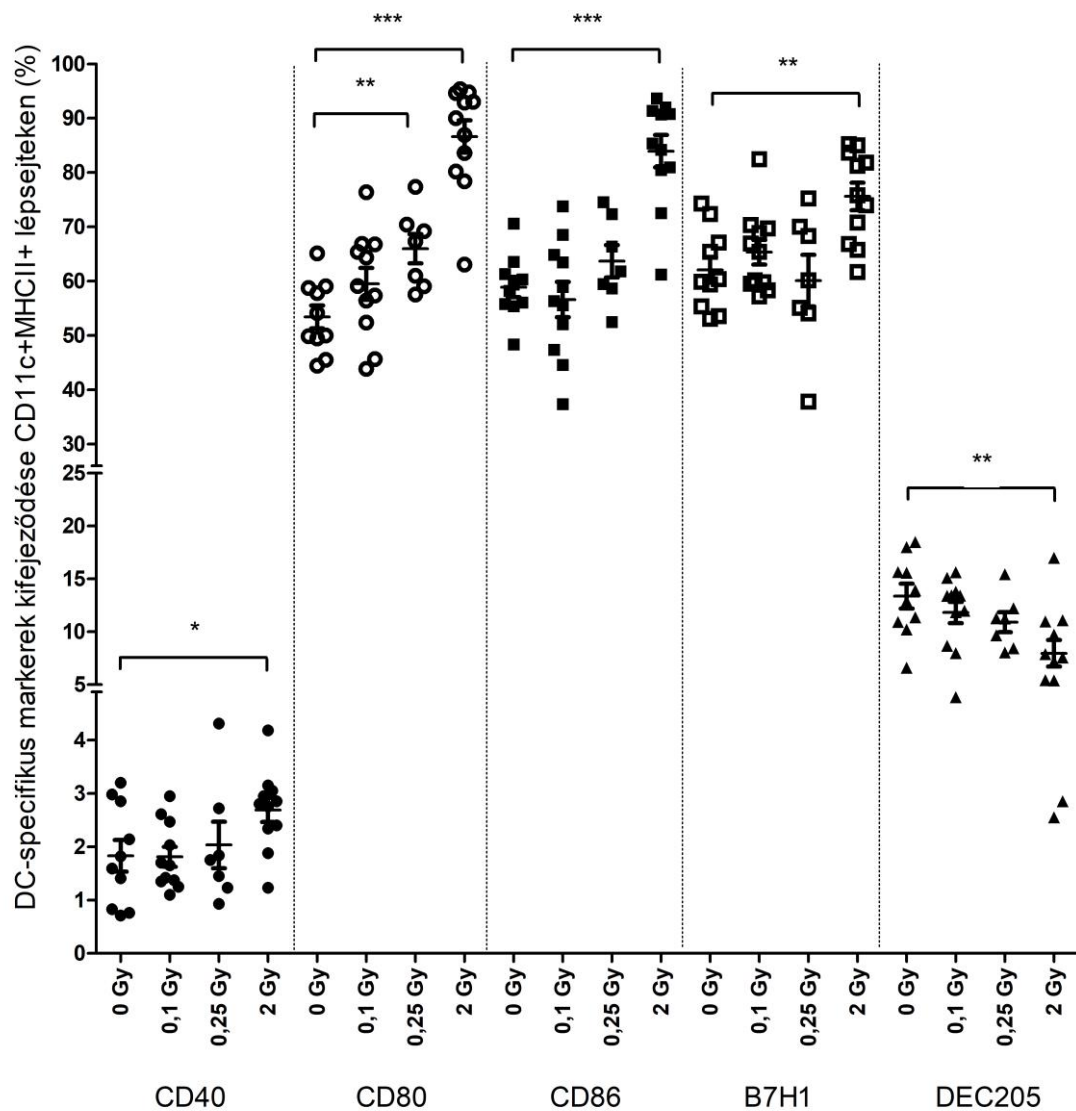


12. ábra. Treg sejtek gátló képességének változása besugárzás hatására egér lépben. A Treg és effektor T-sejteket mágneses szeparáció módszerével izoláltuk a besugárzást követő harmadik napon. A sejteket 5 napig tenyésztettük együtt. Az effektor T-sejtek proliferációját ^3H timidin inkorporáció méréseiből határoztuk meg. A relatív proliferációt a Treg nélkül tenyésztett effektor T-sejtek proliferációjának mértékéhez viszonyítva értékeltük. Az adatok 4 független kísérlet eredményei, ahol minden kísérletben csoportonként 2 párhuzamos mintát értékeltünk. A hibasávok a szórást tüntetik fel. A szignifikancia értéket $p < 0,001$ esetén ** -al jelöltük.

5.5. DC-k funkcionális változása 2Gy besugárzás hatására

A DC-k funkcionális változásainak értékelését több szempont alapján végezhetjük. Először a sejtfelszíni kostimulációs molekulák változásaiból következtethetünk a megváltozott működésre a besugárzás utáni első napon, majd a DC-k antigén felvételének és -bemutatásának változását vizsgáltuk.

Az érett egér lép DC-kre jellemző a CD80, CD86 és CD40 molekulák expressziója, mely aktiváció hatására fokozódik. Kis dózisú besugárzás után a receptorok kifejeződése nem változott, kivétel ez alól a 0,25Gy besugárzás után tapasztalt enyhe emelkedés a CD80 szintjében (53,43%-ról 65,99%-ra), illetve a DEC205 markert kifejező DC-k mennyiségének kismértékű csökkenése (13,37%-ról 11,83%-ra) (13. ábra).

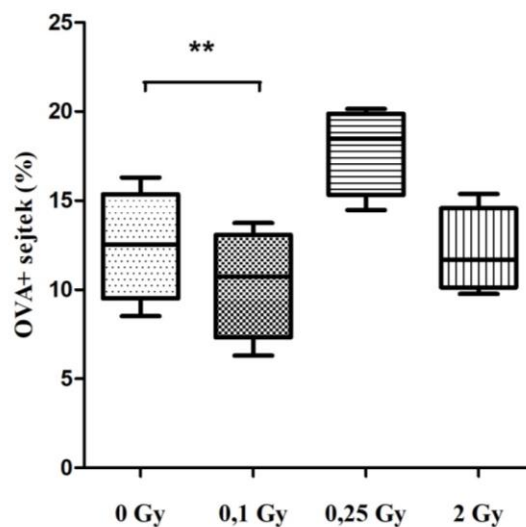


13. ábra. A DC sejtek sejtfelszíni markereinek változása egér lépben. A 2 Gy besugárzás után 1 nappal frissen izolált lépsejteken a DC sejtek azonosítására szolgáló CD11c és MHCII markerek jelölése után a ko-stimulációs (CD40, CD80, CD86), antigénfelvételhez kapcsolódó (DEC205) és ko-inhibíciós (B7H1) markereket kifejező sejtek arányát határoztuk meg. Az adatok 5-6 független kísérlet eredményeit mutatják, csoportonként 2 állattal. A hibasávok a szórást tüntetik fel. A szignifikancia érték $p < 0,05$ esetén *, $p < 0,001$ esetén **, $p < 0,0001$ esetén *** jelölést alkalmaztunk.

A DC-k felszínén kifejeződő DEC205 fehérje egy mannóz receptor, amely az antigénfelvételben, feldolgozásban és bemutatásban játszik szerepet (Jiang és mtsai.

1995). A T-sejt válasz kiváltásában szerepet játszó kostimulációs fehérjék 2 Gy besugárzás hatására a DC populáció nagyobb részének felszínén expresszázódtak. Legszembetűnőbb a CD86 és a CD80 marker emelkedése volt, előbbi 2-szeresére, utóbbi 5,5-szörösére változott a nem besugárzott kontroll mintákhoz képest. A T-sejt válasz gátlásában részt vevő B7-H1 marker kifejeződése a besugárzás hatására 2,9-szeresére emelkedett a sejteken.

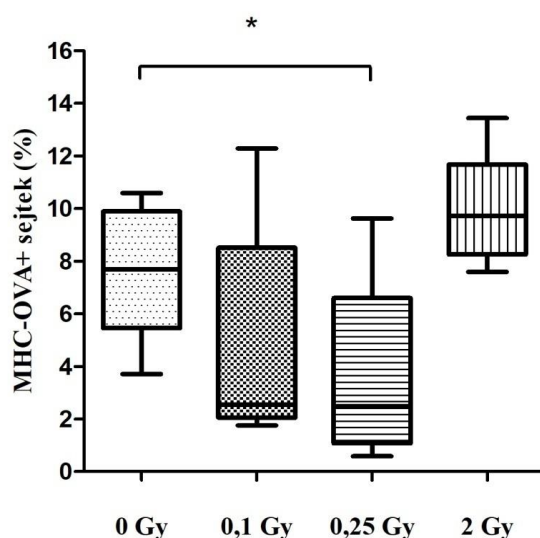
Láttuk, hogy az antigénfelvételért felelős DEC205 kifejeződésének mértéke kismértékben csökkent a DC populáción belül 0,25 Gy besugárzás után 1 nappal. A továbbiakban ezért megvizsgáltuk, hogy ez a változás a DC-k antigénfelvevő képességére is ilyen hatással van-e. A funcionális esszé során egy jelölt OVA peptiddel inkubáltuk a kontroll és besugárzott sejteket. Érdekes módon azt találtuk, hogy 0,1 Gy besugárzás után a DC-k kevesebb jelölt OVA peptidet vettek fel, mint a kontroll sejtek (12,46 ill. 10,38%). A nagy dózisú besugárzás nem változtatta meg szignifikánsan a sejtek antigénfelvevő képességét (14. ábra).



14. ábra. DC sejtek antigénfelvételi kapacitásának változása besugárzás hatására.

A besugárzás utáni napon izolált CD11c+ DC-ken fluoreszcensen jelölt OVA peptid segítségével mértük az antigén felvételt áramlási citométerrel. Ehhez a peptidet felvett sejtek százalékos arányát határoztuk meg az összes DC-n belül. Az adatok 3 független kísérlet eredményeit mutatják be. A hibasávok a szórást tüntetik fel. A szignifikancia érték $p < 0,05$ esetén * jelölést alkalmaztunk.

A 0,25Gy besugárzás a kontrollhoz (0Gy) képest csökkenti az DC-k antigénbemutató képességét (az eredmények szignifikancia közeliek) 1 nappal besugárzás után. Ezek az eredmények logikus összhangban állnak azzal, amit a sejtfelszíni DEC205 fehérje kifejeződésének változásával kapcsolatban tapasztaltunk 0,25Gy dózisú besugárzás után: a DEC205 szintje csökkent, míg az antigénbemutató képesség (ennek megfelelően) visszaesett a kontrollhoz képest. A nagy dózisú (2Gy) besugárzás után egy tendenciát láttunk az antigénbemutató képesség növekedésének irányában, de az eredményeink a 0Gy-hez viszonyítva nem adtak szignifikáns különbséget (15. ábra).

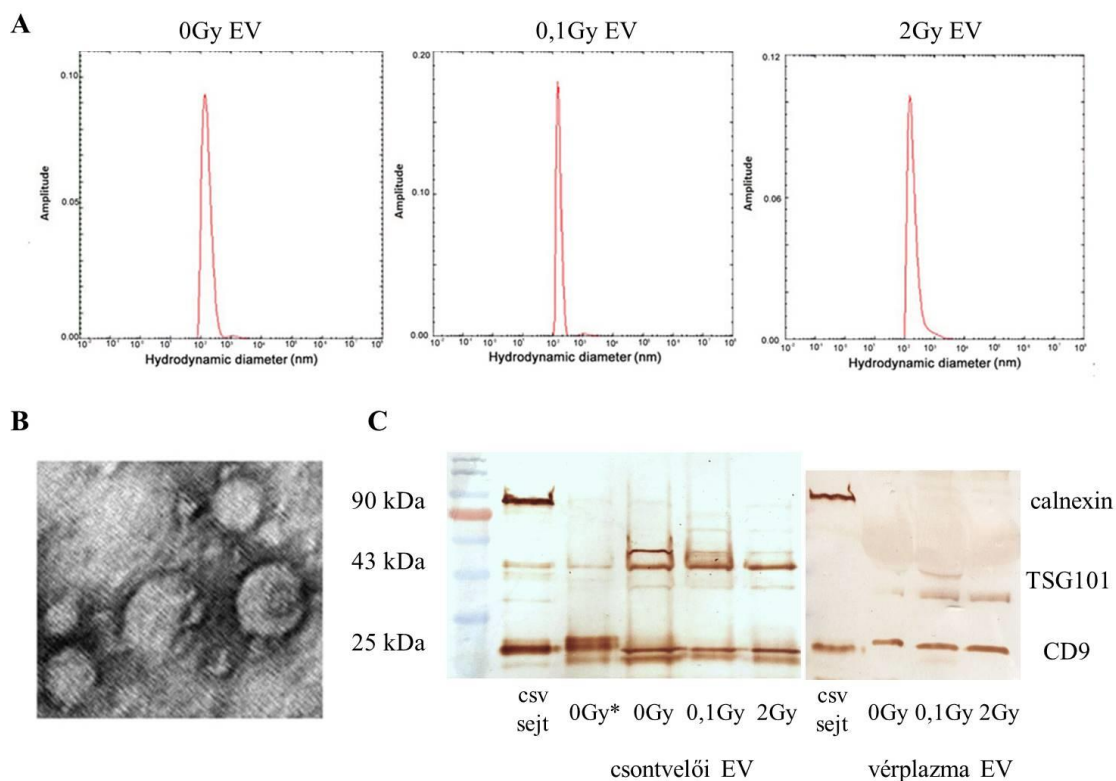


15. ábra. DC sejtek antigénbemutató képességének változása besugárzás hatására.

A besugárzás utáni napon izolált CD11c+ DC-ket OVA peptid jelenlétében inkubáltunk, majd fluoreszcensen jelölt MHC-OVA marker kifejeződését mértük áramlási citométerrel. Ehhez a peptidet bemutató sejtek százalékos arányát határoztuk meg az összes DC-n belül. Az adatok 3 független kísérlet eredményeit mutatják be. A hibasávok a szórást tüntetik fel.

5.6. Az izolált EV-k exoszómák és mikrovezikulumok

A DLS eredmények alapján a csontvelői EV-k átmérője 169 nm ($\pm$ SD = 83), 252 nm ($\pm$ SD = 136), illetve 226 nm ($\pm$ SD = 106) volt a 0 Gy, 0,1 Gy és 2 Gy dózissal besugárzott állatokban (16.B ábra).



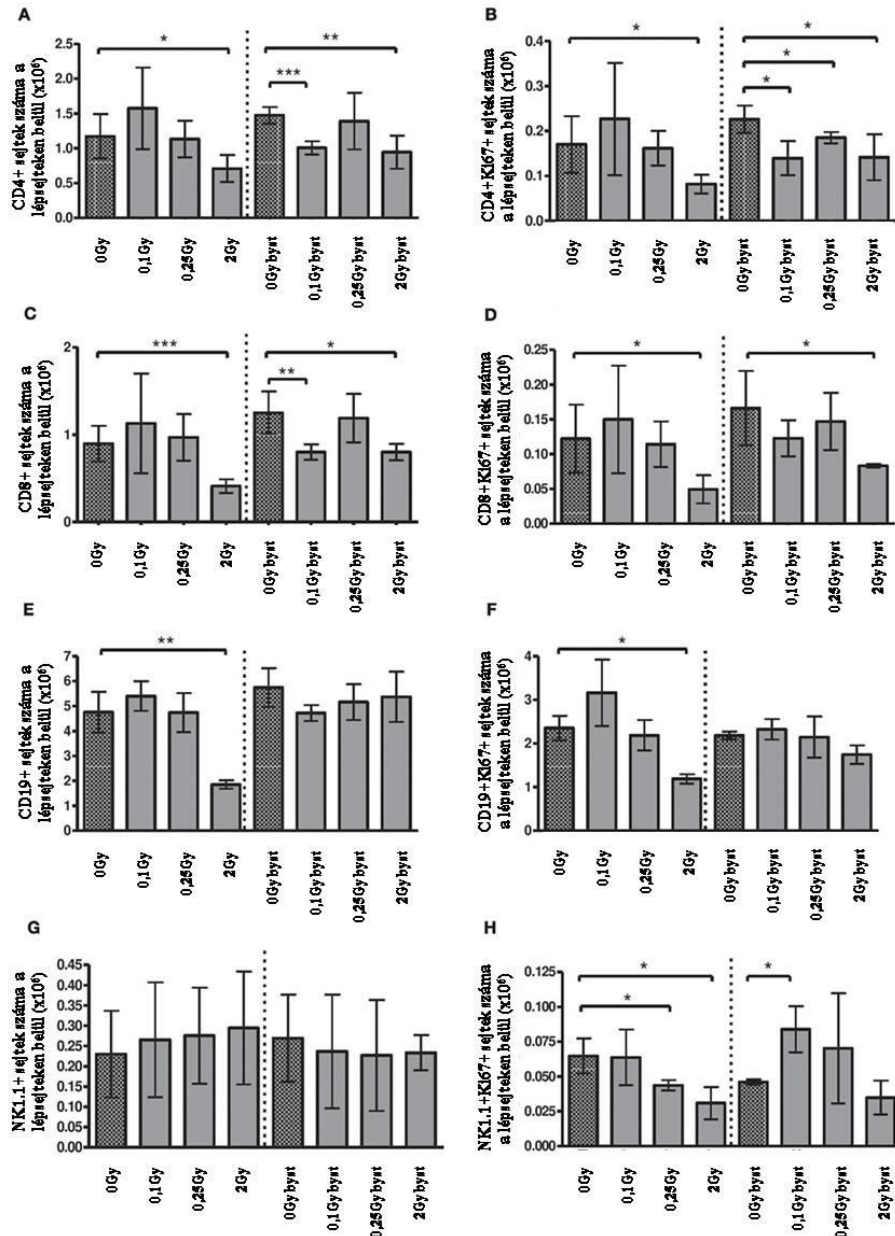
16. ábra. Csontvelői és plazma EV-k jellemzése. (A) Az EV-k méreteloszlása 0Gy, 0,1Gy és 2Gy besugárzás után, DLS módszerrel meghatározva. **(B)** Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel a csontvelőből izolált EV-kről (a kép a 0Gy kontroll állatból származó mintát mutatja). **(C)** Western blot analízis az EV-kről calnexin, TSG101 és CD9 fehérjék meghatározásával. Az első zsebbe a létra került, a másodikba a csontvelői sejt lizátuma, a harmadiktól hatodikig a csontvelői EV-k mintái, a hetedikről a kilencedikig a plazma EV-k mintái láthatók. A 0Gy* az a minta, amelyet nem tisztítottunk meg a PD-Spin oszlopon. Az ábrák egy-egy tipikus eredményt mutatnak.

A különböző dózissal besugarozott egerekből származó EV-k átmérője között szignifikáns eltérés nem mutatkozott, így elmondható, hogy a besugárzás nem befolyásolta az EV-k méretét. Elektronmikroszkópos képen az EV-kre jellemző kerek testcskéék látszanak, néhány az exoszómák jellegzetes „csésze” formáját mutatja (16.B ábra). Az EV-ket tovább jellemeztük Lötvald és mtsai. ajánlása alapján, EV-specifikus

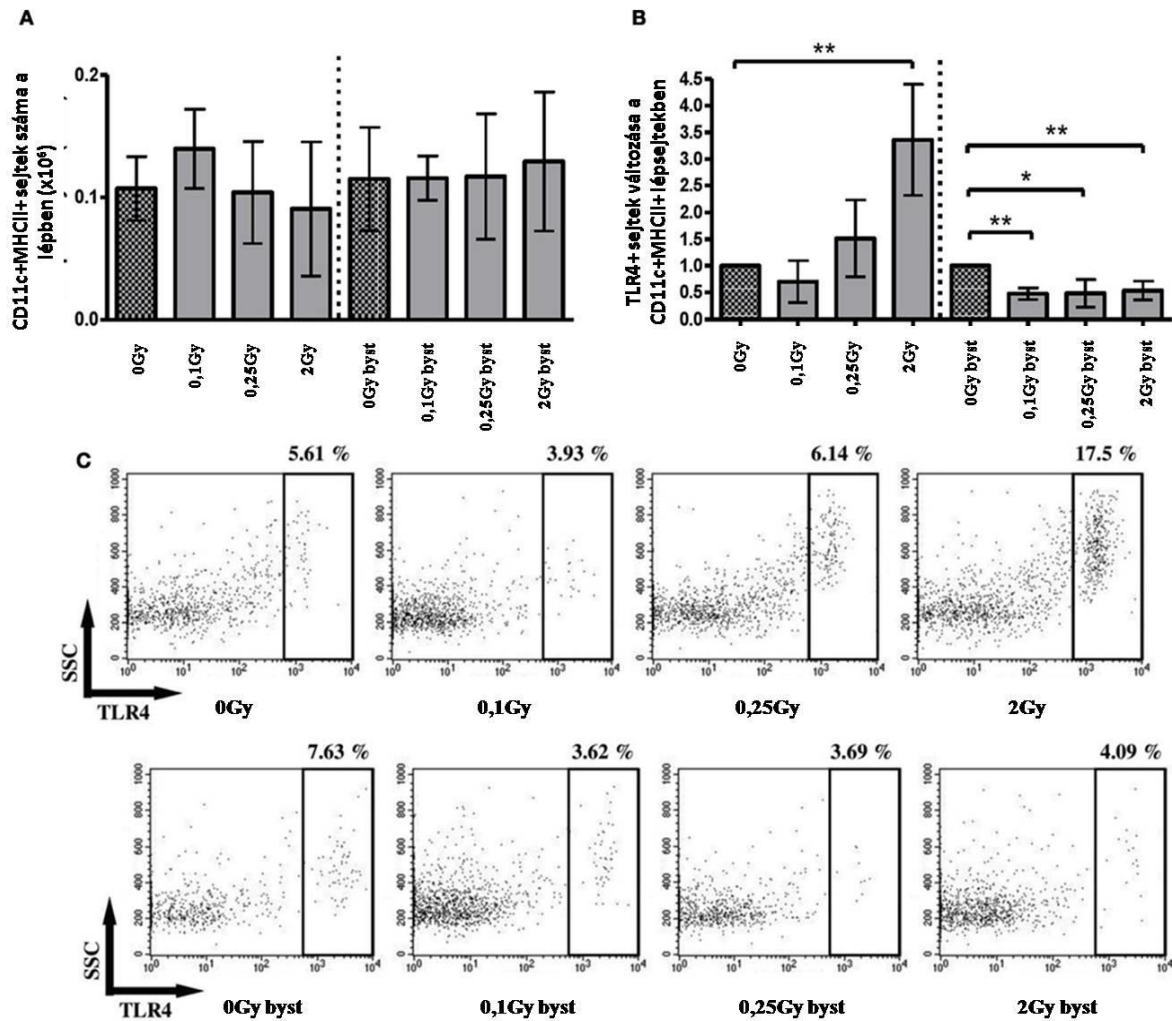
(legalább két ilyen fehérjével kell jellemezni) és EV-nemspecifikus (legalább egy) fehérjét azonosítottunk a mintákban Western Blot módszerrel (Lötvald és mtsai. 2014). A kontroll és besugározott egerekből származó EV-k is megfeleltek a kritériumoknak: a CD9 tetraspanint (Andreu és Yanez 2014) és a TSG101 fehérjét (Razi és Futter 2006) tartalmazták, az endoplazmás retikulumból származó calnexin fehérjét azonban nem. A jellemzést a csontvelői és a vérplazmából izolált EV-k esetén is elvégeztük, hasonló eredménnyel (16.C ábra).

5.7. EV transzfer megváltoztatta a lépsejt alpopulációk arányát

A limfociták (a lépsejtek 85 %-át kitevő populáció) számának és a limfocita alpopulációk (CD4+ és CD8+ T-sejtek, CD19+ B-sejtek, NK-sejtek és DC-k) osztódási képességét vizsgáltuk a közvetlen besugározott és EV recipiens állatokban. A korábbiakhoz hasonlóan kimutattuk, hogy az egyes limfocita alpopulációk jelentősen eltérnek sugárérzékenységükben. A kis dózisok hatására nem csökkent szignifikánsan, ugyanakkor a 2 Gy besugárzás csökkentett a CD4+, CD8+ T-sejtek és B-sejtek arányát a kontroll 60, 45 és 30 %-ára (17.A, C és E ábra). Az NK-sejtek számát nem csökkentette a közvetlen besugárzás (17.G ábra). Érdekes módon jelentős BE-t mértünk ki a CD4+ és CD8+ T-sejt populációkban, a B-sejtek és NK-sejtek esetén viszont ez a hatás nem volt kimutatható. A kontroll állatokban a sejtek proliferációs rátája 9,5, 9, 24 és 26 % volt a CD4+, CD8+ T-sejtek, B-sejtek és NK-sejtek esetén, ezt az arányt önmagában az EV transzfer (vagyis a 0 Gy állatokból izolált EV oltása) sem változtatta meg. Az osztódási arányban tapasztalható változások a besugárzás után az alpopulációk sugárérzékenységét tükrözték: 2 Gy besugárzás után minden vizsgált populációban csökkent. A bystander állatokban ez a változás hasonló volt, de sokkal kisebb mértékű a közvetlen besugárzáshoz képest (17.B, D, F és H ábra). A lép DC-eket CD11c- és MHCII-pozitivitásuk alapján azonosítottuk. A fent vizsgált limfocita alpopulációkkal ellentétben a DC-k száma nem csökkent sem a közvetlen besugárzásra, sem a bystander állatokban egyik dózis után sem (18.A ábra).



17. ábra. A besugározott és bystander egerek lépsejtjeinek fenotipizálása. A közvetlenül besugározott és a bystander állatokból származó lépsejteket fluoreszcensen jelölt ellenanyagokkal festettük és áramlási citométerrel értékeltük. A sejtszámok meghatározásánál 10 mg lépsejtet vonatkoztattunk. A CD4+ T-sejtek (A), az osztódó CD4+ T-sejtek (B), a CD8+ T-sejtek (C), az osztódó CD8+ T-sejtek (D), a B-sejtek (E), az osztódó B-sejtek (F), az NK sejtek (G) és az osztódó NK sejtek (H) számának változása. Az adatok 5 független kísérlet eredményeit mutatják be. A hibaszávok a szórást tüntetik fel. A szignifikancia érték $p < 0,05$ esetén *, $p < 0,001$ esetén **, $p < 0,0001$ esetén *** jelölést alkalmaztunk.



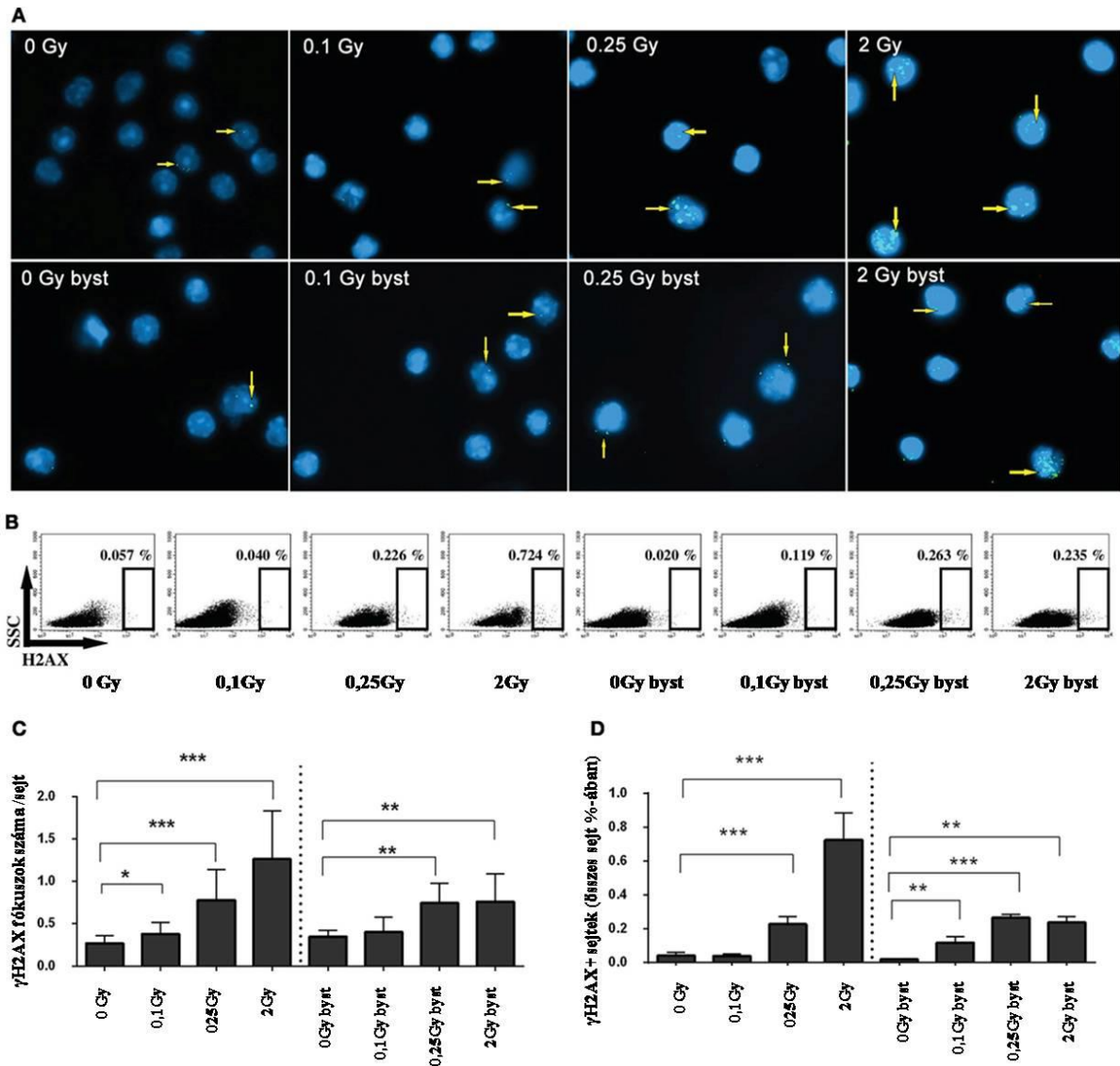
18. ábra. Lép DC sejtek fenotipizálása közvetlen besugározott és bystander állatokban. A közvetlenül besugározott és a bystander állatokból származó lépsejteket fluoreszcensen jelölt ellenanyagokkal festettük és áramlós citométerrel értékeltük. **(A)** CD11c+MHCII+ lép DC-k száma 10 mg lépben. **(B)** TLR4+ DC-k aránya az összes DC sejten belül. A besugározott és bystander mintákat a saját, megfelelő 0Gy kontrolljaikhoz viszonyítottuk. **(C)** TLR4+ DC-k arányának változása áramlós citométerrel elemezve, ahol a CD11c+MHCII+ DC-k a 100%. Az adatok 5 független kísérlet eredményeit mutatják be. A hibasávok a szórást tüntetik fel. A szignifikancia érték $p < 0,05$ esetén *, $p < 0,001$ esetén **, $p < 0,0001$ esetén *** jelölést alkalmaztunk.

A TLR4 kifejeződés a DC-k felszínén a sejtek LPS-re vagy LPS-hez hasonló veszélyszignálokra (pl. a HMGB1 proteinre) adott válaszát mutatja. Mivel a sugárzás-

okozta sejtkárosodás veszélyszignálok felszabadulásával jár, megvizsgáltuk a DC-ken megjelenő TLR4 molekulák változását közvetlen besugárzás után és bystander állatokban is. 2 Gy közvetlen besugárzás után szignifikánsan megnőtt a TLR4-kifejeződés a DC-ken. Meglepő módon a bystander állatokban egy teljesen más mintázatot mutatott a TLR4 expresszió az EV transzfer hatására, a kezelés hatására jelentős mértékben csökkent a TLR4+ DC-k aránya, és ez a csökkenés a dózissal nem volt összefüggésben (18.B és C ábra).

5.8. *In vivo EV transzfer hatására megnőtt a lépsejtben a γ H2AX fókuszok aránya*

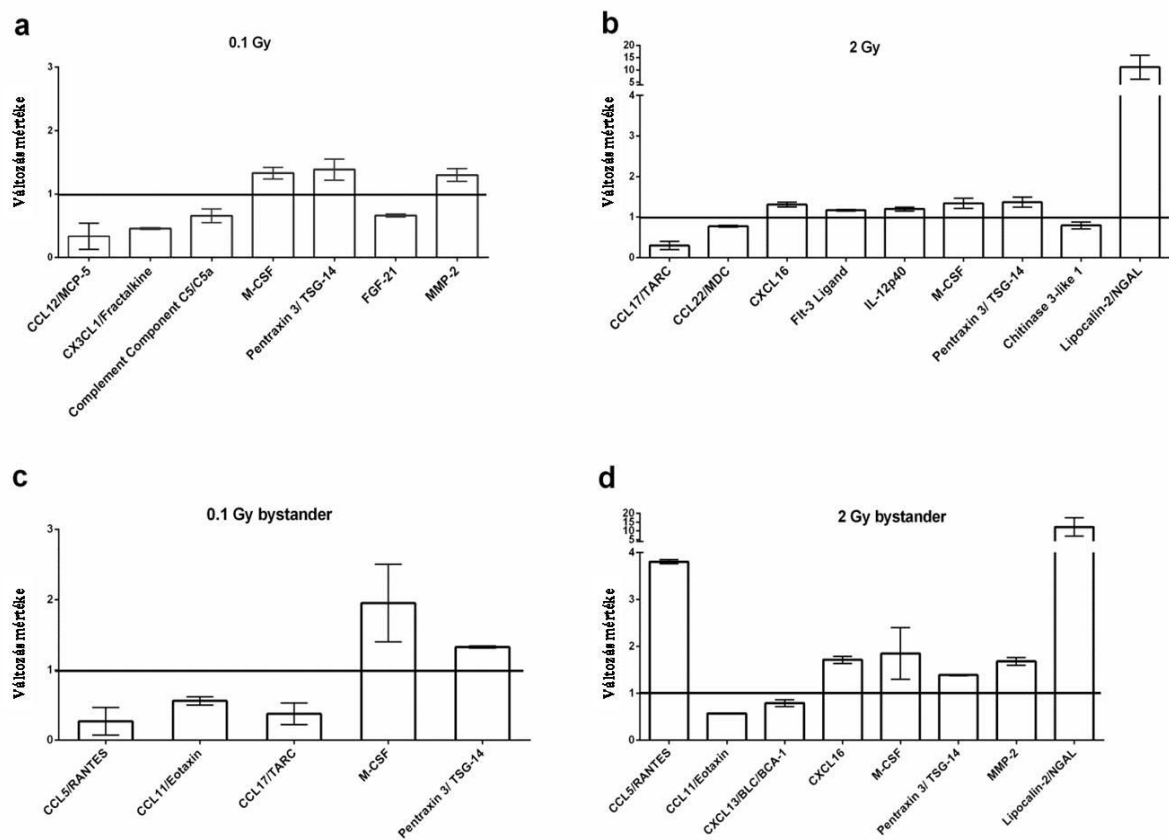
A DNS kettőslánc törések gyakoriságának változását a bystander egerek lépsejtjeiben γ H2AX assay segítségével mértük. Az assay-t fluoreszcens mikroszkóppal és áramlós citométerrel is értékeltük. Bár a fluoreszcens mikroszkóppal történő értékelés sokkal pontosabb és specifikusabb módszer (Rothkamm és Horn 2009), az áramlós citométer gyorsabb és nagyobb mennyiségű sejt elemzésére alkalmas, ami a statisztikai megbízhatóságot nagyban növeli (Durdik és mtsai. 2015). Ahogy vártuk, a közvetlenül besugarazott egerekben dózistól függően nőtt a γ H2AX fókuszok száma. A bystander állatokban, melyek a besugarazott állatokból kaptak EV-t, szintén megnőtt a fókuszok száma (19.A és C ábra) és a γ H2AX-pozitív sejtek aránya is (19.B ábra), jóllehet kisebb mértékben, mint a közvetlen besugarazott állatok lépsejtjeiben, és nem mutatott egyenes összefüggést a dózis nagyságával, de a károsodás mértéke a kis dózisu és a nagy dózisu bystander állatok között összevethető különbséget adott (19.D ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az EV-k képesek a DNS-károsodások javítására irányuló jelátviteli útvonalakat aktiválni a bystander állatok lépsejtjeiben, és ez a BE már kis dózisoknál is megfigyelhető.



19. ábra. DNS kettóstörések a közvetlen besugározott és bystander állatok lépében γ H2AX assay-vel mérve. (A) A nyilak a γ H2AX fókuszokat mutatják, a DAPI-val festett sejtmagok kékek, az Alexa 488-cal festett γ H2AX fókuszok zöldek. **(B)** A lépsejtek γ H2AX áramlások citometriás festése. A kapuk a γ H2AX+ sejteket mutatják az összes lépsejten belül. **(C)** A γ H2AX fókuszok átlagos száma fluoreszcens mikroszkóppal meghatározva. Az eredmény 7-10 független minta eredményét mutatják. **(D)** A γ H2AX fókuszok átlagos száma fluoreszcens mikroszkóppal meghatározva. Az ábrák 7-10 független minta eredményét mutatják. A hibasávok a szórást tüntetik fel. A szignifikancia érték $p < 0,05$ esetén *, $p < 0,001$ esetén **, $p < 0,0001$ esetén *** jelölést alkalmaztunk.

5.9. EV transzfer megváltoztatta a vérben lévő fehérjék arányát

A közvetlen besugárzás és az EV transzfer hatását követtük nyomon a perifériás vérben lévő proteinek szintjének változásában 24 órával a kezelés után. A protein assay, amit használtunk, 105 protein egyidejű kimutatására alkalmas, melyek között citokinek, kemokinek, növekedési faktorok találhatók meg. Ezek közül szignifikáns változást mindössze 7 és 9 fehérje esetén mértünk a közvetlen 0,1 Gy és 2 Gy besugárzás után, illetve 5 és 8 fehérje mennyisége változott meg a 0,1 Gy és 2 Gy bystander állatok vérplazmájában (20. ábra).



20. ábra. Besugárzás hatására megváltozott mennyiségű fehérjék a vérplazmában.

A vérplazmát teljes vérből centrifugálás után nyertük és proteome profiler ellenanyag array membránokon detektáltuk a fehérjék mennyiségének változását, amit kemolumineszcens módszerrel tettünk láthatóvá. Az ábrán (a és b) a kontrollhoz viszonyított, illetve (c és d) a 0 Gy EV-vel kezelt állatokhoz viszonyított változás mértéke szerepel, minden adat szignifikáns eltérést mutat, $p < 0,05$ érték mellett. Az ábrák3 független minta eredményét mutatják. A hibasávok a szórást tüntetik fel.

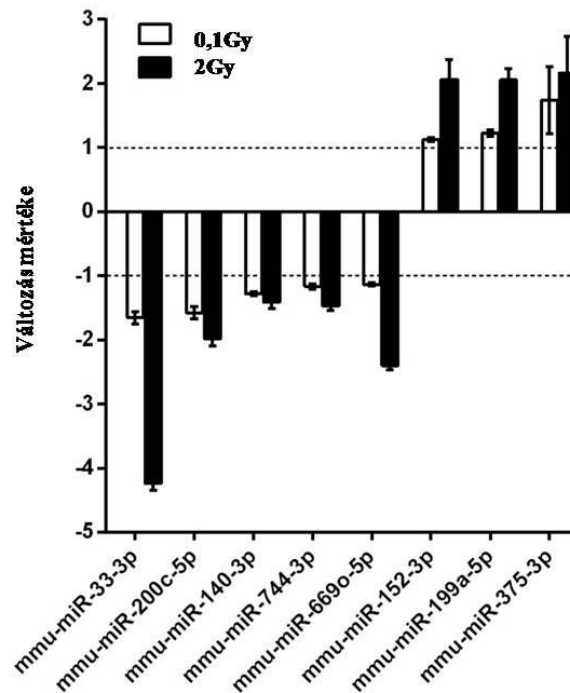
Működését tekintve a legtöbb megváltozott fehérje a kemokinek vagy kemokin ligandok közül került ki. A változás kismértékű, csak néhány fehérje esetén haladta meg a 2-szeres csökkenést vagy növekedést (ilyen pl. a lipokalin-2, a CCL5 vagy a CCL17). Két protein (pentraxin-3 és M-CSF) szintje mind a négy kezelt csoportban mutatott eltérést. 1,4-szeres növekedést mértünk a pentraxin-3 szintjében mind a közvetlen besugárzott mind a bystander állatokban, és az expresszió szintje nem függött a dózistól. Hasonlóképpen, az M-CSF mennyiségének növekedése 1,3-szoros volt, és nem változott a dózissal a közvetlen besugárzás hatására, ugyanakkor érdekes módon a bystander állatokban 1,9-szeres növekedést kaptunk. További fehérjék mennyiségében nem találtunk eltérést, ha a kezelt és kontroll csoportokat hasonlítottuk össze egymással. A közvetlen besugárzás és EV transzfer hatását tanulmányozva azonban találtunk összefüggést két fehérje esetében. A CXCL16 szintje mérsékelten változott (1,3-szoros és 1,7-szeres növekedés a 2 Gy közvetlen és 2 Gy bystander csoportban), valamint a lipokalin-2 jelentős növekedést (11-szeres és 12-szeres változás a 2 Gy közvetlen és 2 Gy bystander állatokban). Két fehérjét azonosítottunk, melyek mennyisége csak a bystander állatokban változott: a CCL11 kismértékben csökkent mind a 0,1 Gy mind a 2 Gy csoportban, a CCL5 jelentősen csökkent a 0,1 Gy csoportban és megnőtt a 2 Gy csoportban.

5.10. A besugárzás hatással van az EV-k miRNS tartalmára – a csontvelőben és a perifériás vérben is

5.10.1. Azonos miRNS-ek érintettek kis és nagy dóziséjú besugárzás után

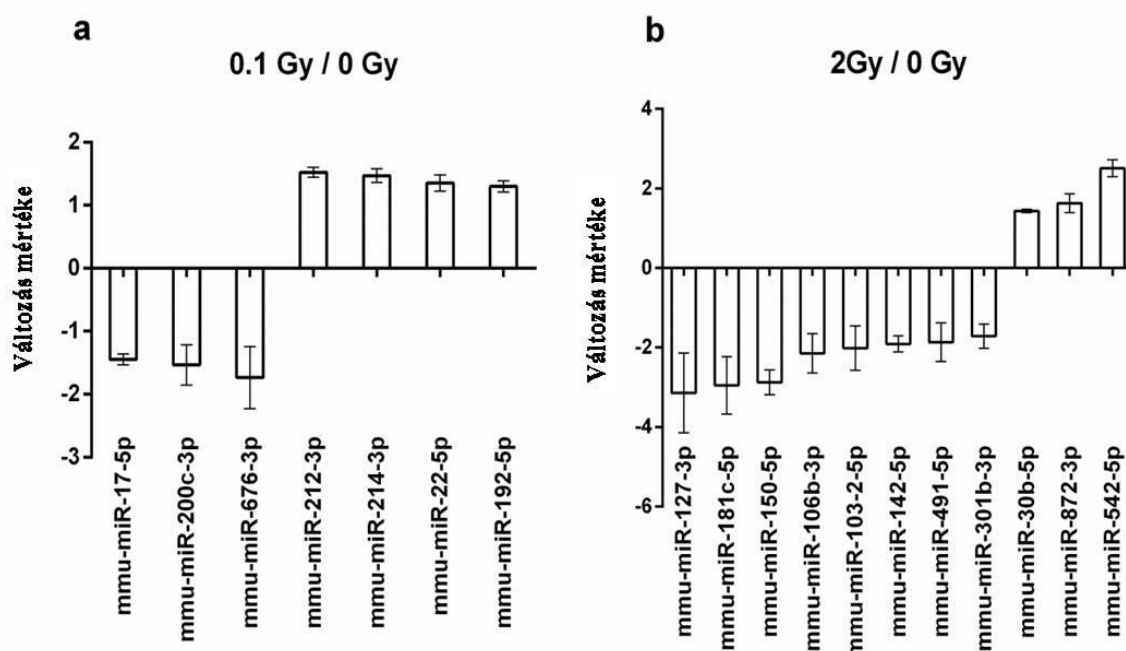
A kontroll egerek csontvelői EV-iből átlagosan 500 miRNS-t tudtunk azonosítani mintánként. Nem találtunk olyan miRNS-t, ami jellemzően a besugárzás hatására jelenik meg vagy tűnik el, de a miR-124, miR-346, miR-449c és miR-381 jelen volt, míg a miR-695 és miR-761 hiányzott a 2 Gy besugárzás után az EV-kben a kontrollhoz képest. A kontroll egerekből származó EV-k miRNS tartalmát összevetve a 0,1 Gy besugárzott egerekből származókkal, 20 miRNS esetén találtunk különbséget az expresszió mértékében, ha a 2 Gy mintával hasonlítottuk össze, akkor 90 miRNS-t eltérő expressziójú azonosítottunk. Ezen belül 8 miRNS-t találtunk, ami a 0,1 Gy és 2 Gy besugárzás után is változott: 5 miRNS (mmu-miR-33-3p, mmu-miR-200c-5p, mmu-miR-140-3p, mmu-miR-744-3p és mmu-miR-6690-5p) expressziós szintje csökkent, 3

miRNS (mmu-miR-152-3p, mmu-miR-199a-5p és mmu-miR-375-3p) expressziós szintje pedig nő. Ezen miRNS-ek szintjének változása dóziszfüggő, ahogy azt a 21. ábra mutatja.



21. ábra. Megváltozott expressziójú miRNS-ek a 0,1 Gy és a 2 Gy besugárzás után csontvelőből izolált EV-kben. A miRNS-ek meghatározása qPCR módszerrel történt. Az ábrán a kontrollhoz képest mért változás látható. Az ábrák 3 független minta eredményét mutatják. A hibasávok a szórást tüntetik fel. A feltüntetett adatok mind szignifikáns eltérést mutatnak a kontrollhoz képest, $p < 0,05$ érték mellett.

A plazmából izolált EV-k miRNS-tartalmából 174 miRNS-t azonosítottunk, ami minden mintában jelen volt. Ha ebből kiválasztottuk azokat, amelyek legalább 1,3-szoros változást mutattak, akkor 7 ill. 11 miRNS-t tudtunk azonosítani, ami a 0,1 Gy ill. a 2 Gy mintában a kontrolltól eltérő mértékben fejeződött ki (22.ábra).



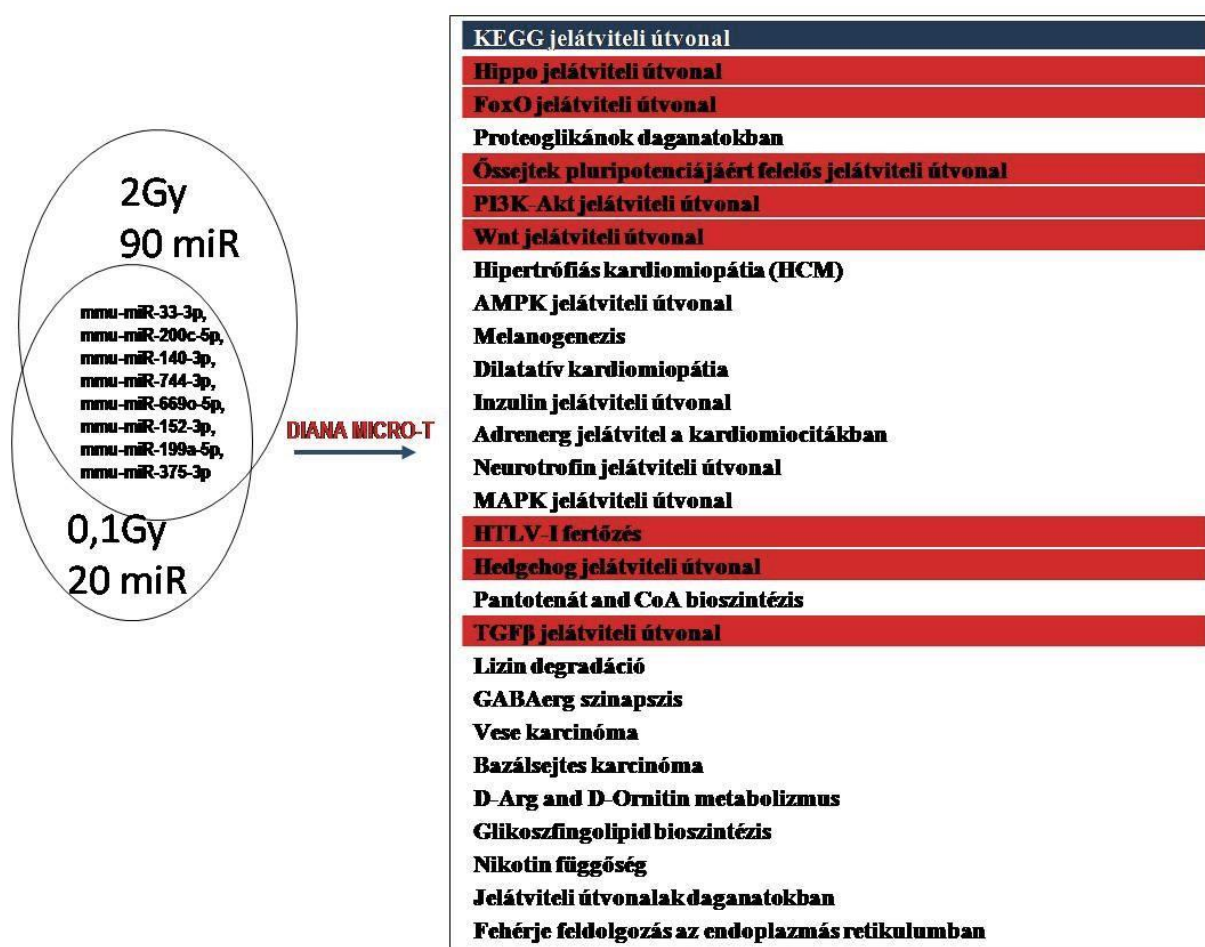
22. ábra. Megváltozott expressziójú miRNS-ek a 0,1 Gy (a) és a 2 Gy (b) besugárzás után vérplazmából izolált EV-kben. A miRNS-ek meghatározása qPCR módszerrel történt. Az ábrán a kontrollhoz képest mért változás látható. Az ábrák 3 független minta eredményét mutatják. A hibasávok a szórást tüntetik fel. A feltüntetett adatok mind szignifikáns eltérést mutatnak a kontrollhoz képest, $p < 0,05$ érték mellett.

5.10.2. Az EV transzfer okozta változások összefüggnek az általuk közvetített miRNS-ek jelátviteli célpontjaival

Ahhoz, hogy megértsük az EV-k által közvetített miRNS-ek szerepét a bystander állatokban tapasztalt fenotipikus és funkcionális változásokban, a DIANA miRPath szoftver segítségével elemeztük, hogy ezek a miRNS-ek milyen jelátviteli útvonalakban szerepelnek.

A 0,1 Gy besugárzás után nyert csontvelői EV-k megváltozott expressziójú 20 miRNS-ét vizsgálva 33 jelátviteli útvonalat találtunk a KEGG adatbázisban, amelyeket ezek a miRNS-ek befolyásolnak, a 2 Gy besugárzás esetén pedig szignifikánsan 90 ilyen útvonal volt azonosítható. Ezután azokat a miRNS-eket vizsgáltuk meg részletesebben, melyek a 0,1 Gy és 2 Gy besugárzás után is megváltozott mennyiségben voltak jelen az

EV-kben (ilyenből 8 volt) a KEGG és a GO adatbázisok összevetésével. A GO jelátviteli útvonal adatbázis géneket és géntermékeket tartalmaz olyan részletes biológiai adatokkal, mint a sejten belüli elhelyezkedés (Gene Ontology 2008), a KEGG adatbázis pedig ábrákat készít, melyeken a teljes jelátviteli útvonal szerepel kapcsolódási pontokkal és hálózatokkal (Kanehisa és mtsai. 2006) (23. ábra).



23. ábra. A megváltozott expressziójú miRNS-ek által szabályozott útvonalak elemzése. A 0,1 Gy és 2 Gy besugárzás után egyaránt változó miRNS-ek hatását az általuk szabályozott gének és útvonalak elemzésével írtuk le a DIANA miRPath szoftver segítségével. A miRNS-eket besugarozott és kontroll állatok csontvelői EV-iből izoláltuk.

A GO adatbázis alapján a 8 miRNS-sel összefüggésben talált útvonalak a sejtdifferenciációval és -kialakulással, metabolikus folyamatokkal, sejt növekedéssel, motilitással és sejthalállal kapcsolatosak voltak. Az is kiderült, hogy a jelátviteli útvonalakban szereplő miRNS-ek a sejtmagi kromoszómában, a citoplazmatikus stressz részecskéiben, valamint a citoplazmatikus membránhoz kötött vezikulákban helyezkednek el. Ez arra utal, hogy a miRNS-ek által befolyásolt jelátviteli útvonalak nem csak sejtmagi szintjén, hanem citoplazmatikus szinten is jelen vannak. A KEGG adatbázist használva 27 olyan útvonalat kaptunk, amely összefüggésben lehet a sugárzásra megváltozott expressziójú csontvelői EV miRNS-eivel. Legtöbbjük a sugárzás kiváltotta sejten belüli válasszal, a DNS-javító mechanizmusokkal [mint a Hippo, Hedgehog, Forkhead box O (Foxo), foszfo-inozítid-3-kináz (PI3K), TGF β jelátviteli útvonal)], valamint a hematopoetikus rendszerrel kapcsolatos [(mint az őssejtek pluripotenciáját szabályzó útvonal, Wnt útvonal, humán T-sejt limfotropikus vírus (HTLV) fertőzés] útvonal volt.

5.10.3. A kis és nagy dózisú besugárzás után nyert vérplazma EV-k miRNS-ei ugyanazokat a jelátviteli útvonalakat szabályozzák

A vérplazmából izolált EV-k miRNS tartalmának vizsgálatakor a KEGG adatbázis alapján 35 illetve 60 útvonalat találtunk a 0,1 Gy és 2 Gy besugárzás után. Jóllehet nem találtunk közös miRNS-t, amely mindkét dózisú besugárzás hatására megjelenik a plazma EV-kben, mégis 26 közös útvonalat tudtunk beazonosítani (6. táblázat), többek között az akut mieloid leukémia (AML), TCR jelátvitel, mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK), TGF β , FoxO, Hippo jelátviteli útvonalakat.

Az AML útvonal esetében a fő hálózati elemek olyan intracelluláris jelátviteli kaszkádok, mint a Sons of sevenless homológ 1 (Sos1), a Ras GTPázok különböző izoformái, Raf kinázok és PI3K család tagjai, illetve az AML útvonal fő transzkripciósfaktorai, mint a Runt-hoz kapcsolódó transzkripciósfaktor 1 (Runx1, amit AML 1 proteinnek is neveznek) és az NF κ B az aktivált B-sejteken. Az említett fehérjék kifejeződését a 0,1 Gy besugárzott egérben a miR-17-5p miRNS, a 2 Gy besugárzott egérben pedig a miR-301b-3p szabályozza. Fontos megjegyezni azonban, hogy az AML útvonal említett elemeit több esetben vagy csak a 0,1 Gy vagy csak a 2 Gy EV-kben megtalálható megváltozott expressziójú miRNS-ek szabályozzák.

6. táblázat. Plazma EV-kből izolált, besugárzás hatására megváltozott expressziójú miRNS-ek által befolyásolt **KEGG útvonalak**, az érintett gének száma az útvonalakon belül és a miRNS-ek száma, melyek ezeket szabályozzák.

KEGG útvonal	0,1 Gy		2 Gy	
	szabályozott gének száma	miRNS-ek száma	szabályozott gének száma	miRNS-ek száma
Akut mieloid leukémia	19	4	16	6
Adherens sejtkapcsolódás	25	4	26	7
Axon irányítás	38	3	36	6
Vastag- és végbéldaganat	27	6	24	7
Krónikus mieloid leukémia	27	4	20	6
Endometrium daganatok	21	3	18	6
Ösztrogén jelátviteli útvonal	27	4	31	10
FoxO jelátviteli útvonal	50	5	48	7
Glióma	24	4	23	7
Hepatitisz B	46	6	38	7
Hippo jelátviteli útvonal	43	5	42	7
Lizin lebomlás	17	3	11	8
MAPK jelátviteli útvonal	65	5	64	9
mTOR jelátviteli útvonal	20	4	22	5
Neurotrofin jelátviteli útvonal	35	5	36	9
Nem-kissejtes tüdőrák	23	3	20	5
Osteoklaszt differenciáció	37	5	34	8
Pankreász daganat	30	4	23	7
Jelátviteli útvonalak daganatokban	100	7	90	10
Prostata tumor	37	4	32	8
Proteoglikánok daganatokban	50	6	48	7
Vesekarcinóma	29	4	26	7
T-sejt receptor jelátviteli útvonal	29	5	31	7
TGFβ jelátviteli útvonal	21	3	22	6
Tiroid hormon jelátviteli útvonal	40	4	27	7
Vírus karcinogenezis	51	5	46	8

5.10.4. A csontvelői és plazma EV-k különböző miRNS-eket tartalmaznak, amik azonos jelátviteli útvonalakat szabályoznak

Következő lépésben a csontvelői és a perifériás vérben lévő EV-k miRNS-tartalmát vetettük össze. Érdekes módon a 0,1 Gy besugárzás után nem találtunk olyan miRNS-t, amely a csontvelői és plazma EV-kben is benne lenne. A 2 Gy besugárzás után 2 miRNS (miR-150-5p és miR-491-5p) volt, ami mind a csontvelői, mind a plazma EV-kben csökkent mértékű volt, jóllehet a csökkenés mértéke eltérőnek adódott (5,3-szoros és 3,3-szoros a miR-150-5p és miR-491-5p esetében a csontvelői EV-ben, illetve 2,3-szoros és 1,8-szoros ugyanazokra a miRNS-ekre a plazma EV-ben).

Noha az átfedő megváltozott expressziójú miRNS-ek száma alacsony, az általuk szabályozott jelátviteli útvonalak között sok megegyezőt találunk: 21 útvonalat a 0,1 Gy, és 38 útvonalat a 2 Gy besugárzás után (7. táblázat). Ráadásul, az útvonalak közül 19 mind a kis, mind a nagy dózisú besugárzás után megnőtt a csontvelői és plazma EV-kben, és 9 közülük immunrendszeri folyamatokkal vagy gyulladásal kapcsolatos.

7. táblázat. Megváltozott expressziójú csontvelői és plazma miRNS-ek által szabályozott immunválasszal és gyulladással kapcsolatos jelátviteli útvonalak.

Útvonalak	
0,1 Gy	2 Gy
TGFβ jelátviteli útvonal Akut mieloid leukémia Krónikus mieloid leukémia mTOR jelátviteli útvonal Adherens sejtkapcsolódás FoxO jelátviteli útvonal Hippo jelátviteli útvonal MAPK jelátviteli útvonal Proteoglikánok daganatokban	
Fokális adhézió	Aktin citoszkeleton szabályzása T-sejt receptor jelátviteli útvonal Foszfatidil-inozitol jelátviteli rendszer Fehérje feldolgozás az endoplazmás retikulumban Eritélsjekt bakterialis fertőzése Inozitol-foszfát anyagcsere Endocitózis Sejtciklus Gap junction TNF jelátvitel ErbB jelátvitel HIF-1 jelátvitel

6. Megbeszélés

A spontán apoptózis mértéke a lépsejt alpopulációk között nagy eltéréseket mutat. Míg a lépben található B sejtek spontán apoptózisa a legkisebb, addig a DC és Treg sejtek esetén ez a legnagyobb mértékű. A B sejtek kismértékű spontán sejthalálára lehetséges magyarázat, hogy ezen sejtek érése a csontvelőben következik be, a perifériára pedig már érett és hosszú életű sejtek kerülnek ki (Fulcher és Basten 1997). A lépben található DC sejtek CD11c+MHCII+ sejtek, ami arra utal, hogy ezek a sejtek érett, antigénbemutató képességgel rendelkező sejtek. Ezen sejtek viszonylag rövid életideje és gyors kicserélődése miatt feltételezhető, hogy a lépben nagy a spontán apoptózisa (Chen és mtsai. 2007, Kamath és mtsai. 2002). A Treg sejtek esetén is hasonló mechanizmus állhat az okozott apoptózis hátterében (Cao és mtsai. 2009, Toubi és mtsai. 2005).

A limfociták besugárzás hatására szinte kizárólag programozott sejthalállal halnak meg (Newton és Strasser 2000). A limfociták apoptózisa a besugárzást követően egy gyors folyamat (Cui és mtsai. 1999). Ezért egy korai időpontban (*in vivo* besugárzás után 4 órával) vizsgáltuk a limfociták apoptózist, amikor még a regeneráció vagy a sejtszámot kompenzáló egyéb mechanizmusok nagy valószínűséggel nem lépek életbe és így arra kaphattunk választ, hogy a besugárzás közvetlenül hogyan károsítja a sejteket, vagyis mennyire sugárérzékenyek a vizsgált sejtek. Korábbi tanulmányokhoz (Schmitz és mtsai. 2003, Harrington és mtsai. 1997, Hansson és mtsai. 1996) hasonlóan azt találtuk, hogy a B sejtek a legérzékenyebbek a sugárzásra, a T sejtek közepesen érzékenyek (CD8+ sejtek inkább, mint a CD4+ sejtek), valamint hogy az NK sejtek rezisztensebbek, mint a CD4+ sejtek. A Treg sejtek relatív kevésbé sugárérzékenyek, ezt Cao és mtsai. után mi is kimutattuk (Cao és mtsai. 2009). A DC-kről korábban leírták, hogy még nagy dózisú besugárzásra is relatív csökkent apoptózist mutatnak (Merrick és mtsai. 2005), azaz sugárrezisztens sejtpopuláció. A sugárérzékenységek tekintetében hasonló eredményekre jutottak Heylmann és mtsai. (Heylmann és mtsai. 2014).

Eredményeink alapján elmondható, hogy a kis dózisú besugárzás hatására a lépsejtek apoptózisa kismértékben csökkent a spontán apoptózishoz képest. Ez a megállapítás a korábban közölt adatokkal összhangban van (Shankar és Sainis 2005, Shaposhnikova és Korystov 1995). Legszembetűnőbbnek a DC sejtek esetében mutatkozott ez a csökkenés

a kis dózisú besugárzás hatására, és a besugárzásnak ez a hatása 24 órán keresztül fennállt. A limfociták apoptózisát a mikro környezetükben lévő citokinek jelenléte, illetve azok mennyisége befolyásolja. Kimutatták, hogy a megnövekedett IL-10, IL-14 és INF- γ szint elősegíti a DC sejtek apoptózisát (Chang és mtsai. 2007, Estaquier és Ameisen 1997). Mivel ezen citokinek génexpressziója lecsökkent kis dózisú besugárzás hatására az apoptózis meghatározásának időpillanatában, feltételezhető, hogy a citokin milliő változása okozhatja a csökkent mértékű sejthalált DC sejtek esetén.

A besugárzás után egy nappal tapasztalt eredményeink nem elsősorban a sugárzás-indukálta apoptózisról, mint inkább a szervezet kompenzatórikus folyamatairól tanúskodnak. Kis dózis hatására 1 nap után enyhe sejtszám-növekedés figyelhető meg a DC sejteken kívül minden sejtpopulációban. Ezek a változások egy, a vérképző szervek szintjén végbemenő átrendeződés eredményét tükrözik, mely a sugárzás-indukálta stresszre válaszul alakul ki. Az „újraszerveződés” a besugárzás után viszonylag gyorsan végbemegy, és a hematopoetikus sejtek „pótlásával” az immunválasz fenntartását szolgálja (Dainiak 2002). Nagy dózisú besugárzás hatására ezek a kompenzatórikus folyamatok szintén lejártsódnak, de a sugárzás nagyfokú citotoxikus hatása miatt a sejtszám dózis-függő csökkenése ezeket a mechanizmusokat elfedi.

Későbbi időpontokban mind a kis dózisú, mind a nagy dózisú besugárzás hatására csökken a sejtszám az összes vizsgált sejtpopulációban. A Treg sejtek, és kismértékben az NK sejtek és a CD4⁺ sejtek esetén találtunk relatív sejtszám növekedést a többi sejttípushoz képest 3 és 7 nappal a nagy dózisú besugárzás után. Ennek a megfigyelésnek az lehet az oka, hogy a többi sejttípus aránylag sugárérzékenyebb. Hasonló következtetésre jutottak Harrington és mtsai (Harrington és mtsai. 1997) CD4⁺ és NK sejtek esetén nagy dózisú besugárzás után. A sejtpopulációk számbeli regenerálódása, az eredeti sejtszám visszaállása még nagy dózisú besugárzás után 7 nappal is csekélynek mutatkozott. Kajioka és mtsai szintén kimutatták, hogy a sejtszám a minimumát nagy dózisú besugárzás után 4 nappal éri el, és a regeneráció lassú folyamat (Kajioka és mtsai. 2000). Láttuk, hogy a limfociták száma még 7 nap után sem tért vissza a besugárzás előtti szintre, viszont a B-sejtek kivételével minden sejttípusnál megindult a regenerálódás. Diab és mtsai. azt találták, hogy a T-sejtek száma nagy dózisú (6 Gy) besugárzás után 6 héttel állt vissza a normál szintre (Diab és mtsai. 2013).

A Treg sejtek sokkal rezisztensebbek a nagy dózisú besugárzásra, mint a nem Treg CD4⁺ sejtek, ennek pontos okát, és a relatív Treg feldúsulás mechanizmusát is vizsgáltuk. Más kutatócsoportokhoz hasonlóan arra a megállapításra juthatunk, hogy a Treg sejtek a CD4⁺ sejteken belül egy relatív sugárrezisztens csoportot alkotnak (Komatsu és Hori 2007, Qu és mtsai. 2010, Bayer és mtsai. 2009), míg mások ennek ellenkezőjét, sugárérzékeny fenotípust tulajdonítanak a Treg sejteknek (Wood és Sakaguchi 2003, Dunn és North 1991, Nisco és mtsai. 1995, Diab és mtsai. 2013). A Treg sejtek sugárrezisztenciája akkor kerül középpontba, ha figyelembe vesszük, hogy számos tanulmány bizonyítja, hogy a Treg sejtek infiltrálják a tumort (Lee és mtsai. 2012, Yamagami és mtsai. 2011, Winerdal és mtsai. 2011, Tao és mtsai. 2012, Knol és mtsai. 2012), sugárterápiát követően pedig a Treg sejtek képesek a daganatellenes immunválaszt visszafogni (Schuler és mtsai. 2013, Qinfeng és mtsai. 2013, Schaeue és mtsai. 2012). A jelenség okát akkor érthetjük meg, ha megvizsgáljuk, hogyan hat a sugárzás a Treg sejtek homeosztázisára és funkcióira. Három lehetséges mechanizmus magyarázhatja a Treg sejtek „bedúsulását”: a csökkent apoptotikus ráta, a megnövekedett proliferációs készség és az esetleges konverzió, mely során a CD4⁺Foxp3⁻ T-sejtek CD4⁺Foxp3⁺ Treg sejtekké alakulnak át.

A limfocita populációk funkcionális megváltozásának jellemző végpontja a citokinok termelésének növekedése vagy csökkenése. A kis és nagy dózisú sugárzás hatását a lépsejteken a citokinek széles paneljének génkifejeződésével mértük. Habár a sugárzás indukálta génexpressziós változás a besugárzást rövid időn belül követi, eredményeink azt mutatták, hogy egyes változások viszonylag tartósan fennállnak. Hasonló következtetésre jutottak korábbi kutatásokban is (Amundson és mtsai. 2000). Néhány citokin (IFN- γ , IL-2, IL-12 és GDF15) expressziója kis és nagy dózisok hatására eltérő módon fejeződik ki. Ez a jelenség a kis és nagy dózisok hatására kialakuló különböző irányú jelátviteli utak aktiválódásának következménye. Míg kis dózisú besugárzás után a sejtekben lezajló folyamatok a szabadgyök semlegesítésre, DNS sérülések helyreállításra, alkalmazkodási válasz kialakítására és sejtműködés helyreállítására irányulnak, addig a nagy dózisú besugárzás ezek mellett az apoptózis folyamatát indíthatja el. Csökkent Th1 és Th2 citokin génexpressziót (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-12, LT- β) tapasztaltunk kis dózisok után, különösen korai időpontokban, de nem tudtuk igazolni, hogy a kis dózisú besugárzás Th1 irányba billentené el az immunválasz

„mérlegét” (Hashimoto és mtsai. 1999, Song és mtsai. 2015, de Lastic és mtsai. 2016). Az IFN- γ termelésben sugárhatásra mutatott eltéréseket mások is leírták (Pandey és mtsai. 2005, Han és mtsai. 2002). A nagy dózisu besugárzás majdnem az összes vizsgált citokin génexpressziójában jelentős eltéréseket okozott, kivétel ez alól az IL-4 és a LT- β . IL-4 esetén szintén nem találtak változást Grindley és mtsai (Grindley és mtsai. 2006). A gyulladásos / gyulladásellenes szignálok változása az IL-6 és IL-10 termelésének mintázatában figyelhetők meg. Az IL-6 génexpresszió dózisfüggően nőtt 4 órával a besugárzás után, bizonyítékaul a gyulladásos szignálok megnövekedésének a szervezetben, de későbbi időpontokban visszatért a normál szintre. Az IL-10 termelés dózisfüggő csökkenést mutatott, de csak a besugárzás utáni később időpontban, ami egy késői válasz jelenlétére utal. A hematopoetikus növekedési faktorok (GM-CSF, IL-5) erősen megnövekedtek a besugárzás után vizsgált összes időpontban, noha a kis dózisok főképp az IL-5 expressziójának növekedését okozták. Ez a megfigyelés a szervezet nagyon korai és tartósan fennmaradó regenerálódási folyamatát mutatja molekuláris szinten, mind a kis, mind a nagy dózisu besugárzás után. Az IL-5 megnövekedésének egy lehetséges mechanizmusa, hogy a gén promóter régiójában sugár-válasz elemek vannak (Lu-Hesselmann és mtsai. 1997). Sugárzás-indukálta IL-5 túltermelődést más kísérletekben (Han és mtsai. 2002) és epidemiológiai tanulmányokban is leírtak (Dainiak 2002). A GDF15 a TGF β család tagja, mely a makrofág aktivációt képes gátolni és a karcinogenezisben játszik szerepet (Bootcov és mtsai. 1997). A gén termelődésének biológiai jelentősége a legújabb vizsgálatok tapasztalatai alapján a sugárérzékenység szabályozásában van (Schiegnitz és mtsai. 2016, Li és mtsai. 2017), bár a pontos mechanizmus még nem ismert. Kutatócsoportunk korábban a GDF15 gént egy korai sugár-válasz génként írta le humán fibroblaszt sejtvonalon (Kis és mtsai. 2006, Sándor és mtsai. 2015). Lépsejteken a GDF15 expressziója 2 Gy besugárzás után rövid idővel megemelkedett és 3 nappal a besugárzás után is emelkedett maradt. Kis dózisu besugárzás után 1 nappal tapasztaltunk csökkenést.

Eredményeink alapján a Treg sejtek apoptotikus rátája kisebb, mint a CD4+Foxp3- T-sejteké (3,44-szeres, illetve 5,37-szeres növekedés a kontrolhoz képest 2 Gy besugárzás után 1 nappal), és gyorsabban normalizálódik is. Eredményeinkhez hasonlóan Qu és mtsai. is több elpusztult sejtet mutattak ki az effektor T-sejtek között, mint a Treg sejtek között *in vitro* nagy dózisu besugárzás után, ami a Treg sejtekben nagyobb mértékben

termelődő anti-apoptotikus Bcl2 fehérjével is kapcsolatba hozható volt (Qu és mtsai. 2010). Ezzel ellentétes eredményt kaptak viszont Cao és mtsai., akik *in vitro* nagy dózisú besugárzás után magasabb apoptotikus rátát mértek Treg sejtekben, mint effektor T-sejtekben (Cao és mtsai. 2011). *In vivo* besugárzás hatására azonban egyértelműnek tűnik, hogy a Treg sejtek sokkal kevésbé vannak kitéve a sugárzás-indukálta apoptózisnak, mint az effektor T-sejtek. Ezt erősíti Komatsu és Hori kísérlete is, ahol szelektív sugárrezisztenciát és a Treg sejtek túlélését írták le letálisan besugározott egerekben, noha a Treg sejtek apoptotikus rátáját nem vizsgálták (Komatsu és Hori 2007).

A CD4⁺ effektor sejtek és a Treg sejtek spontán apoptotikus frekvenciája eredményeink alapján különbözik. A Treg sejtek spontán apoptózisa nagyobb, mint a CD4⁺Foxp3⁻ sejteké, és a kisdózisú besugárzás utáni korai időpontban (4 órával) is eltérést mutat. Mohamood és mtsai. egérben, és Fritzsching és mtsai. emberben azt találták, hogy a Treg sejtek sokkal érzékenyebbek a Fas-mediált apoptózisra, mint a CD4⁺Foxp3⁻ T-sejtek (Mohamood és mtsai. 2006, Fritzsching és mtsai. 2005), a sugárzás pedig megnöveli a Fas kifejeződését a CD4⁺ sejteken (Fujimori és mtsai. 2000). Egy lehetséges magyarázata a Treg és a CD4⁺Foxp3⁻ sejtek apoptózisban mutatott különbségének tehát az, hogy a kétféle sejt felszínén különböző mértékben nő meg a Fas receptor mennyisége besugárzás hatására.

Leírtuk, hogy besugárzás után megnő a túlélő CD4⁺ sejtek proliferációja, de az effektor T-sejtek és a Treg sejtek proliferációs dinamikája eltérő. A kontroll, sugárzást nem ért CD4⁺ sejtek körülbelül 25%-a Foxp3⁺, ám a 2 Gy besugárzást követő 11. napra ez az arány mintegy 40%-ra nő. Ez azt mutatja, hogy a besugárzást követően mind az életben maradt CD4⁺Foxp3⁻ effektor T-sejtek, mind pedig a CD4⁺Foxp3⁺ Treg sejtek proliferációs potenciálja megmarad, és azt is bizonyítottuk, hogy a homeosztázis állapot elérésére törekednek a sugárzás okozta limfopénias környezetben. Látható viszont, hogy a Treg sejtek proliferációja sokkal hatékonyabb, mint az effektor T-sejteké.

A CD4⁺ sejtek homeosztatikus osztódására, és a CD4⁺ „pool” helyreállítására lehetséges mód a CD4⁺Foxp3⁻ sejtek konverziója CD4⁺Foxp3⁺ sejtekké, ahogy korábbi közleményekben szerepel (Curotto de Lafaille és mtsai. 2004, Haribhai és mtsai. 2009). Munkánk során nem kaptunk egyértelmű bizonyítékot rá, hogy

konverzióval alakulnának át Foxp3⁻ sejtek Foxp3⁺ sejtekké. Ez Suffner és mtsai. eredményeivel összhangban van, akik azt találták, hogy az immundepléció utáni regeneráció a megnövekedett proliferációs készség, és nem a konvertálódó sejtek következménye (Suffner és mtsai. 2010). A legvalószínűbb mechanizmus tehát, amely a Treg sejtek szelektív „bedúsulásáért” felelős, az alacsonyabb apoptotikus ráta és a megnövekedett proliferációs index az effektor T-sejtekéhez képest.

A Treg sejtek számbeli növekedés nem jelent egyértelműen immunszuppressziót, a sejtek funkcionalitásának épsége is feltétele a hatékony gátlásnak. A Treg sejtek funkcionális épségét azok gátló markereinek kifejeztődése és citokin expressziójának meghatározásával követtük nyomon.

Korábban feltételezték, hogy a Treg sejtek felszínén kifejeződő GARP fehérjével jellemezhető a sejt aktivációs állapota (Tran és mtsai. 2009, Wang és mtsai. 2009). A mi eredményeink ennek ellenére azt mutatják, hogy nemcsak az aktivált, hanem a nyugalomban lévő Treg sejtek 65%-án is kifejeződik a GARP marker. Hasonló megfigyelést tettek Oida és Weiner, akik megállapították, hogy egér nyugvó állapotban lévő Treg sejtjein is jelen van a GARP fehérje (Oida és Weiner 2010). A CTLA-4 sejtfelszíni fehérje kapcsán is feltételezték, hogy csak aktivált Treg sejteken található meg, és a szupresszív fenotípus kifejeződéséért felelős (Wing és mtsai. 2006, Wing és mtsai. 2008, Read és mtsai. 2000). A CTLA-4 molekula Treg sejt funkciójának kifejezésében játszott fontosságát alátámasztják azok a munkák is, melyekben a CTLA-4 szelektív blokkja a Treg sejtek eliminációját okozták a szervezetben (Sundstedt és mtsai. 2012, Curran és mtsai. 2011). Kimutattuk, hogy 2 Gy besugárzás hatására a Treg sejtek felszínén a CTLA-4 mérsékelten ugyan, de megemelkedett, mely bizonyíthatja a CTLA-4 blokk hatékonyságát a tumorelles immunterápiák során.

A Treg-ek IL-10 és a TGFβ citokin termelését vizsgáltuk, melyek a sejtek szupresszív fenotípusának kifejeződéséért felelősek. Habár a vizsgált citokineket jellemzően érett CD4⁺Foxp3⁺ Treg sejtek termelik, más CD4⁺ alpopulációk is kifejezhetik más-más mértékben (Amundson és mtsai. 2000, Askenasy és mtsai. 2008). Cao és mtsai. leírták, hogy nagy dózisú (30 Gy) *in vitro* besugárzást követően a Treg sejtekben csökkent a membránhoz kötött TGFβ kifejeződés, ez pedig közvetlenül felelős volt a Treg sejtek gátló funkciójának elvesztéséért (Cao és mtsai. 2011). Billiard és mtsai. hasonló

megfigyelést tettek, mikor 10 Gy besugárzás után vizsgálták egerek vékonybelében található sejteket (Billiard és mtsai. 2011). A mi eredményeink azt mutatják, hogy a TGF β termelés a CD4+Foxp3- T-sejtekben emelkedett meg enyhén, míg az IL-10 génkifejeződése mind a CD4+Foxp3- T-sejtekben, mind a CD4+Foxp+ Treg sejtekben jelentősen megnőtt. A TGF β termelésében tapasztalt ellentmondás magyarázata lehet, hogy a fenti szerzők munkáikban sokkal nagyobb dózisu besugárzást alkalmaztak, mint 2 Gy. Az IL-10 expresszió tekintetében a mi eredményeink összhangban vannak Billiard és mtsai. eredményével, Cao és mtsai. azonban azt találták, hogy a TGF β termelés gátlása mellett az IL-10 szekréció is csökkent perifériás humán vérből vizsgált Treg sejtekben.

Bár a citokintermelésben és a sejtfelszíni markerek kifejezésében tapasztaltakból a funkcionális karakterek megváltozására következtethetünk, mégis az *in vitro* szupressziós kísérletek szolgáltathatnak elegendő bizonyítékot arra, hogyan változtatja meg az ionizáló sugárzás az immunrendszer sejtjeinek funkcionális integritását. A Treg sejtek szupressziós képességének változását egyszeri terápiás dózisu (2 Gy) besugárzás hatására kevesen vizsgálták. Mind Cao és mtsai., mind Qu és mtsai. azt írták le, hogy a Treg sejtek effektor T-sejt gátló képessége *in vitro* besugárzás hatására csak kis mértékben sérül (Cao és mtsai. 2009, Qu és mtsai. 2010). Az effektor T-sejtek proliferációjában 20% alatti változást tapasztaltak még 5 Gy dózisu besugárzás hatására is. Alacsonyabb dózisok (mint az általunk alkalmazott 2 Gy is) nem (Qu és mtsai. 2010), vagy csak igen kismértékű (Cao és mtsai. 2009) változást okoztak. Ezzel szemben a mi eredményeink azt mutatják, hogy a Treg sejtek T-sejt szupressziós kapacitása 2,5-szeres csökkenést szenved. Az ellentmondás oka az eltérő kísérleti beállítás lehet. Cao és mtsai. *in vitro* tenyésztett és *in vitro* besugarazott Treg sejteket használtak a kísérleteikhez, mi pedig *in vivo* besugarazott állatokból izoláltuk a Treg sejteket. Emellett ki kell emelni annak fontosságát is, hogy melyik időpontban használjuk a Treg sejteket a szupressziós kapacitás vizsgálatához. A mi kísérleteinkhez a sejteket a besugárzást követő harmadik napon izoláltuk az állatokból, mert a kvantitatív paraméterekből azt tapasztaltuk, hogy ekkor a legkifejezettebb a sejtek sugárkárosodása. Qu és mtsai. a szupressziós assay-t a besugárzás után 2 héttel végezték el, és nagyon valószínű, hogy ekkor már a Treg sejtek funkcionális regenerációja jóformán megtörtént. Az eredményeink Billiard és mtsai. hasonló adataival

összhangban állnak; a Treg sejtek szupresszív kapacitásának erős csökkenését tapasztalták *in vivo* 10 Gy dózissal történt besugárzás után egérben (Billiard és mtsai. 2011). Hozzá kell tenni, hogy bár az eredmények közlésekor az irodalomban elfogadottak alapján *in vitro* körülmények között vizsgáltuk a Treg sejtek T-sejt gátló képességét, mára már nyilvánvalónak tűnik, hogy a gátlás létrejöttéért nem csak a két sejt interakciója, hanem több más faktor (más sejtek, pl. DC-k, illetve a szöveti környezetben jelen lévő citokinek jelenléte vagy hiánya) együttes hatása felelős (Gupta és mtsai. 2012). Ezért ebben a kísérleti felállásban végzett kísérletek eredményeiből további vizsgálatok nélkül következtetések csak kellő körültekintés mellett vonhatók le.

A DC-k funkcionális markereinek, illetve antigénfelvevő és antigénbemutató képességének változását vizsgáltuk besugárzás után. Korábbi leírások alapján a kis dózisú besugárzás nem változtatta meg sem az éretlen, sem az érett DC-k sejtfelszínén kifejeződő markereit, és a funkcionális tesztekben sem módosult a T-sejt aktiváló képességük (Jahns és mtsai. 2011). Ezzel némileg ellentmondanak a mi eredményeink, a CD80 aktivációs, és a DEC205 antigénfelvétellel kapcsolatba hozható marker szintje is megváltozott 0,25 Gy dózisú besugárzás után, előbbi megnőtt, utóbbi lecsökkentés funkcionális tesztekben is azt találtuk, hogy a 0,1 Gy besugárzás csökkenti a DC-k antigénfelvevő képességét, illetve 0,25 Gy besugárzás csökkenti a DC-k antigénbemutató képességét. A nagy dózisok esetében (2-30 Gy) Merrick és mtsai. azt találták, hogy humán perifériás mononukleáris vérsejtekből indukált DC-k felszíni markerei nem változnak (Merrick és mtsai. 2005). Állatkísérletes modellben, ahol csontvelői előalakokból indukált DC-k sejtfelszíni markereinek változását követték nyomon 2 Gy és 10 Gy besugárzás után, azt találták, hogy egyik dózis sem változtatta meg a sejtek felszíni markereinek kifejeződését (Liao és mtsai. 2004). A mi eredményeink nem támasztják alá ezeket a megfigyeléseket, mivel a kostimulációban szerepet játszó fehérjék sejtfelszíni expressziója 2 Gy besugárzás hatására megemelkedtek. A végpontokban kapott eltérő eredményeket magyarázhatja egyrészt az a tény, hogy Merrick és mtsai., valamint Liao és mtsai. kísérleteik során *in vitro* besugárzást alkalmaztak, másrészt az, hogy más DC populációt vizsgáltak: vérben illetve csontvelőben lévő monocitákból differenciáltatták a DC-keket, szemben a mi kísérleteinkkel, ahol érett lép DC-keket vizsgáltunk. Egy újabb kísérleti felállásban Diab és mtsai. egérmodellen vizsgálta a nagy dózisú (6 Gy) besugárzás hatását a DC-k

aktivációs állapotára. Megállapították, hogy a sejtek besugárzás után 1 nappal drámai fenotípusos változáson mentek át, MHCII molekuláik és ko-stimulációs fehérjéik kifejeződése jelentősen megnőtt. Érdekes az a megfigyelésük is, hogy ez az aktivált DC populáció a besugárzás után 5 nappal már nem kimutatható a perifériás limfoid szervekben (Diab és mtsai. 2013). Eredményeink alapján 2 Gy besugárzás hatására a DC populációban a TLR-4 fehérjét kifejező sejtek aránya is megnőtt. Ez összhangban van azokkal a korábbi megfigyelésekkel, melyek a nagy dózisú besugárzás hatására felszabaduló „veszély-szignálok” jelenlétét a DC-k TLR-4 receptoron keresztüli aktiválódásával hozták összefüggésbe (Kono és mtsai. 2013, Pasi és mtsai. 2014, Lumniczky és Sáfrány 2015, Werthmoller és mtsai. 2016). A „veszély-szignálok” megjelenésével összefüggésben az MHC molekulák kifejeződése is megnő besugárzás hatására, ezt humán vizsgálatok is alátámasztják (Gallegos és mtsai. 2016). Kimutattuk, hogy a 2 Gy dózisú besugárzás a DC populációban nem változtatta meg az antigénfelvevő képességet, és az antigénbemutatásra sem volt hatással. Hasonlóan, Merrick és mtsai. is azt találták, hogy humán vérből *ex vivo* indukált DC-k antigénfelvevő képességét nem változtatta meg a nagy dózisú (30 Gy) besugárzás (Merrick és mtsai. 2005). Ugyanakkor egy másik tanulmányban csontvelői eredetű, *in vitro* érlelt DC-kről állapították meg, hogy a besugárzás károsítja a sejtek antigénbemutató képességét (Liao és mtsai. 2004).

Arról, hogy az immunválaszban mely érettségi stádiumban lévő DC-k játsszák a fő szerepet, látszólag ellentmondó adatok jelentek meg az irodalomban. Son és mtsai. szerint az éretlen, antigénfelvevő kapacitással rendelkező DC-knek kiemelt szerepük van daganatos környezetben (Son és mtsai. 2014). Az általunk bemutatott, besugárzás hatására megnövekedett DEC205 expresszió ez esetben elősegítheti a daganattal szembeni sejtes védekezést. Másrészt, C57Bl/6 egerekben azt találták, hogy nagy dózisú (>15 Gy) besugárzás után a tumort érett fenotípusú (kostimulációs molekulákat nagymértékben kifejező) DC-k infiltrálják (Moravan és mtsai. 2011). Ennek megfelelnek kísérleti eredményeink, melyek alapján a sugárzás hatására megnövekedett kostimulációs molekulák megjelenéséből a DC-k T-sejt proliferációs képességeinek növekedésére tudunk következtetni. A látszólagos ellentmondás hátterében álló két nézőpontot az hozza közelebb egymáshoz, ha nem „éretlen DC” vagy „érett DC” kategóriákban gondolkodunk, hanem a DC-ket markereik kifejeződése alapján

jellemezzük. Az antigénprezentációt több tényező befolyásolja, amelyben amellet, hogy a kostimulációs molekulák megjelenése elfogadottan szükséges a hatékony immunválasz kiváltásához, a funkcionálisan érett DC-k citokin termelése is ugyanolyan fontos (Dudek és mtsai. 2013).

A BE-nek a sugárvédelem szempontjából kiemelt szerepe van, mert azt bizonyítja, hogy a sugárzás hatása nem kizárólag a közvetlen sugártalálalatot ért sejten mérhető, így a sugárzás-indukálta egészségkárosodások esélyét növeli (Morgan és Sowa 2007) és ez alátámasztja annak szükségességét, hogy a jelenségre magyarázatot találjunk.

Korábbi munkákból arra következtethetünk, hogy a sugártalálalatot sejtek által kibocsátott EV-k közvetíthetik a BE-t. Al-Mayah és mtsai. MCF-7 emlőtumor sejtvonalon kimutatták, hogy azokban a sejtek, amiket a besugarazott sejtek tápfolyadékából izolált exoszómákkal kezeltek, megnőtt a genomi károsodások szintje (Al-Mayah és mtsai. 2012), és ez a hatás több mint 20 generáción keresztül kimutatható volt a sejteken (Al-Mayah és mtsai. 2015). Mutschelknaus és mtsai. azt bizonyították fej-nyak tumoros sejtvonalon, hogy a besugarazott sejtekből származó exoszómák a recipiens sejtek sejtosztódását és túlélését (Mutschelknaus és mtsai. 2016). Fontos kiemelni azonban, hogy ezek az eredmények *in vitro* körülmények között születtek.

Munkánk során egy *in vivo* modellt dolgoztunk ki annak tanulmányozására, hogy az EV-k hogy közvetítik a sugárzás-indukálta BE-t, melyben a besugarazott egerek csontvelői sejtjeiből származó EV-ket oltottuk kezeletlen egerekbe és vizsgáltuk a recipiens egerek csontvelői sejtjeiben, lépsejtjeiben és vérplazma fehérjéiben kimutatható változásokat. A csontvelői sejtekre és lépsejtjeire azért esett a választásunk, mert mindkét szövet rendkívül sugárérzékeny, amelyben a BE nagyban befolyásolja a sugárhatás mértékét (Illytskyy és mtsai. 2009, Rastogi és mtsai. 2012). Eddig több kutatócsoport leírta, hogy a csontvelő szövet megfelelő környezet annak vizsgálatára, hogy az MV-k közvetítette jelek hogy változtatják meg a sejtek fenotípusát (Aliotta és mtsai. 2007, Lee és mtsai. 2012, Renzulli és mtsai. 2010). Az EV-k vizsgálata kimutatta, hogy átlagosan 200 nm átmérőjűek, TSG101 és CD9 fehérjét tartalmaznak, hiányzik belőlük az endoszómális eredetre utaló jel, ami arra utal, hogy exoszómák és nagyrészt MV-k alkotják az izolátumot (Andreu és Yanez 2014, Bobrie és mtsai. 2012). Míg korábban a sejtek közötti kommunikációban az egyetlen lényeges szereplőnek az

exoszómákat tartották, addig az utóbbi évek publikációi bizonyították az MV-k szerepét ebben a folyamatban. Az MV-k az exoszómákhoz hasonlóan tartalmaz mRNS-eket, miRNS-eket és proteineket (Lee és mtsai. 2016). Legutóbb Wen és mtsai. írták le, hogy az exoszómák és MV-k együttes alkalmazása nagyobb hatékonysággal közvetíti a biológiai hatásokat az egyik sejtről a másikra, mint az egyes frakciók külön-külön (Wen és mtsai. 2016).

Munkánk során először azt vizsgáltuk meg, hogy az EV-k tudják-e szisztémásan közvetíteni a sugárzás okozta DNS- és kromoszómális károsodásokat a besugárzást nem kapott lépsejteknek. A sugárzás okozta DNS-károsodások legjellemzőbb formája a DNS kettőslánc törése, ami, ha a sejt nem tudja rövid időn belül kijavítani, akkor sejthalálhoz vagy GI-hoz vezethet (Koster és mtsai. 2007). A károsodás specifikus markerének a H2AX hiszton foszforilációját tartják, mely a kettőslánc-törés közelében jelenik meg (Pilch és mtsai. 2003). A foszforilált H2AX molekula a DNS-javító mechanizmus során keletkezik és a törés közelében mint meghatározott fókuszpont észlelhető. A módszer érzékenységét még egészen kis dózisok esetén is igazolták (Osipov és mtsai. 2015, Rothkamm és Lobrich 2003, Rube és mtsai. 2008), és mivel az assay dózisfüggő, dózisbecslésre is használható. A fentiekkel megegyezően a közvetlen besugározott állatokban mi is kimértük a γ H2AX fókuszok számának dózisfüggő növekedését. A γ H2AX fókuszok mérésével más kísérletekben is jellemezték a sugárzás indukálta BE-t - *in vitro* (Burdak-Rothkamm és mtsai. 2007, Sokolov és mtsai. 2005) és *in vivo* (Koturbash és mtsai. 2006). Sokolov és mtsai. bystander humán fibroblaszt kultúrákban kimutatták, hogy a γ H2AX fókuszok olyan fehérjékkel együtt lokalizálódnak, melyek a DNS-javító folyamatokban vesznek részt (Sokolov és mtsai. 2005). A megfigyelést mi is megerősítettük, azt találtuk, hogy az EV-recipient állatok lépsejtjeiben megnőtt a γ H2AX fókuszok száma. A károsodások keletkezésének magyarázatára a bystander sejtekben azonban eddig még nem került sor. Dutta és mtsai. ugyanakkor leírták, hogy az EV transzfer olyan fehérjék foszforilációját okozta a recipient sejtekben, amelyek a DNS-javító mechanizmusokban vesznek részt. Ezt a hatást az EV-k olyan szignálok közvetítésével érték el, melyek ROS képződést és oxidatív stressz következtében kialakuló reakciókat váltottak ki *in vitro* a vizsgált emlő epitelsejtekben (Dutta és mtsai. 2014). Az EV-k szerepét az oxidatív stressz közvetítésében további cikkek is közölték (Larson és mtsai. 2014, Fontaine és mtsai. 2009). Fontaine és mtsai. egyértelműen

megegerősítették az EV-k szerepét ebben a folyamatban. Szívkoszorúér-műtéten átesett betegekben a műtét után csökkent az érfal oxidatív stressz okozta károsodása, ha a beavatkozás közben EV-mentes plazmát kapott a beteg (Fontaine és mtsai. 2009). Ismert, hogy a ROS nagyban felelős a röntgen-sugárzás okozta DNS-károsodások kialakulásáért és a DNS-javító útvonalak aktivációjáért, az említett publikációk pedig az EV-k szerepét erősítik meg az oxidatív stressz közvetítésében. Habár munkánk során nem mértük az EV-recipient sejtekben keletkező ROS-t, a kialakuló sugárzás-specifikus komplex DNS-károsodások megnövekedéséből és a DNS-javító mechanizmusok kialakulásáért felelős jelátviteli útvonalak aktivációjából egyértelműen következik, hogy mindez a redoxpotenciál szabályozta útvonalakon keresztül történt. Mindezt az is alátámasztja, hogy azokban az állatokban, melyek a 0 Gy állatokból izolált EV-t kapták, a DNS-károsodások mértéke nem nőtt meg. Továbbá, a besugárzott egerekből származó EV-k olyan miRNS-eket tartalmaztak megváltozott mennyiségben, melyek a DNS-károsodások hibajavító folyamatainak szabályzásában vesznek részt. Érdekes megfigyelés volt, hogy a γ H2AX fókuszok száma elérte a maximumát azokban a bystander állatokban, melyek 0,25 Gy EV-t kaptak. A jelenség összhangban van több közlemény adataival, ahol a károsodások mértéke 0,5 Gy dózis alatt tetőzött (Little és mtsai. 2003, Nagasawa és Little 2002, Watson és mtsai. 2000). A sugárzás-indukálta BE független a dózistól, ehelyett a sejt DNS-javító képessége és a keletkező szabadgyökök mennyisége a meghatározó a károsodások kialakításában (Nikitaki és mtsai. 2016). Nagy valószínűséggel a magyarázat a kis és nagy dózisú besugárzás után a sejtek által kibocsátott EV-k közvetítette makromolekulákban rejlik.

A következőkben a lépsejtek fenotípusos változását vizsgáltuk a bystander állatokban az EV transzfert követően. Vizsgálati végpontjaink a lépsejt alpopulációk mennyiségi változása, osztódási kinetikája és aktivációs státusza voltak. A lép nagy sugárérzékenysége főképp a benne található nagyszámú limfocita jelenlétével magyarázható, hiszen a limfociták a leg-sugárérzékenyebb sejtek közé tartoznak, és – ahogy korábban láttuk, - még kis dózisú besugárzás is jelentős mértékű limfopéniával jár. A bystander állatok lépében tapasztalható sejtszám-csökkenés hasonlít ugyan a közvetlen besugárzás után leírtakhoz, ugyanakkor van néhány különleges jellemzője, ami arra enged következtetni, hogy kialakulásuk hátterében különböző mechanizmusok állhatnak. Jellemző volt például, hogy bystander választ csak néhány limfocita

alpopulációban (CD4+ és CD8+ T-sejtek, NK-sejtek) tudtunk kimutatni, míg más alpopulációkban (CD-k és B-sejtek) ezek hiányoztak. A bystander hatásra kialakuló változások nem mindig követték a közvetlen besugárzás okozta változások mintázatát. A legszembetűnőbb a DC-k TLR4 marker megjelenésében mutatott eltérések. A közvetlen besugárzás (leginkább a 2 Gy) megnövelte a sejtfelszíni fehérje mennyiségét, ami a korábbi közleményekkel összhangban arra utalhat, hogy a sugárzás hatására megnő a veszélyszignálok (pl. HMGB1) jelenléte, és ez a jelátvitel a DC-k TLR4 receptorán keresztül közvetítődik (Kono és mtsai. 2013, Werthmoller és mtsai. 2016). Ezzel ellentétben, a bystander állatokban a DC-ken megjelenő TLR4 fehérje mennyisége a kontroll szintjének felére csökken és a változás nem függ a dózistól. Mindez arra utal, hogy az EV-közvetítette bystander szignálok gátolják vagy csökkentik a DC-k veszélyszignálokra adott válaszát. Korábbi összefoglaló közlemények szintén kiemelik a TLR molekulákat mint kulcsszereplőket, a sugárzás indukálta szisztémás hatásokban és gyulladásos reakciókban ugyanúgy, mint a szisztémás BE-k kiváltotta jelátviteli útvonalak főbb szereplői között (Georgakilas és mtsai. 2015, Candeias és Testard 2015).

A fent leírt, a bystander állatokban észlelt fenotípusos változások alátámasztják azt az nézetet, hogy a sugárzás indukálta BE nem a sugárzás okozta hatások passzív közvetítését jelenti a közvetlenül besugározott állatból a bystander állatba, hanem egy jóval szelektívebb folyamat, amely komplex jelátviteli útvonalak megváltozását okozhatja a recipiens egyedben, és egészen különféle végpontokra lehet hatással. Így lehetséges, hogy a két hatás (közvetlen besugárzás és BE) mintázata nem feltétlenül egyezik meg. Ez a nézőpont számos jelátviteli molekula jelenlétét feltételezi, ami az EV-k - mint számos proteinnek, mRNS-nek és miRNS-nek aktív hordozói - szerepét erősíti meg a BE közvetítésében.

A lépsejtek vizsgálata után érdeklődésünket a vérplazma fehérjék mennyiségi változásának tanulmányozására is kiterjesztettük. Számos közlemény megerősíti, hogy a besugárzás okozta szisztémás hatások gyulladásos reakciót váltanak ki, és ez a sugárterápiával kezelt betegek vérplazmájából kimutatható (Tada és mtsai. 2014, Widlak és mtsai. 2015). A mi megközelítésünk az volt, hogy a besugározott és bystander állatok vérplazmájában mérjük azon citokinek, kemokinek, növekedési

faktorok szintjét, melyek a sugárzás indukálta gyulladásban és az immunválaszban vesznek részt. Azt találtuk, hogy a vizsgált fehérjék közül viszonylag kevésnek változott a szintje a kezelések hatására a kontroll állatokhoz képest, és a szignifikáns eltérést mutató proteinek kemokinek vagy kemokin ligandok voltak. Két fehérje (pentraxin-3 (PTX-3) és M-CSF) mennyisége a kis és nagy dózisú besugárzás után és a bystander állatokban is megemelkedett a kontrollhoz képest. Ebből arra következtethetünk, hogy a két fehérje a sugárzása adott stresszválaszban játszik szerepet és ezeket a fehérjéket az EV-k vitték át a recipiens egyedbe. A PTX-3 egy akut-fázis fehérje, mely gyorsan termelődik és szabadul fel a vérben gyulladásos stimulusok hatására és a veleszületett immunválaszban tölt be szerepet (Mantovani és mtsai. 2003). A PTX-3 sugárzás indukálta változását eddig kevés tanulmány írta le. Christersdottir Bjorklund és mtsai. sugárterápián átesett betegeknél a terápia mellékhatásaként fellépő kardiovaszkuláris elváltozások biomarkereként azonosították; a fehérje hosszantartó termelődését tapasztalták a besugarazott artériákban és vénákban (Christersdottir Bjorklund és mtsai. 2017). Sproull és mtsai. állatkísérletes modellben sugárválasz fehérjeként írták le, 18 Gy egésztest és lokális besugárzás után a károsodás mértékére következtethettek a segítségével (Sproull és mtsai. 2017). Jóllehet kis dózisú besugárzás után vagy a BE részeként még nem vizsgálták a PTX-3 fehérjét, azt több közlemény stressz-válasz fehérjeként írja le (Haglund és mtsai. 2008, Shiraki és mtsai. 2012, Tomandlova és mtsai. 2015, Isik Balci és mtsai. 2016). Az M-CSF egy pleiotróp növekedési faktor, mely a monociták osztódását, differenciációját és túlélését, és a makrofágok terjedését segíti (Pixley és Stanley 2004). A fehérje 1,6-szoros növekedését írták le egerekben 2 Gy besugárzás után 24 órával (Ariyoshi és mtsai. 2014), ami egészen hasonló az általunk kapott 1,3-szoros növekedéshez, amit ugyanakkora dózisú közvetlen besugárzás után mértünk. Korábban különböző kolónia-stimuláló faktorok megnövekedését mutatták ki kis dózissal besugarazott egerek lépsejtjeiben, és ez a csontvelői progenitor sejtek fokozott differenciációját és a perifériára történő áramlását okozta (Li és mtsai. 2004). A PTX-3 és M-CSF fehérjéken kívül más fehérjét nem találtunk, aminek a szintje 0,1 Gy és 2 Gy besugárzás után ugyanúgy változott volna, vagy hasonlóan viselkedett volna 0,1 Gy közvetlen besugarazott és a 0,1 Gy bystander állatokban. Ugyanakkor két fehérje szintje emelkedett meg mind a 2 Gy közvetlen besugarazott mind 2 Gy bystander egyedekben is; ezek a CXCL16 és a lipocalin-2. A

CXCL16 egy T-sejt aktivációban résztvevő gyulladásos kemokin, amely kifejeződése besugárzás után különböző tumorokban megnő (Matsumura és mtsai. 2008, Matsumura és Demaria 2010, Yoon és mtsai. 2016). Nikitaki és mtsai. a CXCL16-ot a sugárzás-indukálta BE-ért felelős jelátviteli útvonalak (mint a citokin-citokin és a kemokin jelátviteli útvonalak) főbb elemének nevezték (Nikitaki és mtsai. 2016). A lipocalin-2 egy pleiotróp fehérje, amely a különböző szervekben celluláris stressz és szöveti sérülések után keletkezik, ezért a gyulladás jó biomarkere (Asimakopoulou és mtsai. 2016). Megnövekedett szekrécióját írták le az oxidatív stressz különböző körülményei között, ahol a lipocalin-2 egy védő faktornak bizonyult, többek között számos antioxidáns termelésének stimulálásával (Bahmani és mtsai. 2010, Roudkenar és mtsai. 2011, Bahmani és mtsai. 2014). Összefüggésbe hozták a sugárzás-okozta tüdő- és májkárosodással is (Sultan és mtsai. 2013, Sultan és mtsai. 2016). A lipocalin-2 szint nagymértékű emelkedését tapasztalták bystander embrionális egér fibroblaszt sejtekben, melyek 4 Gy dózissal besugározott egerek szérumát kapták (Sugihara és mtsai. 2013). A fentiekkel összhangban vannak eredményeink, 2 Gy besugárzás a lipocalin-2 erőteljes megemelkedését okozta és ez a 2 Gy bystander állatokban is fennállt. Érdekes megfigyelés volt, hogy két kemokin, a CCL5 és CCL11 szintje csak a bystander egyedekben változott. A CCL5 szintjének változását már korábban, besugározott sejtek tápfolyadékával kezelt bystander sejtek felülúszójában írtak le (Desai és mtsai. 2016), de a CCL11 részvétele a sugárzás-indukálta BE-ban eddig nem ismert.

Mivel az EV-k miRNS-ekben gazdagok, képesek epigenetikai jeleket közvetíteni egyik sejtől (itt a besugározott egyedből) a másik sejtbe (itt a bystander egyedbe), és így a recipiens sejtben megváltoztatni a génexpressziós mintázatot. Kísérleteinkben a csontvelői EV-k miRNS-tartalmát vizsgáltuk, illetve a besugárzás hatását a perifériás vérben keringő EV-k miRNS-tartalmára. Azt találtuk, hogy az EV-k miRNS összetétele nem változik meg besugárzás hatására, vagyis ugyanaz a miRNS panel található meg a besugárzás előtt, mint utána. A különbség a miRNS-ek mennyiségében van, ami arra utal, hogy a sugárzás megváltoztatja bizonyos miRNS-ek expresszióját vagy a besugárzás befolyásolja a miRNS-ek EV-kbe való „csomagolásának” folyamatát.

A csontvelői EV-kból izolált 8, besugárzás hatására megváltozott mennyiségű miRNS szintje úgy tűnik, dózisfüggően változik. Majdnem mind a nyolc miRNS-ről leírták,

hogy különböző szövetek sugárérzékenységét befolyásolja. A miR-33 gátolja a HDL (high-density lipoprotein) okozta sugárérzékenységet mellrákban (Wolfe és mtsai. 2016), és a miR-199a-5p érzékenyíti a mellrák sejteket a besugárzásra (Yi és mtsai. 2013). Számos miRNS-t a DNS-károsodások javításával hoztak összefüggésbe, így a miR-33-nak és a miR-375-nek a p53 molekulán keresztüli DNS-károsodások javítási útvonalában van szerepe (Wolfe és mtsai. 2016, Liu és mtsai. 2013), a miR-744-3p pedig a RAD23B génre van közvetlen hatással, ami a sugárzás-okozta DNS-károsodások javítását akadályozza prosztata-tumorsejtekben (Hatano és mtsai. 2015). A 8 megváltozott miRNS közül több vesz részt immunfolyamatok szabályzásában. Wang és mtsai. azt találták, hogy a miR-152 termelődése megnő bizonyos humán sejtvonalakban besugárzás hatására, és a veleszületett immunrendszer sejtjeit szabályozza (Wang és mtsai. 2011). Liu és mtsai. leírták, hogy a miR-152 gátolja a DC-k érését és aktivációját - TLR4 antagonistákkal (mint például az LPS vagy a HMGB1) (Liu és mtsai. 2010). A megnövekedett miR-152 szintet az NK-k sejtölő aktivitásának megnövekedésével hozták összefüggésbe (Zhu és mtsai. 2010). Mivel eredményeinkben a miR-152 szintje mind a 0,1 Gy, mind a 2 Gy besugárzás után megnőtt a csontvelői EV-kben, ez magyarázhatja, hogy a TLR4 marker kifejeződése a DC-ken miért csökkent a 0,1 Gy és 2 Gy bystander állatokban és az NK-sejtek osztódási rátája miért emelkedett meg ugyanazokban az egyedekben. Korábban a miR-33 szerepét a makrofágok ATP-kötő A1 és G1 fehérjeinek gátlásával a veleszületett immunrendszer szabályzásában is megerősítették (Lia és mtsai. 2016, Marquart és mtsai. 2010). Az ATP-kötő A1/G1 fehérjék egyik fő feladata a TLR4 molekulák szerveződésének és aktivációjának gátlása (Zhu és mtsai. 2010). Ez azt jelenti, hogy az alacsony miR-33 szint közvetetten alacsony TLR4 szinthez vezethet, amit a bystander állatokban ki is mutattunk. Huszonhét KEGG útvonalat azonosítottunk, melyekre a megváltozott expressziójú miRNS-ek hatással lehetnek. Egy részük a sugárzásra adott sejtes válasszal kapcsolatos (Hippo, Foxo, PI3K, Hedgehog és TGF β útvonalak). A Hippo útvonalat a DNS-károsodások, pontosan a DNS-törések aktiválják, és az ATM, illetve az ATM- és RAD3-kötő (ATR) kinázokat aktiválja, melyek a DNS-javítás fő szabályzója. Másrészt, a Hippo útvonal a DNS-károsodás következtében sejtthalált is kiválthat (Pefani és O'Neill 2016). A Foxo és PI3K útvonalak szintén az ATM jelátviteli útvonal aktiválói, és genom integritásának fenntartói a DNS-károsodásokat követően (Mukherjee és mtsai.

2012, Tarrade és mtsai. 2015). A Hedgehog útvonalnak a DNS-károsodások javításában van szerepe (Meng és mtsai. 2015). Három másik útvonal van még szoros összefüggésben a hematopoetikus rendszerrel. Érdekes módon az az útvonal adta az egyik legszignifikáns változást, amelyik az őssejtek pluripotenciájának szabályozásában vesz részt, utalva a változásokra, melyeket a csontvelői sejtpopulációk arányában mértünk. A Wnt útvonal kulcsfontosságú a hematopoetikus sejtek, ezen belül a hematopoetikus őssejtek önmegújításában és differenciálódásában (Lento és mtsai. 2013). Az útvonal a T-sejtek érésében is szerepet játszik a lépben (Xu és mtsai. 2003), serkenti a CD8⁺ T-sejtek képződését, a Treg sejtek túlélését és a B-sejtek proliferációját (Lento és mtsai. 2013). A HTLV fertőzés útvonala magába foglalja a TGF β , a T-sejt receptor és a Wnt útvonalakat. Ezen útvonalak végpontjai a gyulladással, leukocita migrációval, és proliferációval kapcsolatosak, illetve a hematopoetikus rendszer felé közvetít változásokat (Franchini és mtsai. 2003, Ma és mtsai. 2013). Néhány újabb összefoglaló cikk segít, hogy a sugárzás kapcsolatát megértsük a gyulladással és az immunválasszal. Nikitaki és mtsai. irodalmi adatok elemzése folytán gének két csoportját írta le: az egyik csoportba tartozók a BE közeli sejtek közötti, míg a másik csoportba tartozó gének a szisztémás hatások kialakulásáért lehetnek felelősek, és mindkét csoport esetén a gének befolyása alatt álló jelátviteli útvonalakat is összesítették. Az első 10 útvonal között kemokin, MAPK és Jak-Stat jelátviteli útvonalak szerepelnek, melyek a BE-hez kapcsolódóak, és a MAPK jelátvitel, az NK-sejt mediálta citotoxicitás, T-sejt receptor jelátviteli útvonalak, melyek a szisztémás hatások kialakulásáért tehetőek felelőssé (Nikitaki és mtsai. 2016). A leírt útvonalak szépen átfednek azzal, amit a besugározott egérből izolált csontvelői EV-k miRNS-eivel kapcsolatban találtunk. Georgakilas és mtsai. összegyűjtötték azokat a géneket, melyek mind a sugárválaszban és/vagy az immunválaszban részt vesznek, és egy funkcionális vizsgálatot készítettek, amivel számos gént és útvonalat azonosítottak mint a sugárzás-okozta gyulladás és immunválasz elemei, többek között a TGF β , Wnt, MAPK és inzulin jelátviteli útvonalak (Georgakilas és mtsai. 2015), melyekről mind kimutattuk, hogy a csontvelői EV-kben sugárzás hatására megváltozott expressziójú miRNS-ek érintettek lehetnek benne.

Az csontvelői és plazma miRNS-ek közül 2 Gy besugárzás hatására két átfedőt találtunk, a miR-150-5p-t és a miR-491-et. A miR-150-5p egy keringő miRNS, amely

bizonyos kereteken belül (1 – 12 Gy) a dózis nagyságával arányosan változik a besugárzás után 24-48 órával. Mivel a limfocitákban nagy mennyiségben van jelen, és a limfocita sejtpusztulás és csontvelői károsodás érzékeny jelzőjének tartják, a miR-150-5p jó markere lehet a biológiai dozimetriának (Jacob és mtsai. 2013, Menon és mtsai. 2016). Egy korábbi tanulmányban, amiben sugárterápián átesett nem-kissejtes tüdőrákban szenvedő betegek vérmintáit elemezték, 10 keringő miRNS-t azonosítottak, amik között a miR-150-5p is szerepelt, és megállapították, hogy annak mennyisége a dózis növekedésével csökkent. Továbbá megállapították, hogy a tüdőráksejtek és sztrómasejtek által termelt exoszómákban a miR-150-5p mennyisége a besugárzással, míg a miRNS sejten belüli mennyisége nőtt, ami arra utal, hogy a miRNS exoszómába történő exportja csökkent a sejtekben a sugárzásra adott válaszként (Dinh és mtsai. 2016, Menon és mtsai. 2016). Legjobb tudomásunk szerint a miR-491-et korábban nem hozták összefüggésbe a sugárzással. Ez a miRNS tumor szupresszorként hat, gátolja a tumornövekedést, az epiteliális-mezenhímális átalakulást és a metasztázis kialakulását számos tumortípusnál (Guo és mtsai. 2012, Zhuo és mtsai. 2013, Denoyelle és mtsai. 2014, Hui és mtsai. 2015, Sun és mtsai. 2017). Bár a szerepét az immunrendszer szabályozásában nem ismerik, de expressziója megnőtt a lép CD8⁺ T-sejtekben végbéldaganatos egerekben, és gátolta a T-sejt proliferációt, elősegítette az apoptózist és gátolta az INF γ termelést (Yu és mtsai. 2016).

Egy lehetséges magyarázata annak, hogy miért találtunk kevés átfedő miRNS-t a csontvelői és plazma miRNS-ek között az lehet, hogy míg a csontvelői EV-kből származó miRNS-ek tisztán a csontvelői sejtek sugárválaszt tükrözik, addig a plazma EV-k részben a vérsejtekből eredő, részben viszont minden más szerv sugárzásra adott stresszválaszt közvetíti. Emiatt a plazmában lévő EV-k miRNS-ei sokkal heterogénebb szisztémás választ tükröznek, és a szervspecifikus hatásokat ez elfedheti.

Bár az átfedő megváltozott expressziójú miRNS-ek száma alacsony, az általuk szabályozott útvonalak között sok azonos mutatkozik, melyek közül részletesen 2 útvonalat emelnénk ki (AML és TGF β) és vizsgálnánk részletesen, mivel ezek részben a sugárzás hatásainak közvetítői lehetnek. Ez a két útvonal a dózistól és a származási szövetétől (csontvelő vagy vér) függetlenül változott. A sugárzás hatása az AML indukálásában jól körülírt (Kesminiene és mtsai. 2008, Gilbert 2009) és egyre több a

bizonyíték arra, hogy kis dózisú besugárzás is megnöveli a betegség kialakulási valószínűségét (Pearce és mtsai. 2012, Laurent és mtsai. 2013, Laurier és mtsai. 2016). Mivel a hematopoetikus őssejtek sugárzás-indukálta közvetlen sejtkárosodása az AML kialakulásának fő oka, nyilvánvalóvá vált, hogy a tumorsejtek és azon mikro- és makrokörnyezete közötti kommunikáció hatással van a betegség kialakulására és annak lefolyására (Arai és Suda 2007, Schroeder és mtsai. 2016). Mole és mtsai. már 1983-ban feltételezték, hogy a kis dózisú sugárzás okozta leukémia kialakulása két szomszédos károsodott sejt közötti jelátvitel eredménye (Mole és mtsai. 1983). Ezek fényében érdekes látni, hogy az EV-k képesek AML-lel kapcsolatos jeleket közvetíteni a csontvelőben és a vérben is. A TGF β útvonal az egyik legjobban körülírt sugárzás-indukálta immunválasszal és gyulladással kapcsolatos útvonal. Szerepet játszik a DNS-károsodások felismerésében (Barcellos-Hoff és Cucinotta 2014, Du és mtsai. 2015), de a besugárzás utáni immunválaszban is (Georgakilas és mtsai. 2015). Sőt, a TGF β maga és a TGF β -hoz kapcsolódó jelátviteli útvonal a BE-sal és a sugárzás más nem-célzott hatásaival is összefügg (Barcellos-Hoff és Brooks 2001, Shao és mtsai. 2008, Chai és mtsai. 2013) és különböző miRNS-ek képesek a TGF β jelátviteli útvonalon keresztül szabályozni a BE kialakulását (Hu és mtsai. 2014, Jiang és mtsai. 2014, Xu és mtsai. 2014, Yin és mtsai. 2015). A TGF β jelátviteli útvonalra ható miRNS-ek jelenléte a csontvelői és a vérplazma EV-kben tovább erősítik az EV-k szerepét a sugárzás-okozta BE-ban.

7. Következtetések

- elsőként írtuk le szisztematikusan, hogy a kis és nagy dózisu *in vivo* besugárzás hogyan változtatja meg az egyes lépsejt alpopulációk sugárzérzékenységét egér modellen
 - *in vivo* kis dózisu besugárzás jelentős hatással van az egér lépsejtekre
 - kis és nagy dózisu besugárzás hatására más-más mechanizmusok aktiválódnak, vagyis különböző jelátviteli szignálokön keresztül hatnak
 - nagy dózisok: gyors sejtszám csökkenés, ugyanakkor a regeneráció már besugárzás után hét napon belül elkezdődött
 - kis dózisok: hatása tartósabbnak bizonyult, hét nappal a besugárzás után egyáltalán nem, vagy alig fedezhetők fel a regenerálódás jelei
- Treg sejtek sugárzásra adott válasza komplex:
 - egyrészt a nagy dózisu besugárzás hatására megnő a CD4+ lépsejteken belüli aránya, mely valószínűleg a kismértékű apoptotikus rátájának és jobban megtartott proliferációs készségének köszönhető
 - másrészt azonban a besugarazott Treg sejt T-sejt gátló képessége jelentősen csökkent, ez a sejtek megváltozott funkcionális integritását mutatja
- az ionizáló sugárzás fokozza a DC-k aktivációját
 - aktivációs markereinek kifejeződése megnövekedett
 - antigénbemutatós hatékonysága viszont csökkent
- kidolgoztunk egy *in vivo* modellt, amivel az EV-k szerepét tudtuk vizsgálni és bizonyítani a sugárzás-okozta bystander hatás kialakulásában
 - a besugarazott egér csontvelőjéből származó EV-k képesek a DNS-károsodások javítását aktiválni a recipiens állatok lépsejtjeiben, valamint mennyiségi és fenotípusos változásokat kiváltani a különböző lépsejt alpopulációkban
 - a direkt besugarazott és bystander állatokban végbemenő változások kialakulásának hátterében különböző mechanizmusok állnak
 - az EV-k képesek sugárzás-indukálta immunválasz és gyulladás szignáljait közvetíteni a perifériás vérben

- EV-kból izolált miRNS-ek potenciális résztvevői a DNS-károsodások javításában, hematopoézisben és különböző immunológiai folyamatokban szereplő jelátviteli útvonalaknak mind a csontvelőben, mind a vérben
- bizonyítottuk az EV-k szerepét a sugárzás-okozta szisztémás bystander hatásban, melynek legvalószínűbb közvetítői a miRNS-ek

8. Összefoglalás

A dolgozat fő témája a kis és nagy dózisú ionizáló sugárzás immunrendszerre gyakorolt hatásának a vizsgálata volt. Megállapítottuk, hogy a besugározott egerek lépsejt alpopulációinak egymáshoz viszonyított arányát jelentősen befolyásolta a sugárzás, ami elsősorban 2 Gy hatására volt nyilvánvaló. Eszerint a legérzékenyebbek a B sejtek és CD8 sejtek, a legrezisztensebbek a DC, NK és Treg sejtek voltak. Ezzel összefüggésben kimutattuk, hogy a sugárzás-indukálta apoptózisra a B-sejtek voltak a legérzékenyebbek, az NK, a Treg és a DC sejtek pedig a legrezisztensebbek. A sugárérzékeny alpopulációkban már a kis dózisok is szignifikáns mértékben megnövelték az apoptózis mértékét, szemben a sugárrezisztens DC sejtekkel, ahol a kis dózistartományok hatására az apoptózis mértéke csökkent. A lépsejtekben mért citokin génexpresszió tekintetében a mind a Th1 és Th2 típusú citokinek szintje kis dózisú besugárzás után csökkent, nagy dózis után nőtt. A Treg sejtek intenzívebben osztódtak 2 Gy besugárzás után és hamarabb visszanyerték az eredeti sejtszám állományukat, mint a CD4⁺ T-sejtek. Bár 2 Gy besugárzás után a Treg-eken a szupresszióért felelős CTLA-4 fehérje mennyisége megduplázódott, és az IL-10 génexpressziós szintje megemelkedett, mindemellett csökkent a Treg sejtek effektor T-sejt gátló képessége. A DC-k aktivációját fokozta a nagy dózisú besugárzás, stimulációs (CD80/86), gátló (B7H1) és stresszválaszban résztvevő (TLR-4) fehérjéinek szintje megnőtt.

A sugárzás-indukálta bystander hatás (BE) immunrendszerre gyakorolt hatásának vizsgálatához egy *in vivo* rendszert dolgoztunk ki, melyben az extracelluláris vezikulák (EV-k) szerepét bizonyítottuk a BE közvetítésében. Kis és nagy dózisú besugárzás után csontvelői EV-ket izoláltunk, majd azokat naív egerekbe oltva létrehoztuk az ún. bystander állatokat. A besugározott állatokból származó EV-k hatására megnőtt a DNS-károsodás mértéke a bystander egyedekben, a lép CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek száma csökkent, akárcsak a TLR-4 fehérjét kifejező DC-k száma. A kis és nagy dózissal besugározott állatokból izolált csontvelői EV-kben 8 miRNS expressziós szintje változott meg, ezek mind a DNS-károsodások javításával, a hematopoetikus és immunrendszer szabályozásával kapcsolatos jelátviteli útvonalakban játszanak szerepet, vagyis a bystander állatokban tapasztalt hatások kiváltásáért lehetnek felelősek.

Summary

The main topic of the dissertation was to study the effects of low and high dose ionizing radiation on the immune system. We found that the ratio of different splenocyte subpopulations of irradiated mice was significantly influenced by radiation, and this effect was more relevant due to 2 Gy. Accordingly, B cells and CD8 cells were the most sensitive, while DC, NK and Treg cells were the most resistant. In this context, we have shown that B cells were the most sensitive to radiation-induced apoptosis, while NK, Treg and DC cells were the most resistant. In radiosensitive subpopulations, low doses also significantly increased the rate of apoptosis, compared to the radiation-resistant DC cells, where apoptosis was reduced due to low dose irradiation. In case of cytokine gene expression in spleen cells, the levels of Th1 and Th2 cytokines decreased after low dose irradiation and increased at high doses. Treg cells proliferated more intensively after 2 Gy irradiation and recovered to the original cell number faster than CD4 + T cells. After 2 Gy irradiation, the amount of CTLA-4 protein responsible for the suppression of the Tregs, was doubled and the IL-10 gene expression level increased, however, the T-cell inhibitory effect of Treg cells decreased. Activation of DCs was enhanced by the high dose irradiation, the level of stimulatory (CD80/86), inhibitory (B7H1) and stress response (TLR-4) proteins increased.

To investigate the radiation-induced bystander effects (BE) on the immune system, an *in vivo* system was developed, in which the role of extracellular vesicles (EVs) was demonstrated as mediators of BE. We created the so-called bystander animals by isolating EVs from bone marrow of low and high dose irradiated mice, and grafting them onto naive mice. The level of DNA damage in splenocytes of bystander animals increased, the number of spleen CD4+ and CD8+ T cells decreased, as the number of DCs expressing the TLR-4 protein decreased as well following EV injection from irradiated mice. In EVs isolated from (the BM of) low and high dose irradiated mice 8 miRNAs were differently expressed compared to control. These miRNAs play role in signaling pathways related to DNA damage repair, haematopoietic and immune regulation, indicating that they are responsible for triggering the effects found in bystander animals.

9. Irodalomjegyzék

Aliotta JM, Sanchez-Guijo FM, Dooner GJ, Johnson KW, Dooner MS, Greer KA, Greer D, Pimentel J, Kolankiewicz LM, Puente N, Faradyan S, Ferland P, Bearer EL, Passero MA, Adedi M, Colvin GA, Quesenberry PJ. (2007) Alteration of marrow cell gene expression, protein production, and engraftment into lung by lung-derived microvesicles: a novel mechanism for phenotype modulation. *Stem Cells*, 25:2245–56.

Al-Mayah A, Bright S, Chapman K, Irons S, Luo P, Carter D, Goodwin E, Kadhim M. (2015) The non-targeted effects of radiation are perpetuated by exosomes. *Mutat Res*, 772:38–45.

Al-Mayah AH, Irons SL, Pink RC, Carter DR, Kadhim MA. (2012) Possible role of exosomes containing RNA in mediating nontargeted effect of ionizing radiation. *Radiat Res*, 177:539–45.

Amundson SA, Do KT, Shahab S, Bittner M, Meltzer P, Trent J, Fornace AJ Jr. (2000) Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat Res*, 154(3):342-6.

Andreu Z, Yanez-Mo M. (2014) Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol*, 5:442.

Arai F, Suda T. (2007) Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Ann N Y Acad Sci*, 1106:41-53.

Arce-Sillas A, Álvarez-Luquín DD, Tamaya-Domínguez B, Gomez-Fuentes S, Trejo-García A, Melo-Salas M, Cárdenas G, Rodríguez-Ramírez J, Adalid-Peralta L. (2016) Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation. *J Immunol Res*, 2016:1720827.

Ariyoshi K, Takabatake T, Shinagawa M, Kadono K, Daino K, Imaoka T, Kakinuma S, Nishimura M, Shimada Y. (2014) Age dependence of hematopoietic progenitor survival and chemokine family gene induction after gamma irradiation in bone marrow tissue in C3H/He mice. *Radiat Res*, 181(3):302-13.

Asimakopoulou A, Weiskirchen S, Weiskirchen R. (2016) Lipocalin 2 (LCN2) Expression in Hepatic Malfunction and Therapy. *Front Physiol*, 7:430.

- Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. (2008) Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev*, 7(5):370-5.
- Backes C, Meese E, Keller A. (2016) Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Mol Diagn Ther*, 20(6):509-518.
- Bahmani B, Roudkenar MH, Halabian R, Jahanian-Najafabadi A, Amiri F, Jalili MA. (2014) Lipocalin 2 decreases senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells under sub-lethal doses of oxidative stress. *Cell Stress Chaperones*, 19(5):685-93.
- Bahmani P, Halabian R, Rouhbakhsh M, Roushandeh AM, Masroori N, Ebrahimi M, Samadikuchaksaraei A, Shokrgozar MA, Roudkenar MH. (2010) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin induces the expression of heme oxygenase-1 and superoxide dismutase 1, 2. *Cell Stress Chaperones*, 15(4):395-403.
- Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Urbanowicz B, Brański P, Ratajczak MZ, Zembala M. (2006) Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother*, 55(7):808-18.
- Banchereau J, Steinman RM. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673):245-52.
- Barcellos-Hoff MH, Brooks AL. (2001) Extracellular signaling through the microenvironment: a hypothesis relating carcinogenesis, bystander effects, and genomic instability. *Radiat Res*, 156:618-27.
- Barcellos-Hoff MH, Cucinotta FA. (2014) New tricks for an old fox: impact of TGFβ on the DNA damage response and genomic stability. *Sci Signal*, 7(341): re5.
- Batagov AO, Kuznetsov VA, Kurochkin IV. (2011) Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC Genomics*, 12(Suppl. 3):S18.
- Bayer AL, Jones M, Chirinos J, de Armas L, Schreiber TH, Malek TR, Levy RB. (2009) Host CD4⁺CD25⁺ T cells can expand and comprise a major component of the Treg compartment after experimental HCT. *Blood*, 113(3):733-43.

Beloribi S, Ristorcelli E, Breuzard G, Silvy F, Bertrand-Michel J, Beraud E, Verine A, Lombardo D. (2012) Exosomal lipids impact notch signaling and induce death of human pancreatic tumoral SOJ-6 cells. *PloS ONE*, 7:e47480.

Bilate AM, Lafaille JJ. (2012) Induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol*, 30:733-58.

Billiard F, Buard V, Benderitter M, Linard C. (2011) Abdominal γ -radiation induces an accumulation of function-impaired regulatory T cells in the small intestine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 80(3):869-76.

Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Thery C. (2012) Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles*, 1.

Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, Zhang HP, Donnellan M, Mahler S, Pryor K, Walsh BJ, Nicholson RC, Fairlie WD, Por SB, Robbins JM, Breit SN. (1997) MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(21):11514-9.

Bourdonnay E, Zasłona Z, Penke LR, Speth JM, Schneider DJ, Przybranowski S, Swanson JA, Mancuso P, Freeman CM, Curtis JL, Peters-Golden M. (2015) Transcellular delivery of vesicular SOCS proteins from macrophages to epithelial cells blunts inflammatory signaling. *J Exp Med*, 212(5):729-42.

Brenner DJ, Hall EJ. (2007) Computed Tomography - An Increasing Source of Radiation Exposure. *N Engl J Med*, 357: 2277-2284.

Brix N, Tiefenthaller A, Anders H, Belka C, Lauber K. (2017) Abscopal, immunological effects of radiotherapy: Narrowing the gap between clinical and preclinical experiences. *Immunol Rev*, 280 (1): 249–279.

Brown RD, Pope B, Murray A, Esdale W, Sze DM, Gibson J, Ho PJ, Hart D, Joshua D. (2001) Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after

huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood*, 98: 2992-2998.

Burchill MA, Yang J, Vang KB, Farrar MA. (2007) Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol Lett*, 114(1):1-8.

Burdak-Rothkamm S, Short SC, Folkard M, Rothkamm K, Prise KM. (2007) ATR-dependent radiation-induced gamma H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells. *Oncogene*, 26:993–1002.

Candeias SM, Testard I. (2015) The many interactions between the innate immune system and the response to radiation. *Cancer Lett*, 368:173–8.

Cao M, Cabrera R, Xu Y, Liu C, Nelson D. (2011) Different radiosensitivity of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and effector T cells to low dose gamma irradiation in vitro. *Int J Radiat Biol*, 87(1):71-80.

Cao M, Cabrera R, Xu Y, Liu C, Nelson D. (2009) Gamma irradiation alters the phenotype and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Cell Biol Int*, 33(5):565-71.

Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. (2016) MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *Int J Mol Sci*, 17:E1712.

Chai Y, Lam RK, Calaf GM, Zhou H, Amundson S, Hei TK. (2013) Radiation-induced non-targeted response in vivo: role of the TGFbeta-TGFBR1-COX-2 signalling pathway. *Br J Cancer*, 108(5): 1106-12.

Chang WL, Baumgarth N, Eberhardt MK, Lee CY, Baron CA, Gregg JP, Barry PA. (2007) Exposure of myeloid dendritic cells to exogenous or endogenous IL-10 during maturation determines their longevity. *J Immunol*, 178(12):7794-804.

Chaudhry MA, Omaruddin RA, Kreger B, de Toledo SM, Azzam EI. (2012) Micro RNA responses to chronic or acute exposures to low dose ionizing radiation. *Mol Biol Rep*, 39:7549–58.

Chaudhry MA, Omaruddin RA. (2012) Differential regulation of microRNA expression in irradiated and bystander cells. *Mol Biol (Mosk)*. 46:634–43.

Chen L. (2004) Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*, 4(5):336-47.

- Chen M, Huang L, Shabier Z, Wang J. (2007) Regulation of the lifespan in dendritic cell subsets. *Mol Immunol*, 44(10):2558-65.
- Chen W, Huang Y, Han J, Yu L, Li Y, Lu Z, Li H, Liu Z, Shi C, Duan F, Xiao Y. (2016) Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome. *Immunol Res*, 64(4):831-40.
- Christersdottir Björklund T, Reilly SJ, Gahm C, Bottazzi B, Mantovani A, Tornvall P, Halle M. (2013) Increased long-term expression of pentraxin 3 in irradiated human arteries and veins compared to internal controls from free tissue transfers. *J Transl Med*, 11:223.
- Clark EA, Ledbetter JA. (1994) How B and T cells talk to each other. *Nature*, 367(6462):425-8.
- Corthay A. (2009) How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol*, 70:326-36.
- Cui YF, Gao YB, Yang H, Xiong CQ, Xia GW, Wang DW. (1999) Apoptosis of circulating lymphocytes induced by whole body gamma-irradiation and its mechanism. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 18(3):185-9.
- Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. (2004) CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol*, 173(12):7259-68.
- Curran MA, Kim M, Montalvo W, Al-Shamkhani A, Allison JP. (2011) Combination CTLA-4 blockade and 4-1BB activation enhances tumor rejection by increasing T-cell infiltration, proliferation, and cytokine production. *PLoS ONE*, 6(4):e19499.
- Dainiak N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. (2002) *Exp Hematol*, 30(6):513-28.
- De Lastic AL, Rodi M, Mouzaki A. (2016) Effect of dendritic cell state and antigen-presentation conditions on resulting T-cell phenotypes and Th cytokine profiles. *Immunobiology*, 221(8):862-70.
- Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, Formenti SC. (2004) Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58(3):862-70.

Denoyelle C, Lambert B, Meryet-Figuière M, Vigneron N, Brotin E, Lecerf C, Abeilard E, Giffard F, Louis MH, Gauduchon P, Juin P, Poulain L. (2014) miR-491-5p-induced apoptosis in ovarian carcinoma depends on the direct inhibition of both BCL-XL and EGFR leading to BIM activation. *Cell Death Dis*, 5:e1445.

Desai S, Srmbikkal N, Yadav HD, Shetake N, Balla MM, Kumar A, Ray P, Ghosh A, Pandey BN. (2016) Molecular Understanding of Growth Inhibitory Effect from Irradiated to Bystander Tumor Cells in Mouse Fibrosarcoma Tumor Model. *PLoS ONE*, 11(8):e0161662.

Diab A, Jenq RR, Rizzuto GA, Cohen AD, Huggins DW, Merghoub T, Engelhorn ME, Guevara-Patiño JA, Suh D, Hubbard-Lucey VM, Kochman AA, Chen S, Zhong H, Wolchok JD, van den Brink MR, Houghton AN, Perales MA. (2013) Enhanced responses to tumor immunization following total body irradiation are time-dependent. *PLoS ONE*, 8(12):e82496.

Dickey JS, Zemp FJ, Martin OA, Kovalchuk O. (2011) The role of miRNA in the direct and indirect effects of ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys*, 50:491–9.

Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. (2001) Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*, 193(11):1303-10.

Dinh TK, Fendler W, Chałubińska-Fendler J, Acharya SS, O'Leary C, Deraska PV, D'Andrea AD, Chowdhury D, Kozono D. (2016) Circulating miR-29a and miR-150 correlate with delivered dose during thoracic radiation therapy for non-small cell lung cancer. *Radiat Oncol*, 11:61.

Donia M, Kjeldsen JW, Svane IM. (2015) The controversial role of TNF in melanoma. *Oncoimmunology*, 5(4):e1107699.

Du S, Bouquet S, Lo CH, Pellicciotta I, Bolourchi S, Parry R, Barcellos-Hoff MH. (2015) Attenuation of the DNA damage response by transforming growth factor-beta inhibitors enhances radiation sensitivity of non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 91(1):91-9.

Dudek AM, Martin S, Garg AD, Agostinis P. (2013) Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Front Immunol*, 4:438.

Dunn PL, North RJ. (1991) Selective radiation resistance of immunologically induced T cells as the basis for irradiation-induced T-cell-mediated regression of immunogenic tumor. *J Leukoc Biol*, 49(4):388-96.

Durdik M, Kosik P, Gursky J, Vokalova L, Markova E, Belyaev I. (2015) Imaging flow cytometry as a sensitive tool to detect low-dose-induced DNA damage by analyzing 53BP1 and gammaH2AX foci in human lymphocytes. *Cytometry A*, 87:1070–8.

Dutta S, Warshall C, Bandyopadhyay C, Dutta D, Chandran B. (2014) Interactions between exosomes from breast cancer cells and primary mammary epithelial cells leads to generation of reactive oxygen species which induce DNA damage response, stabilization of p53 and autophagy in epithelial cells. *PLoS ONE*, 9:e97580.

El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. (2013) Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 12:347–57.

Estaquier J, Ameisen JC. (1997) A role for T-helper type-1 and type-2 cytokines in the regulation of human monocyte apoptosis. *Blood*, 90(4):1618-25.

Fehérvári Z, Sakaguchi S. (2004) Development and function of CD25+CD4+ regulatory Tcells. *Curr Opin Immunol*, 16(2):203-208.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. (1991) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*, 146(10):3444-51.

Fontaine D, Pradier O, Hacquebard M, Stefanidis C, Carpentier Y, de Canniere D, Fontaine J, Berkenboom G. (2009) Oxidative stress produced by circulating microparticles in on-pump but not in off-pump coronary surgery. *Acta Cardiol*, 64:715–22.

Franchini G, Fukumoto R, Fullen JR. (2003) T-cell control by human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. *Int J Hematol*, 78:280–96.

Francia S, Michelini F, Saxena A, Tang D, de Hoon M, Anelli V, Mione M, Carninci P, d'Adda di Fagagna F. (2012) Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature*, 488:231–5.

Fritzsching B, Oberle N, Eberhardt N, Quick S, Haas J, Wildemann B, Krammer PH, Suri-Payer E. (2005) In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol*, 175(1):32-6.

Fujimori Y, Saheki K, Itoi H, Okamamoto T, Kakishita E. (2000) Increased expression of Fas (APO-1, CD95) on CD4+ and CD8+ T lymphocytes during total body irradiation. *Acta Haematol*, 104(4):193-6.

Fulcher DA, Basten A. (1997) B cell life span: a review. *Immunol Cell Biol*, 75(5):446-55.

Gallegos CE, Michelin S, Dubner D, Carosella ED. (2016) Immunomodulation of classical and non-classical HLA molecules by ionizing radiation. *Cell Immunol*, 303:16-23.

Gao F, Liu C, Guo J, Sun W, Xian L, Bai D, Liu H, Cheng Y, Li B, Cui J, Zhang C, Cai J. (2015) Radiation-driven lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Sci Rep*, 5:9613.

Garrido F, Ruiz-Cabello F, Aptsiauri N. (2017) Rejection versus escape: the tumor MHC dilemma. *Cancer Immunol Immunother*, 66(2):259-271.

Gene Ontology C. The Gene Ontology project in 2008. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D440–4.

Georgakilas AG, Pavlopoulou A, Louka M, Nikitaki Z, Vorgias CE, Bagos PG, Michalopoulos I. (2015) Emerging molecular networks common in ionizing radiation, immune and inflammatory responses by employing bioinformatics approaches. *Cancer Lett*, 368(2):164-72.

Gilbert ES. (2009) Ionising radiation and cancer risks: what have we learned from epidemiology? *Int J Radiat Biol*, 85(6):467-82.

- Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. (2005) Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*, 174(4):1783-6.
- Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, Tetta C, Bussolati B, Camussi G. (2011) Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res*, 71(15):5346-56.
- Greilich-Bode KM, Zimmermann F, Müller WU, Pakisch B, Molls M, Würschmidt F. (2012) Clinical, molecular- and cytogenetic analysis of a case of severe radiosensitivity. *Current Genomics*, 13:426-432.
- Gridley DS, Dutta-Roy R, Andres ML, Nelson GA, Pecaut MJ. (2006) Acute effects of iron-particle radiation on immunity. Part II: Leukocyte activation, cytokines and adhesion. *Radiat Res*, 165(1):78-87.
- Guo R, Wang Y, Shi WY, Liu B, Hou SQ, Liu L. (2012) MicroRNA miR-491-5p targeting both TP53 and Bcl-XL induces cell apoptosis in SW1990 pancreatic cancer cells through mitochondria mediated pathway. *Molecules*, 17(12):14733-47.
- Gupta A, Probst HC, Vuong V, Landshammer A, Muth S, Yagita H, Schwendener R, Pruschy M, Knuth A, van den Broek M. (2012) Radiotherapy promotes tumor-specific effector CD8+ T cells via dendritic cell activation. *J Immunol*, 189(2):558-66.
- Haabeth OA, Tveita AA, Fauskanger M, Schjesvold F, Lørvik KB, Hofgaard PO, Omholt H, Munthe LA, Dembic Z, Corthay A, Bogen B. (2014) How do CD4(+) T cells detect and eliminate tumor cells that either lack or express MHC class II molecules? *Front Immunol*, 5:174.
- Haglund L, Bernier SM, Onnerfjord P, Recklies AD. (2008) Proteomic analysis of the LPS-induced stress response in rat chondrocytes reveals induction of innate immune response components in articular cartilage. *Matrix Biol*, 27(2):107-18.
- Haley B, Paunesku T, Protić M, Gayle E, Woloschak GE. (2009) Response of heterogeneous ribonuclear proteins (hnRNP) to ionizing radiation and their involvement in DNA damage repair *Int J Radiat Biol*, 85(8): 643–655.

Han SK, Song JY, Yun YS, Yi SY. (2002) Gamma irradiation-reduced IFN-gamma expression, STAT1 signals, and cell-mediated immunity. *J Biochem Mol Biol*, 35(6):583-9.

Hanabuchi S, Watanabe N, Wang YH, Wang YH, Ito T, Shaw J, Cao W, Qin FX, Liu YJ. (2006) Human plasmacytoid predendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood*, 107(9):3617-23.

Hansson M, Asea A, Ersson U, Hermodsson S, Hellstrand K. (1996) Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites. *J Immunol*, 156(1):42-7.

Haribhai D, Lin W, Edwards B, Ziegelbauer J, Salzman NH, Carlson MR, Li SH, Simpson PM, Chatila TA, Williams CB. (2009) A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J Immunol*, 182(6):3461-8.

Harimoto H, Shimizu M, Nakagawa Y, Nakatsuka K, Wakabayashi A, Sakamoto C, Takahashi H. (2013) Inactivation of tumor-specific CD8⁺ CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunol Cell Biol*, 91(9):545-55.

Harrington NP, Chambers KA, Ross WM, Fillion LG. (1997) Radiation damage and immune suppression in splenic mononuclear cell populations. *Clin Exp Immunol*, 107(2):417-24.

Hashimoto S, Shirato H, Hosokawa M, Nishioka T, Kuramitsu Y, Matushita K, Kobayashi M, Miyasaka K. (1999) The suppression of metastases and the change in host immune response after low-dose total-body irradiation in tumor-bearing rats. *Radiat Res*, 151(6):717-24.

Hatano K, Kumar B, Zhang Y, Coulter JB, Hedayati M, Mears B, Ni X, Kudrolli TA, Chowdhury WH, Rodriguez R, DeWeese TL, Lupold SE. (2015) A functional screen identifies miRNAs that inhibit DNA repair and sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res*, 43:4075–86.

Hazawa M, Tomiyama K, Saotome-Nakamura A, Obara C, Yasuda T, Gotoh T, Tanaka I, Yakumaru H, Ishihara H, Tajima K. (2014) Radiation increases the cellular uptake of

exosomes through CD29/CD81 complex formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 446(4):1165-71.

Hekim N, Cetin Z, Nikitaki Z, Cort A, Saygili EI. (2015) Radiation triggering immune response and inflammation. *Cancer Lett*, 368(2):156-63.

Heylmann D, Rödel F, Kindler T, Kaina B. (2014) Radiation sensitivity of human and murine peripheral blood lymphocytes, stem and progenitor cells. *Biochim Biophys Acta*, 1846(1):121-9.

Hu W, Xu S, Yao B, Hong M, Wu X, Pei H, Chang L, Ding N, Gao X, Ye C, Wang J, Hei TK, Zhou G. (2014) MiR-663 inhibits radiation-induced bystander effects by targeting TGFB1 in a feedback mode. *RNA Biol*, 11(9):1189-98.

Hubert P, Jacobs N, Caberg JH, Boniver J, Delvenne P. (2007) The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil? *J Leukoc Biol*, 82(4):781-94.

Hui Z, Yiling C, Wenting Y, XuQun H, ChuanYi Z, Hui L. miR-491-5p functions as a tumor suppressor by targeting JMJD2B in ERalpha-positive breast cancer. (2015) *FEBS Lett*, 589(7):812-21.

Hurley JH, Boura E, Carlson LA, Rozycki B. (2010) Membrane budding. *Cell*, 143:875–87.

Iavello A, Frech VS, Gai C, Deregibus MC, Quesenberry PJ, Camussi G. (2016) Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis. *Int J Mol Med*, 37(4):958-66.

Ilnytsky Y, Zemp FJ, Koturbash I, Kovalchuk O. (2008) Altered microRNA expression patterns in irradiated hematopoietic tissues suggest a sex-specific protective mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 377:41–5.

Irion U, St Johnston D. (2007) Bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. *Nature*, 445:554–558.

Isik Balci Y, Nuray E, Polat A, Enli Y, Ozgurler F, Akın M. (2016) Pentraxin-3 Levels in Beta Thalassemia Major and Minor Patients and Its Relationship With Antioxidant Capacity and Total Oxidant Stress. *J Pediatr Hematol Oncol*, 38(1):12-6.

Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. (1999) Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol*, 162(9):5317-26.

Jacob NK, Cooley JV, Yee TN, Jacob J, Alder H, Wickramasinghe P, Maclean KH, Chakravarti A. (2013) Identification of sensitive serum microRNA biomarkers for radiation biodosimetry. *PLoS ONE*, 8(2):e57603.

Jahns J, Anderegg U, Saalbach A, Rosin B, Patties I, Glasow A, Kamprad M, Scholz M, Hildebrandt G. (2011) Influence of low dose irradiation on differentiation, maturation and T-cell activation of human dendritic cells. *Mutat Res*, 709-710:32-9.

Jella KK, Rani S, O'Driscoll L, McClean B, Byrne HJ, Lyng FM. (2014) Exosomes are involved in mediating radiation induced bystander signaling in human keratinocyte cells. *Radiat Res*, 181:138–45.

Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, MlrzaA, Steinman RM, Nussenzweig MC. (1995) The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is revolved m antigen processing. *Nature (Lond.)*, 375:151-155.

Jiang Y, Chen X, Tian W, Yin X, Wang J, Yang H. (2014) The role of TGF-beta1-miR-21-ROS pathway in bystander responses induced by irradiated non-small-cell lung cancer cells. *Br J Cancer*, 111(4):772-80.

Joiner M, van der Kogel A. (2009) *Basic Clinical Radiation Biology* (Fourth Edition). London UK: Hodder Education. Old: 12, 33, 34, 39, 116.

Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ. (2001) Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*, 2(4):301-6.

Kadhim M, Salomaa S, Wright E, Hildebrandt G, Belyakov OV, Prise KM, Little MP. (2013) Non-targeted effects of ionising radiation--implications for low dose risk. *Mutat Res*, 752(2):84-98.

Kahner BN, Dorsam RT, Kunapuli SP. (2008) Role of P2Y receptor subtypes in platelet-derived microparticle generation. *Front Biosci*, 13:433–439.

- Kajioka EH, Andres ML, Li J, Mao XW, Moyers MF, Nelson GA, Slater JM, Gridley DS. (2000) Acute effects of whole-body proton irradiation on the immune system of the mouse. *Radiat Res*, 153(5 Pt 1):587-94.
- Kamath AT, Henri S, Battye F, Tough DF, Shortman K. (2002) Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood*, 100(5):1734-41.
- Kamiya K, Ozasa K, Akiba S, Niwa O, Kodama K, Takamura N, Zaharieva EK, Kimura Y, Wakeford R. (2015) Long-term effects of radiation exposure on health. *Lancet*, 386(9992):469-78.
- Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KF, Itoh M, Kawashima S, Katayama T, Araki M, Hirakawa M. (2006) From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res*, 34:D354-7.
- Kesminiene A, Evrard AS, Ivanov VK, Malakhova IV, Kurtinaitis J, Stengrevics A, Tekkel M, Anspaugh LR, Bouville A, Chekin S, Chumak VV, Drozdovitch V, Gapanovich V, Golovanov I, Hubert P, Illichev SV, Khait SE, Kryuchkov VP, Maceika E, Maksyoutov M, Mirkhaidarov AK, Polyakov S, Shchukina N, Tenet V, Tserakhovich TI, Tsykalo A, Tukov AR, Cardis E. (2008) Risk of hematological malignancies among Chernobyl liquidators. *Radiat Res*, 170(6):721-35.
- Kim SH, Bianco N, Menon R, Lechman ER, Shufesky WJ, Morelli AE, Robbins PD. (2006) Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive. *Mol Ther*, 13(2):289-300.
- Kis E, Szatmári T, Keszei M, Farkas R, Esik O, Lumniczky K, Falus A, Sáfrány G. (2006) Microarray analysis of radiation response genes in primary human fibroblasts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 66(5):1506-14.
- Knol AC, Nguyen JM, Quéreau G, Brocard A, Khammari A, Dréno B. (2011) Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ T-cell subpopulations in metastatic melanoma. *Exp Dermatol*, 20(5):430-4.
- Komatsu N, Hori S. (2007) Full restoration of peripheral Foxp3+ regulatory T cell pool by radioresistant host cells in scurfy bone marrow chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(21):8959-64. Epub 2007 May 9.

- Kono K, Mimura K, Kiessling R. (2013) Immunogenic tumor cell death induced by chemoradiotherapy: molecular mechanisms and a clinical translation. *Cell Death Dis*, 4:e688.
- Korpela E, Vesprini D, Liu SK. (2015) MicroRNA in radiotherapy: miRage or miRador? *Br J Cancer*, 112:777–82.
- Koster DA, Palle K, Bot ES, Bjornsti MA, Dekker NH. (2007) Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. *Nature*, 448:213–7.
- Koturbash I, Boyko A, Rodriguez-Juarez R, McDonald RJ, Tryndyak VP, Kovalchuk I, Pogribny IP, Kovalchuk O. (2007) Role of epigenetic effectors in maintenance of the long-term persistent bystander effect in spleen in vivo. *Carcinogenesis*, 28:1831–8.
- Koturbash I, Rugo RE, Hendricks CA, Loree J, Thibault B, Kutanzi K, Pogribny I, Yanch JC, Engelward BP, Kovalchuk O. (2006) Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue in vivo. *Oncogene*, 25:4267–75.
- Kraemer A, Anastasov N, Angermeier M, Winkler K, Atkinson MJ, Moertl S. (2011) MicroRNA-mediated processes are essential for the cellular radiation response. *Radiat Res*, 176:575–86.
- Lai L, Azzam KM, Lin WC, Rai P, Lowe JM, Gabor KA, Madenspacher JH, Aloor JJ, Parks JS, Näär AM, Fessler MB. (2016) MicroRNA-33 regulates the innate immune response via ATP binding cassette transporter-mediated remodeling of membrane microdomains. *J Biol Chem*, 291:19651–60.
- Larson MC, Hillery CA, Hogg N. (2014) Circulating membrane-derived microvesicles in redox biology. *Free Radic Biol Med*, 73:214–28.
- Laurent O, Ancelet S, Richardson DB, Hémon D, Ielsch G, Demoury C, Clavel J, Laurier D. (2013) Potential impacts of radon, terrestrial gamma and cosmic rays on childhood leukemia in France: a quantitative risk assessment. *Radiat Environ Biophys*, 52(2):195-209.
- Laurier D, Richardson DB, Cardis E, Daniels RD, Gillies M, O'Hagan J, Hamra GB, Haylock R, Leuraud K, Moissonnier M, Schubauer-Berigan MK, Thierry-Chef I, Kesminiene A. (2017) The International Nuclear Workers Study (Inworks): A

Collaborative Epidemiological Study to Improve Knowledge About Health Effects of Protracted Low-Dose Exposure. *Radiat Prot Dosimetry*, 173(1-3):21-25.

Lee H, Zhang D, Zhu Z, Dela Cruz CS, Jin Y. (2016) Epithelial cell-derived microvesicles activate macrophages and promote inflammation via microvesicle-containing microRNAs. *Sci Rep*, 6:35250.

Lee WC, Wu TJ, Chou HS, Yu MC, Hsu PY, Hsu HY, Wang CC. (2012) The impact of CD4⁺ CD25⁺ T cells in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma. *Surgery*, 151(2):213-22.

Lee WH, Warrington JP, Sonntag WE, Lee YW. (2012) Irradiation alters MMP-2/TIMP-2 system and collagen type IV degradation in brain. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 82:1559–66.

Lento W, Congdon K, Voermans C, Kritzik M, Reya T. (2013) Wnt signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5:a008011.

Li W, Wang G, Cui J, Xue L, Cai L. (2004) Low-dose radiation (LDR) induces hematopoietic hormesis: LDR-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood circulation. *Exp Hematol*, 32:1088–96.

Li W, Wang G, Cui J, Xue L, Cai L. (2004) Low-dose radiation (LDR) induces hematopoietic hormesis: LDR-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood circulation. *Exp Hematol*, 32(11):1088-96.

Li YL, Chang JT, Lee LY, Fan KH, Lu YC, Li YC, Chiang CH, You GR, Chen HY, Cheng AJ. (2017) GDF15 contributes to radioresistance and cancer stemness of head and neck cancer by regulating cellular reactive oxygen species via a SMAD-associated signaling pathway. *Oncotarget*, 8(1):1508-1528.

Liao YP, Wang CC, Butterfield LH, Economou JS, Ribas A, Meng WS, Iwamoto KS, McBride WH. (2004) Ionizing radiation affects human MART-1 melanoma antigen processing and presentation by dendritic cells. *J Immunol*, 173(4):2462-9.

Little JB, Nagasawa H, Li GC, Chen DJ. (2003) Involvement of the nonhomologous end joining DNA repair pathway in the bystander effect for chromosomal aberrations. *Radiat Res*, 159:262–7.

- Little JB. (2003) Genomic instability and radiation. *J Radiol Prot*, 23(2):173-81.
- Liu X, Zhan Z, Xu L, Ma F, Li D, Guo Z, Li N, Cao X. (2010) MicroRNA-148/152 impair innate response and antigen presentation of TLR-triggered dendritic cells by targeting CaMKIIalpha. *J Immunol*, 185:7244–51.
- Liu Y, Xing R, Zhang X, Dong W, Zhang J, Yan Z, Li W, Cui J, Lu Y. (2013) miR-375 targets the p53 gene to regulate cellular response to ionizing radiation and etoposide in gastric cancer cells. *DNA Repair (Amst)*, 12:741–50.
- Lodoen MB, Lanier LL. (2006) Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol*, 18(4):391-8.
- Lorimore SA, Coates PJ, Scobie GE, Milne G, Wright EG. (2001) Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? *Oncogene*, 20:7085–95.
- Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Théry C. (2014) Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, 3:26913.
- Lötvall J, Valadi H. (2007) Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. *Cell Adh Migr*, 1:156–8.
- Lu-Hesselmann J, Messer G, van Beuningen D, Kind P, Peter RU. (1997) Transcriptional regulation of the human IL5 gene by ionizing radiation in Jurkat T cells: evidence for repression by an NF-AT-like element. *Radiat Res*, 148(6):531-42.
- Lumniczky K, Sáfrány G. (2015) The impact of radiation therapy on the antitumor immunity: local effects and systemic consequences. *Cancer Lett*, 356(1):114-25.
- Luo-Owen X, Pecaut MJ, Rizvi A, Gridley DS. (2012) Low-dose total-body γ irradiation modulates immune response to acute proton radiation. *Radiat Res*, 177(3):251-64.

- Ma G, Yasunaga J, Fan J, Yanagawa S, Matsuoka M. (2013) HTLV-1 bZIP factor dysregulates the Wnt pathways to support proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells. *Oncogene*, 32:4222–30.
- Mami-Chouaib F, Echchakir H, Dorothée G, Vergnon I, Chouaib S. (2002) Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human lung carcinoma: identification of a tumor-associated antigen. *Immunol Rev*, 188:114-21.
- Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B. (2003) Pentraxin 3, a non-redundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. *Vaccine*, 21 Suppl 2:S43-7.
- Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldan A. (2010) miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:12228–32.
- Martin CJ, Sutton DG, West CM, Wright EG. (2009) The radiobiology/radiation protection interface in healthcare. *J Radiol Prot*, 29:A1–20.
- Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J. (2015) How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res*, 21(22):5047-56.
- Matsumura S, Demaria S. (2010) Up-regulation of the pro-inflammatory chemokine CXCL16 is a common response of tumor cells to ionizing radiation. *Radiat Res*, 173(4):418-25.
- Matsumura S, Wang B, Kawashima N, Braunstein S, Badura M, Cameron TO, Babb JS, Schneider RJ, Formenti SC, Dustin ML, Demaria S. Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells. *J Immunol*. 2008;181(5):3099-107.
- Meng E, Hanna A, Samant RS, Shevde LA. (2015) The impact of hedgehog signaling pathway on DNA repair mechanisms in human cancer. *Cancers (Basel)*, 7:1333–48.
- Menon N, Rogers CJ, Lukaszewicz AI, Axtelle J, Yadav M, Song F, Chakravarti A, Jacob NK. (2016) Detection of Acute Radiation Sickness: A Feasibility Study in Non-Human Primates Circulating miRNAs for Triage in Radiological Events. *PLoS ONE*, 11(12):e0167333.
- Merrick A, Errington F, Milward K, O'Donnell D, Harrington K, Bateman A, Pandha H, Vile R, Morrison E, Selby P, Melcher A. (2005) Immunosuppressive effects of radiation

on human dendritic cells: reduced IL-12 production on activation and impairment of naive T-cell priming. *Br J Cancer*, 92(8):1450-8.

Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroja-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F. (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*, 2:282.

Mohamood AS, Trujillo CJ, Zheng D, Jie C, Murillo FM, Schneck JP, Hamad AR. (2006) Gld mutation of Fas ligand increases the frequency and up-regulates cell survival genes in CD25+CD4+ TR cells. *Int Immunol*, 18(8):1265-77.

Mole RH, Papworth DG, Corp MJ. (1983) The dose-response for x-ray induction of myeloid leukaemia in male CBA/H mice. *Br J Cancer*, 47(2):285-91.

Moravan MJ, Olschowka JA, Williams JP, O'Banion MK. (2011) Cranial irradiation leads to acute and persistent neuroinflammation with delayed increases in T-cell infiltration and CD11c expression in C57BL/6 mouse brain. *Radiat Res*, 176(4):459-73.

Morgan WF, Sowa MB. (2007) Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation. *Mutat Res*, 616(1-2):159-64.

Mukherjee B, Tomimatsu N, Amancherla K, Camacho CV, Pichamoorthy N, Burma S. (2012) The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 is a potent inhibitor of ATM- and DNA-PKCs-mediated DNA damage responses. *Neoplasia*, 14:34–43.

Mutschelknaus L, Peters C, Winkler K, Yentrapalli R, Heider T, Atkinson MJ, Moertl S. (2016) Exosomes derived from squamous head and neck cancer promote cell survival after ionizing radiation. *PLoS ONE*, 11:e0152213.

Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q. (2012) Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 4146–4151.

Nagasawa H, Little JB. (2002) Bystander effect for chromosomal aberrations induced in wild-type and repair deficient CHO cells by low fluences of alpha particles. *Mutat Res*, 508:121–9.

Nakahara T, Oba J, Shimomura C, Kido-Nakahara M, Furue M. (2016) Early Tumor-Infiltrating Dendritic Cells Change their Characteristics Drastically in Association with Murine Melanoma Progression. *J Invest Dermatol*, 136(1):146-53.

Newton K, Strasser A. (2000) Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling: implications for cancer therapy. *J Exp Med*, 191:195–200.

Nikitaki Z, Mavragani IV, Laskaratou DA, Gika V, Moskvina VP, Theofilatos K, Vougas K, Stewart RD, Georgakilas AG. (2016) Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: a new 'old' paradigm of how the bystanders and distant can become the players. *Semin Cancer Biol*, 3(7–38):77–95.

Nisco SJ, Hissink RJ, Vriens PW, Hoyt EG, Reitz BA, Clayberger C. (1995) In vivo studies of the maintenance of peripheral transplant tolerance after cyclosporine. Radiosensitive antigen-specific suppressor cells mediate lasting graft protection against primed effector cells. *Transplantation*, 59(10):1444-52.

Nocentini G, Riccardi C. (2005) GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol*, 35(4):1016-22.

Nolte-'t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, 't Hoen PA. (2012) Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*, 40:9272–9285.

Nuta O, Darroudi F. (2008) The impact of the bystander effect on the low-dose hypersensitivity phenomenon. *Radiat Environ Biophys*, 47:265–74.

Oida T, Weiner HL. (2010) TGF- β induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. *PLoS ONE*, 5(11):e15523.

Oliveira VG, Caridade M, Paiva RS, Demengeot J, Graca L. (2011) Sub-optimal CD4+ T-cell activation triggers autonomous TGF- β -dependent conversion to Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 41(5):1249-55.

Osipov AN, Pustovalova M, Grekhova A, Eremin P, Vorobyova N, Pulina A, Zhavoronkov A, Roumiantsev S, Klovov DY, Eremin I. (2015) Low doses of X-rays

induce prolonged and ATM-independent persistence of gammaH2AX foci in human gingival mesenchymal stem cells. *Oncotarget*, 6:27275–87.

Pandey R, Shankar BS, Sharma D, Sainis KB. (2005) Low dose radiation induced immunomodulation: effect on macrophages and CD8⁺ T cells. *Int J Radiat Biol*, 81(11):801-12.

Pant S, Hilton H, Burczynski ME. (2012) The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol*, 83: 1484–1494.

Pasi F, Paolini A, Nano R, Di Liberto R, Capelli E. (2014) Effects of single or combined treatments with radiation and chemotherapy on survival and danger signals expression in glioblastoma cell lines. *Biomed Res Int*, 2014:453497.

Pearce MS, Salotti JA, Little MP, McHugh K, Lee C, Kim KP, Howe NL, Ronckers CM, Rajaraman P, Sir Craft AW, Parker L, Berrington de González A. (2012) Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *Lancet*, 380(9840):499-505.

Pefani DE, O'Neill E. (2016) Hippo pathway and protection of genome stability in response to DNA damage. *FEBS J*, 283:1392–403.

Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon C, Celeste A, Nussenzweig A, Bonner WM. (2003) Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol*, 81:123–9.

Pixley FJ, Stanley ER. (2004) CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol*. 2004;14(11):628-38.

Qinfeng S, Depu W, Xiaofeng Y, Shah W, Hongwei C, Yili W. (2013) In situ observation of the effects of local irradiation on cytotoxic and regulatory T lymphocytes in cervical cancer tissue. *Radiat. Res*, 179:584–589.

Qu Y, Jin S, Zhang A, Zhang B, Shi X, Wang J, Zhao Y. (2010) Gamma-ray resistance of regulatory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells in mice. *Radiat Res*, 173(2):148-57.

Raiborg C, Stenmark H. (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 458: 445–452.

- Rastogi S, Coates PJ, Lorimore SA, Wright EG. (2012) Bystander-type effects mediated by long-lived inflammatory signaling in irradiated bone marrow. *Radiat Res*, 177:244–50.
- Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. (2006) Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, 20:1487–1495.
- Razi M, Futter CE. (2006) Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. *Mol Biol Cell*, 17:3469–83.
- Read S, Malmström V, Powrie F. (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*, 192(2):295-302.
- Renzulli JF, Del Tatto M, Dooner G, Aliotta J, Goldstein L, Dooner M, Colvin G, Chatterjee D, Quesenberry P. (2010) Microvesicle induction of prostate specific gene expression in normal human bone marrow cells. *J Urol*, 184:2165–71.
- Reynders K, Illidge T, Siva S, Chang JY, De Ruyscher D. (2015) The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treat Rev*, 41:503–10.
- Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, Agostini M, Bianchini R, Nocentini G, Ayroldi E, Riccardi C. (2004) GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol*, 34(3):613-22.
- Rothkamm K, Horn S. (2009) gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita*, 45:265–71.
- Rothkamm K, Lobrich M. (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:5057–62.
- Roudkenar MH, Halabian R, Bahmani P, Roushandeh AM, Kuwahara Y, Fukumoto M. (2011) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a new antioxidant that exerts its cytoprotective effect independent on Heme Oxygenase-1. *Free Radic Res*, 45(7):810-9.

Rübe CE, Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, Rübe C. (2008) DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res*, 14:6546–55.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3):1151-64.

Sándor N, Schilling-Tóth B, Kis E, Benedek A, Lumniczky K, Sáfrány G, Hegyesi H. (2015) Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) is a potential marker of radiation response and radiation sensitivity. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 793:142-9.

Santangelo L, Giurato G, Cicchini C, Montaldo C, Mancone C, Tarallo R, Battistelli C, Alonzi T, Weisz A, Tripodi M. (2016) The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell Rep*, 17(3):799-808.

Schaue D, Xie MW, Ratikan JA, McBride WH. (2012) Regulatory T cells in radiotherapeutic responses. *Front Oncol*, 2:90.

Schiegnitz E, Kämmerer PW, Rode K, Schorn T, Brieger J, Al-Nawas B. (2016) Growth differentiation factor 15 as a radiation-induced marker in oral carcinoma increasing radiation resistance. *J Oral Pathol Med*, 45(1):63-9.

Schmitz A, Bayer J, Déchamps N, Thomas G. (2003) Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 57(3):769-78.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75(2):163-89.

Schroeder T, Geyh S, Germing U, Haas R. (2016) Mesenchymal stromal cells in myeloid malignancies. *Blood Res*, 51(4):225-232.

Schuler PJ, Harasymczuk M, Schilling B, Saze Z, Strauss L, Lang S, Johnson JT, Whiteside TL. (2013) Effects of adjuvant chemoradiotherapy on the frequency and

function of regulatory T cells in patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res*, 19:6585–6596.

Shankar B, Sainis KB. (2005) Cell cycle regulators modulating con A mitogenesis and apoptosis in low-dose radiation-exposed mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 24(1):33-43.

Shao C, Folkard M, Prise KM. (2008) Role of TGF-beta1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells. *Oncogene*, 27(4):434-40.

Shaposhnikova VV, Korystov YN. (1995) Thymocyte proliferation and apoptosis induced by ionizing radiation. *Scanning Microsc*, 9(4):1203-6.

Shen G, Krienke S, Schiller P, Nießen A, Neu S, Eckstein V, Schiller M, Lorenz HM, Tykocinski LO. (2017) Microvesicles released by apoptotic human neutrophils suppress proliferation and IL-2/IL-2 receptor expression of resting T helper cells. *Eur J Immunol*, 47(5):900-910.

Shevach EM, Thornton AM. (2014) tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev*, 259(1):88-102.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. (2002) Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*, 3(2):135-42.

Shiraki A, Oyama J, Komoda H, Asaka M, Komatsu A, Sakuma M, Kodama K, Sakamoto Y, Kotooka N, Hirase T, Node K. (2012) The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF-alpha-induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis*, 221(2):375-82.

Siva S, MacManus MP, Martin RF, Martin OA. (2015) Abscopal effects of radiation therapy: a clinical review for the radiobiologist. *Cancer Lett*, ;356(1):82-90.

Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry Jr WT, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol*, 10:1470–1476.

- Smalley DM, Sheman NE, Nelson K, Theodorescu D. (2008) Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J Proteome Res*, 7(5):2088–2096.
- Sokolov MV, Smilenov LB, Hall EJ, Panyutin IG, Bonner WM, Sedelnikova OA. (2005) Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene*, 24:7257–65.
- Son CH, Bae JH, Shin DY, Lee HR, Choi YJ, Jo WS, Ho Jung M, Kang CD, Yang K, Park YS. (2014) CTLA-4 blockade enhances antitumor immunity of intratumoral injection of immature dendritic cells into irradiated tumor in a mouse colon cancer model. *J Immunother*, 37(1):1-7.
- Song KH, Kim MH, Kang SM, Jung SY, Ahn J, Woo HJ, Nam SY, Hwang SG, Ryu SY, Song JY. (2015) Analysis of immune cell populations and cytokine profiles in murine splenocytes exposed to whole-body low-dose irradiation. *Int J Radiat Biol*, 91(10):795-803.
- Sproull M, Kramp T, Tandle A, Shankavaram U, Camphausen K. (2017) Multivariate Analysis of Radiation Responsive Proteins to Predict Radiation Exposure in Total-Body Irradiation and Partial-Body Irradiation Models. *Radiat Res*, 187(2):251-258.
- Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. (1997) Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*, 159:4772–4780.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 21:685-711.
- Suffner J, Hochweller K, Kühnle MC, Li X, Kroczeck RA, Garbi N, Hämmerling GJ. (2010) Dendritic cells support homeostatic expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells in Foxp3.LuciDTR mice. *J Immunol*, 184(4):1810-20.
- Sugihara T, Murano H, Nakamura M, Tanaka K. (2013) In vivo partial bystander study in a mouse model by chronic medium-dose-rate gamma-ray irradiation. *Radiat Res*, 179(2):221-31.
- Sultan S, Ahmad S, Rave-Fränk M, Malik IA, Hess CF, Christiansen H, Cameron S. (2016) Induction of Lipocalin2 in a Rat Model of Lung Irradiation. *Int J Mol Sci*, 17(5).

Sultan S, Cameron S, Ahmad S, Malik IA, Schultze FC, Hielscher R, Rave-Fränk M, Hess CF, Ramadori G, Christiansen H. (2013) Serum Lipocalin2 is a potential biomarker of liver irradiation damage. *Liver Int*, 33(3):459-68.

Sun R, Liu Z, Tong D, Yang Y, Guo B, Wang X, Zhao L, Huang C. (2017) miR-491-5p, mediated by Foxi1, functions as a tumor suppressor by targeting Wnt3a/beta-catenin signaling in the development of gastric cancer. *Cell Death Dis*, 8(3):e2714.

Sundstedt A, Celerander M, Eriksson H, Törngren M, Hedlund G. (2012) Monotherapeutically nonactive CTLA-4 blockade results in greatly enhanced antitumor effects when combined with tumor-targeted superantigens in a B16 melanoma model. *J Immunother*, 35(4):344-53.

Sutou S. (2016) A message to Fukushima: nothing to fear but fear itself. *Genes Environ*, 38:12.

Tada N, Tsuno NH, Kawai K, Murono K, Nirei T, Ishihara S, Sunami E, Kitayama J, Watanabe T. (2014) Changes in the plasma levels of cytokines/chemokines for predicting the response to chemoradiation therapy in rectal cancer patients. *Oncol Rep*, 31(1):463-71.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*, 192(2):303-10.

Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, Okabe K, Matsumoto T, Sugi K, Ueoka H. (2012) Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer*, 75(1):95-101.

Tarrade S, Bhardwaj T, Flegal M, Bertrand L, Velegzhaninov I, Moskalev A, Klovov D. (2015) Histone H2AX is involved in FoxO3a-mediated transcriptional responses to ionizing radiation to maintain genome stability. *Int J Mol Sci*, 16:29996–30014.

Tartier L, Gilchrist S, Burdak-Rothkamm S, Folkard M, Prise KM. (2007) Cytoplasmic irradiation induces mitochondrial-dependent 53BP1 protein relocalization in irradiated and bystander cells. *Cancer Res*, 67(12):5872-9.

Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. (2006) Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology*, 117(4):433-42.

Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. (2002) Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol*, 3(12):1156-62. Epub 2002 Nov 11.

Théry C, Ostrowski M, Segura E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9(8):581-93.

Tomandlova M, Jarkovsky J, Tomandl J, Kubkova L, Kala P, Littnerova S, Gottwaldova J, Kubena P, Ganovska E, Poloczek M, Spinar J, Mueller C, Mebazaa A, Pavkova Goldbergova M, Parenica J. (2015) Prognostic value of pentraxin-3 level in patients with STEMI and its relationship with heart failure and markers of oxidative stress. *Dis Markers*, 2015:159051.

Toubi E, Kessel A, Mahmudov Z, Hallas K, Rozenbaum M, Rosner I. (2005) Increased spontaneous apoptosis of CD4⁺CD25⁺ T cells in patients with active rheumatoid arthritis is reduced by infliximab. *Ann N Y Acad Sci*, 1051:506-14.

Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. (2009) GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(32):13445-50.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol*, 9:654–659.

Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, Martínez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. (2013) Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*, 4: 2980.

Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. (2015) DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res*, 43:W460–6.

Wagner-Ecker M, Schwager C, Wirkner U, Abdollahi A, Huber PE. (2010) MicroRNA expression after ionizing radiation in human endothelial cells. *Radiat Oncol*, 5:25.

Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, Unutmaz D. (2009) Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(32):13439-44.

Wang Y, Scheiber MN, Neumann C, Calin GA, Zhou D. (2011) MicroRNA regulation of ionizing radiation-induced premature senescence. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 81:839–48.

Watanabe T, Miyao M, Honda R, Yamada Y. (2008) Hiroshima survivors exposed to very low doses of A-bomb primary radiation showed a high risk for cancers. *Environ Health Prev Med*, 13(5):264-70.

Watson GE, Lorimore SA, Macdonald DA, Wright EG. (2000) Chromosomal instability in unirradiated cells induced in vivo by a bystander effect of ionizing radiation. *Cancer Res*, 60:5608–11.

Wen S, Dooner M, Cheng Y, Papa E, Del Tatto M, Pereira M, Deng Y, Goldberg L, Aliotta J, Chatterjee D, Stewart C, Carpanetto A, Collino F, Bruno S, Camussi G, Quesenberry P. (2016) Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia*, 30:2221–31.

Werthmüller N, Frey B, Rückert M, Lotter M, Fietkau R, Gaipl US. (2016) Combination of ionising radiation with hyperthermia increases the immunogenic potential of B16-F10 melanoma cells in vitro and in vivo. *Int J Hyperthermia*, 32(1):23-30.

Whiteside TL, Mandapathil M, Schuler P. (2011) The role of the adenosinergic pathway in immunosuppression mediated by human regulatory T cells (Treg). *Curr Med Chem*, 18(34):5217-23.

Widlak P, Jelonek K, Wojakowska A, Pietrowska M, Polanska J, Marczak Ł, Miszczuk L, Skłodowski K. (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.

Winerdal ME, Marits P, Winerdal M, Hasan M, Rosenblatt R, Tolf A, Selling K, Sherif A, Winqvist O. (2011) FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. *BJU Int*, 108(10):1672-8.

Wing K, Fehérvári Z, Sakaguchi S. (2006) Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol*, 18(7):991-1000.

Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. (2008) CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science*, 322(5899):271-5.

Wolfe AR, Bambhroliya A, Reddy JP, Debeb BG, Huo L, Larson R, Li L, Ueno NT, Woodward WA. (2016) MiR-33a decreases high-density lipoprotein-induced radiation sensitivity in breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 95:791–9.

Wolff S. (1998) The adaptive response in radiobiology: evolving insights and implications. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 1:277-83.

Wood KJ, Sakaguchi S. (2003) Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol*, 3(3):199-210.

Xu S, Ding N, Pei H, Hu W, Wei W, Zhang X, Zhou G, Wang J. (2014) MiR-21 is involved in radiation-induced bystander effects. *RNA Biol*, 11:1161–70.

Xu S, Ding N, Pei H, Hu W, Wei W, Zhang X, Zhou G, Wang J. (2014) MiR-21 is involved in radiation-induced bystander effects. *RNA Biol*, 11(9):1161-70.

Xu S, Wang J, Ding N, Hu W, Zhang X, Wang B, Hua J, Wei W, Zhu Q. (2015) Exosome-mediated microRNA transfer plays a role in radiation-induced bystander effect. *RNA Biol*, 12:1355–63.

Xu Y, Banerjee D, Huelsken J, Birchmeier W, Sen JM. (2003) Deletion of beta-catenin impairs T cell development. *Nat Immunol*, 4:1177–82.

Yamagami W, Susumu N, Tanaka H, Hirasawa A, Banno K, Suzuki N, Tsuda H, Tsukazaki K, Aoki D. (2011) Immunofluorescence-detected infiltration of CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T cells is relevant to the prognosis of patients with endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 21(9):1628-34.

- Yang J, Yang Y, Fan H, Zou H. (2014) Tolerogenic splenic IDO (+) dendritic cells from the mice treated with induced-Treg cells suppress collagen-induced arthritis. *J Immunol Res*, 2014:831054.
- Yi H, Liang B, Jia J, Liang N, Xu H, Ju G, Ma S, Liu X. (2013) Differential roles of miR-199a-5p in radiation-induced autophagy in breast cancer cells. *FEBS Lett*, 587:436–43.
- Yin X, Tian W, Wang L, Wang J, Zhang S, Cao J, Yang H. (2015) Radiation quality-dependence of bystander effect in unirradiated fibroblasts is associated with TGF-beta1-Smad2 pathway and miR-21 in irradiated keratinocytes. *Sci Rep*, 5:11373.
- Yoon MS, Pham CT, Phan MT, Shin DJ, Jang YY, Park MH, Kim SK, Kim S, Cho D. (2016) Irradiation of breast cancer cells enhances CXCL16 ligand expression and induces the migration of natural killer cells expressing the CXCR6 receptor. *Cytotherapy*, 18(12):1532-1542.
- Yu T, Zuo QF, Gong L, Wang LN, Zou QM, Xiao B. (2016) MicroRNA-491 regulates the proliferation and apoptosis of CD8(+) T cells. *Sci Rep*, 6:30923.
- Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S. (2015) Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 13:17–24.
- Zhang N, Bevan MJ. (2011) CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*, 35(2):161-8.
- Zhou H, Randers-Pehrson G, Suzuki M, Waldren CA, Hei TK. (2002) Genotoxic damage in non-irradiated cells: contribution from the bystander effect. *Radiat Prot Dosimetry*, 99:227–32.
- Zhou Y, Li Y, Ye J, Jiang R, Yan H, Yang X, Liu Q, Zhang J. (2013) MicroRNA-491 is involved in metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibitions of matrix metalloproteinase and epithelial to mesenchymal transition. *Liver Int*, 33(8):1271-80.
- Zhu X, Owen JS, Wilson MD, Li H, Griffiths GL, Thomas MJ, Hiltbold EM, Fessler MB, Parks JS. (2010) Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. *J Lipid Res*, 51:3196–206.

Zhu XM, Han T, Wang XH, Li YH, Yang HG, Luo YN, Yin GW, Yao YQ. (2010) Overexpression of miR-152 leads to reduced expression of human leukocyte antigen-G and increased natural killer cell mediated cytotoxicity in JEG-3 cells. *Am J Obstet Gynecol*, 202(592):e1–7.

10. Saját közlemények jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények:

Bogdándi EN, Balogh A, Felgyinszki N, Szatmári T, Persa E, Hildebrandt G, Sáfrány G, Lumniczky K.. Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation. Radiat Res. 2010 Oct;174(4):480-9.

Balogh A*, Persa E*, Bogdándi EN, Benedek A, Hegyesi H, Sáfrány G, Lumniczky K. The effect of ionizing radiation on the homeostasis and functional integrity of murine splenic regulatory T cells. Inflamm Res. 2013 Feb;62(2):201-12.

Persa E, Balogh A, Sáfrány G, Lumniczky K. The effect of ionizing radiation on regulatory T cells in health and disease. Cancer Lett. 2015 Nov 28;368(2):252-61.

Szatmári T, Kis D, Bogdándi EN, Benedek A, Bright S, Bowler D, Persa E, Kis E, Balogh A, Naszályi LN, Kadhim M, Sáfrány G, Lumniczky K. Extracellular vesicles mediate radiation-induced systemic bystander signals in the bone marrow and spleen. Front Immunol. 2017 Mar;8:347.

Szatmári T*, Persa E*, Kis E, Benedek A, Hargitai R, Sáfrány G, Lumniczky K. Extracellular vesicles mediate low dose ionizing radiation-induced immune and inflammatory responses in the blood. Int J Rad Biol. 2018

* megosztott elsőszerezőség

Más közlemények:

Kis A, Klausz B, Persa E, Miklósi Á, Gácsi M. Timing and presence of an attachment person affect sensitivity of aggression tests in shelter dogs. Vet Rec. 2014 Feb 22;174(8):196.

Klausz B, Kis A, Persa E, Miklósi A, Gácsi M. A quick assessment tool for human-directed aggression in pet dogs. Aggress Behav. 2014 Mar-Apr;40(2):178-88.

11. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, dr. Lumniczky Katinak szeretnék köszönetet mondani, akinek szakmai alázata és széleskörű látásmódja szívemhez közel hozta a sugárbiológia tudományterületét, és aki nélkülözhetetlen segítségemre volt mind a munkámban, mind a disszertációm írásában.

Szeretném megköszönni opponensemnek, dr. Szatmári Tündének a dolgozatom figyelmes áttanulmányozását, kritikai észrevételeit és hasznos, építő jellegű hozzászólásait.

Kivétel nélkül minden jelenlegi és korábbi kollegámnak, Balázs Katának, dr. Balogh Andreának, Benedek Anettnek, Bogdándi Noéminek, dr. Hargitai Ritának, Kis Dávidnak, Kis Enikőnek és Sándor Nikinek hálával tartozom, akik támogatására a munkám és a disszertáció írása során mindig számíthattam.

Szeretnék köszönetet mondani az OSSKI-nak és dr. Sáfrány Géza igazgató főorvos úrnak a tanulmányaimhoz és munkámhoz nyújtott eszközi és anyagi támogatásért, amelyek nélkül ezen értekezés nem jöhetett volna létre.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok családomnak a türelemért és a rám áldozott, sokszor végtelennek tűnő időért.