

Az ionizáló sugárzás hatása az immunrendszerre

Doktori tézisek

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

Bevezetés

Az ionizáló sugárzás biológiai hatásait tekintve determinisztikusak vagy sztochasztikusak. A determinisztikus hatás klinikai tünetekkel jár, egy bizonyos küszöbdózis felett mindig megjelenik, melynek nagysága az egyes szervekre, szövetekre jellemző és azok sugárérzékenységétől függ. A sztochasztikus hatások esetén a hatás kialakulásának valószínűsége az elszenvedett dózis nagyságával arányos, a daganatos incidenciát növeli meg. Ebben az esetben tehát küszöbdózis nincs, elméletileg akár egyetlen sugártalálat is daganat kialakuláshoz vezethet, ezért a sugárvédelem alapvető törekvése a sugárterhelés mértékének az ésszerűen elfogadható legalacsonyabb szintre való szorítása.

A kis dózisok (100 mGy dózis alatti tartomány) hatásainak vizsgálata máig a sugárbiológiai kutatások középpontjában áll. A téma jelentőségét növeli, hogy az elmúlt évek kutatási eredményei alapján a kis dózisu sugárzás hatásai nagyrészt nem a közvetlen, hanem a sugárzás közvetett hatásaiból erednek, vagyis nem csak a sugártalálatot elszenvedett sejten tapasztalhatjuk, hanem annak utódsejtjein, vagy annak közvetlen vagy tágabb környezetében lévő sejteken is. Ezeket a hatásokat a sugárzás nem célzott hatásainak nevezzük: a genom instabilitást és a szomszédsági vagy bystander hatást. A genom instabilitás alatt azt a jelenséget értjük, amikor a sugárzás közvetlenül vagy közvetett módon (szomszéd) érte sejtek egy részében később, akár 40-50 generáció múlva (az utódsejtjeiben) is megnő a spontán mutációk gyakorisága. A bystander hatás esetén a hatást nem a sugártalálatot elszenvedett sejtben, hanem annak közvetlen vagy tágabb környezetében lévő sejtekben tapasztaljuk, és leggyakrabban DNS-károsodásban vagy génexpressziós változásokban manifesztálódik. 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.

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) szerepével a sugárzás-indukálta bystander hatás közvetítésében kevesen foglalkoznak, pedig ideális alanyai lehetnek a bystander hatás szignáljainak sejtek közötti átvitelében. Az EV-k membránnal határolt testek, melyeket a sejtek aktívan bocsátanak ki az extracelluláris térbe, ahonnan más sejtek

felveszik azokat, így kiemelt szerepük van a sejtek közötti örökítőanyag (miRNS, mRNS), valamint proteinek- és lipidek átadásában. Az EV-k tartalma függ a termelő sejt típusától, metabolikus állapotától és az őt ért ingerektől. Szerepüket fiziológiás állapotokban (immunológiai folyamatok, pl. T-sejtek aktiválása, immuntolerancia kiváltása, Treg-ek aktiválása), stresszválasz reakciókban (gyulladás-keltő vagy gyulladás csökkentő hatás, ionizáló sugárzás okozta stressz), valamint patológiás állapotokban (autoimmun vagy daganatos megbetegedések) is leírták. Az EV-k gazdag forrásai a miRNS-eknek. Ezek az evolúciósan konzervált, kicsi (kb. 22 nukleotid hosszú) nem-kódoló RNS-ek a biológiai folyamatok transzkripció és poszttranszkripció szabályozásáért felelősek. A miRNS-k specifikus csomagolása zajlik az EV-kben, ezért az EV-k miRNS-tartalma nem feltétlenül tükrözi az azt kibocsátó sejt miRNS-tartalmát. A miRNS-eket összefüggésbe hozták a sugárzás okozta szöveti válasszal és a sugárzás-indukálta bystander hatás lehetséges közvetítőjeként írták le. A miRNS-ek EV-ken keresztül a besugarazott sejtől a bystander sejtekbe adódnak át, és képesek a sugárzás-okozta bystander hatást közvetíteni *in vitro* rendszerben.

Az immunrendszer feladata, hogy az idegen és a megváltozott saját szerkezeteket felismerje a szervezetben, és ellenük aktív immunválaszt kialakítva elpusztítsa azokat. Az immunválasz első fázisában az idegen sejtek a hivatásos antigénprezentáló dendritikus sejtekkel (DC) kerülnek kapcsolatba. A DC-k sejtfelszínén az antigénfelvételt elősegítő mintázatfelismerő receptorok (pl. TLR4, DEC 205), valamint a T-sejtek aktivációjában részt vevő adhéziós és kostimuláló molekulák (pl. CD40, CD80, CD86), és a T-sejtek gátlásában szerepet játszó fehérjék (pl. B7H1) kifejeződése teszi lehetővé, hogy a DC-k veleszületett részeként az adaptív immunrendszer végrehajtó sejtjeinek működését befolyásolják. A regulátor T-sejtek (Treg) a CD4⁺ limfociták egy egyedi csoportját alkotják, és fontos szerepük van az immunhomeosztázis fenntartásában. A Treg sejtek a tímuszban alakulnak ki, ezeket tímusz eredetű Treg sejteknek (tTreg) nevezzük. Különböző környezeti feltételek mellett (jellemzően TGF β jelenlétében) a Treg sejtek a periférián CD4⁺Foxp3⁺ T-sejtekből is létrejöhetnek, ezeket perifériás, vagy pTreg-eknek nevezzük. A Treg sejtek a DC-vel kapcsolódva az immunválaszban résztvevő T-sejtek gátlásában játszanak szerepet. Ezt több módon tehetik meg: gátló hatású citokineket (IL-10, TGF β)

termelnek, citolízist okoznak, a T-sejt anyagcserezavarát okozzák (pl. IL-2 elvonással, cAMP transzferrel), vagy a DC-k érésének gátlásával.

Célkitűzések

A kis dózisok biológiai hatásairól és ezek (rövid és hosszú távú) egészségügyi következményeiről sokkal kevesebbet tudunk, mint a nagy dózisú sugárzás hatásairól. A téma ma a közegészségügyben kulcsfontosságú a diagnosztikai célú sugárterheléssel járó alkalmazások egyre szélesebb körben való elterjedése miatt. A kis dózisú sugárzás hatásainak felderítése és a létrejöttükért felelős mechanizmusok megértése az utóbbi évtizedekben a sugárbiológia egy forró pontjává vált. Kutatásainkban arra keresünk választ, hogy a kis és nagy dózisú 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 sugárzás-indukálta bystander hatás kialakulásában *in vivo* rendszerben még nem tanulmányozták. Mi erre a hiányra válaszul egy olyan *in vivo* modell dolgoztunk ki, melyben a besugározott egerekből izolált EV-eket intravénásan naív, ún. bystander állatokba oltottuk, és az EV „transzfer” hatását a bystander egerek lépsejtjein mértük. A besugározott egerek csontveléből illetve véréből származó EV-k miRNS tartalmát is elemeztük, és a sugárzás hatására bekövetkező változásokból a szabályozott jelátviteli útvonalakra következtettünk.

Módszerek

Kísérleti állatok és a besugárzás menete

6-12 hetes C57Bl/6 egereket használtunk a kísérletekhez. Az állatokat ketamin-xilazin elegy intraperitoneális (i.p.) injekálásával altattuk el a besugárzás időtartamára. Az állatokat műanyag tárolóban helyeztük el, majd a teljes test besugárzást $^{60}\text{Co-}\gamma$ ill. röntgen-besugárzó készülékkel végeztük. Az egerek életének kíméletes kioltása letális dózisú pentobarbital i.p. adagolásával történt.

Immunsejtek izolálása lépéből, valamint azok jellemzése

Az állatok lépéből a besugárzás után különböző időpontokban egysejtes szuszpenziót készítettünk. A vörösvértesteket eltávolítottuk, és ezt az egysejtes lépsejt szuszpenziót 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 DC sejtek izolálásakor a lépet nem csak mechanikusan roncsoltuk, hanem enzimatisz emésztésnek is alávetettük. Az így kapott lépsejtszuszenzióból a CD11c+ DC sejteket pozitív szelekció elvén, mágneses szeparáció módszerével válogattuk ki.

Az összlépsejtek fenotipusos jellemzését és az egyes alcsoportok egymáshoz viszonyított arányának meghatározását a sejtek felszíni és sejten belüli fehérjéinek azonosításával végeztük. A sejt felszíni fehérjék jelölését a megfelelő specifikus antitestekkel végeztük, monoklonális ellenanyagokat használva. A fluoreszcensen jelölt fehérjék: B7H1, CD3, CD4, CD8, CD11c, CD19, CD25, CD40, CD80, CD86, CTLA4, DEC205, Foxp3, GARP, GITR, IA-b (MHCII), NK1.1. A sejtmagi és citoplazmatikus fehérjék kimutatásához a sejteket permeabilizáltuk. Az immunfenotipizálást FACSCalibur áramlász citométerrel végeztük, és CellQuest szoftverrel értékeltük.

A DNS-károsodások, apoptózis és sejtosztódás mérése

A DNS-károsodások mérését a H2AX hisztonfehérje foszforilációjának kimutatásával végeztük. A besugározott és a bystander állatok lépsejtjein végeztük el a γ H2AX assay-t mind immuncitokémiával, mind áramlász citometriával elévgeztük. A sejteket mindkét módszer során fixáltuk, majd permeabilizáltuk. Blokkoltuk a sejteken az aspecifikus festődést, majd a γ H2AX ellenes elsődleges antitesttel és fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk. Az immuncitometriás festés során a jelölt sejteket tartalmazó fedőlemezeket DAPI-val jelölt fedőanyaggal tárgylemezre tapasztottuk, a kiértékelés pedig fázis-kontraszt mikroszkóppal, 100x-os nagyítású objektívvel történt. Az áramlász citometriás elemzéséhez a γ H2AX+ sejtek arányát áramlász citométerrel határoztuk meg.

Az apoptózis vizsgálatához TUNEL módszert használtunk. Az egysejtes lépszuspenziót a különböző lépsejt alpopulációk jellemzésére szolgáló markerekkel jelöltük, majd fixáltuk, és puffer, dUTP-FITC és TdT enzim oldatelegybe vettük fel. A mintákat áramlásos citométerrel mértük és értékeltük.

A sejtek osztódási kinetikájának kimutatásához a Ki67 intracelluláris proliferációs marker expresszióját mértük áramlásos citométerrel. Az összlépsejt szuszpenziót 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.

Citokin génkifejeződés kimutatása

A lépsejtek citokintermelésének vizsgálatához a lépsejtszuszenzióból illetve az izolált Treg sejtekből RNS-t izoláltunk, majd cDNS készítettünk belőle. Az elkészült cDNS-ből kvantitatív RT-PCR reakciót végeztünk. Az expressziós mintázatot β -aktinhoz normalizáltuk, komparatív C_t módszerrel. A vizsgált citokinek GDF-15, GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, LT β , TGF β , TNF α voltak.

A T- sejtek CFSE jelölése és proliferáció-gátlásának vizsgálata

Azért, hogy megvizsgáljuk, hogy a besugárzás hatására az effektor T-sejtek átalakulnak-e Treg sejtekké, a CD4+CD25- sejteket CFSE fluoreszcens sejtfestéssel jelöltük, majd intravénásan injektáltuk kontroll állatokba. Két csoportunk volt, az egyikben nem besugarazott (0 Gy, kontroll) egerekből izolált T-sejteket, a másikban 2 Gy-el besugarazott állatokból izolált T-sejteket adtunk be az állatoknak. 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.

A Treg sejtek funcionális épségének vizsgálatához T-sejt szuppressziós assay-t végeztünk. Ennek során CD4+CD25- sejteket tenyésztettük együtt 0 Gy vagy 2 Gy dózissal besugarazott egerekből származó CD4+CD25+ Treg sejtekkel. A T-sejt proliferációt a tenyészetbe hozzáadott 1 μ Ci metil- 3 H-timidin beépülésének arányából határoztuk meg, és folyadék-szcintillációs számláló segítségével mértük. A

CD4+CD25- T-sejtek relatív proliferációját %-ban fejeztük ki, ahol a 100% a Treg sejtek nélkül tenyésztett T-sejtek proliferációjának mértéke volt.

DC sejtek antigénfelvételének és –bemutatásának vizsgálata

Az antigén felvételt izolált DC sejteken vizsgáltuk, melyeket mágneses szeparációval különítettünk el. A sejteket egy FITC-jelölt ovalbumin peptid (SIINFEKL) elleni antitesttel inkubáltuk, mostuk és a felvett fehérje mennyiségét áramlásos citométerrel mértük.

Az antigénbemutatás vizsgálatához a sejteket SIINFEKL peptid jelenlétében inkubáltuk. Pufferrel történt egyszeri mosás után a sejteket H2b-SIINFEKL-FITC (MHCI-hez kötött fehérje) antitesttel jelöltük. A festődött / összes sejt arányából következtettünk az antigénfelvétel hatékonyságára.

EV-k izolálása 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 kimostuk a diafizisből. Az így nyert mintából nyertük az egysejtes szuszpenziót, melynek felülúszóját összegyűjtöttük és éjszakán át inkubáltuk ExoQuick oldattal. Másnap a pelletet, vagyis az így nyert EV-t tovább tisztítottuk G-25 oszloppal, hogy az ExoQuick polimerjét eltávolítsuk az EV-szuszenzióból. A plazma EV-ket az Exiqon exoszóma izoláló kit segítségével nyertük a kezelt és kontroll állatok vérplazmájából. A bystander állatok kezelését a következőképpen végeztük: egészséges egerekbe farokvénán keresztül EV-t injektáltunk. Az állatokat 24 óra után leöltük és perifériás vért és lépsejteket gyűjtöttünk be belőlük további vizsgálatokhoz.

A csontvelői és plazma EV-k miRNS profiljának meghatározása

A miRNS profil meghatározásához a csontvelői EV-ket az ExiqonServices céghez küldtük elemzésre. A cég végezte az RNS-izolálást, a miRNS profil felvételét PCR reakció segítségével és az adatok kiértékelésének első fázisát is elkészítette. 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 0,1 Gy és 2 Gy mintákban megtalálható, eltérően expresszáldó miRNS-ek lehetséges biológiai szerepének elemzéséhez a DIANA-miR-Path szoftvert használtuk. A program a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) és a Gene Ontology (GO) jelátviteli útvonal adatbázisokkal összevetve határozza meg a miRNS-ek által szabályozott lehetséges jelátviteli útvonalakat.

Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzést Student t-tesztel végeztük GraphPad Prism 5 programmal. Az adatok szignifikánsak, ha $p < 0,05$.

Eredmények

Sugárzás-indukálta sejtszámváltozások és apoptózis lépsejteken

Elsőként azt vizsgáltuk, hogy az akut kis és nagy dózisú besugárzás hogyan befolyásolja a lépsejt alpopulációk arányát a besugárzás utáni különböző időpontokban. Az alábbi lépsejt alpopulációkat tanulmányoztuk: CD3+CD4+ helper (segítő) T-sejtek, CD3+CD8+ citotoxikus T-sejtek, CD4+CD25+ Treg sejtek, NK sejtek, CD11c+ DC sejtek és CD19+ B-sejtek. Egy nappal a 0,01 Gy dózisú besugárzás után sejtszám növekedést figyeltünk meg az összlépsejteken, és a legtöbb vizsgált lépsejt alpopulációban is hasonló volt a tendencia. Nagyobb dózisokkal (0,05 Gy – 0,5 Gy) történő besugárzás után dózisfüggő csökkenést mértünk az összlépsejteken, és ez a változás hasonló volt az NK, a B- és a Treg sejtekben is. A 2 Gy besugárzás jelentős sejtszám csökkenést idézett elő valamennyi lépsejt alpopulációban, 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. A besugárzást követő harmadik napra a lépsejtszám elérte a minimumát, 0,05 Gy dózisú besugárzás kb. 25%-kal csökkentette az összlépsejtek számát, és az nem változott 0,1 Gy és 0,5 Gy 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 túlérzékenységre utalhat kis dózis hatására. A CD4+, a CD8+ és a B-sejtek száma hasonló tendenciát mutatott, dóziszfüggően csökkent a kis dózisok tartományában. A besugárzás utáni napon tapasztalt különbségek 2 Gy besugárzás után még a harmadik napon is fennálltak. A legrezisztensebbnek a Treg sejtek, az NK sejtek és a DC-k bizonyultak. Hét nappal a besugárzás után a lépsejtek száma csekély mértékben változott ahhoz képest, amit a besugárzást követő harmadik napon tapasztaltunk, 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 sejtszám emelkedés volt tapasztalható a besugárzás előtti sejtszámok irányába.

Az egyes lépsejt alpopulációk eltérést mutattak a besugárzás utáni sejtszám-csökkenés mértékében, ezért a továbbiakban megvizsgáltuk a lépsejt alpopulációk apoptózisát. A lépsejteket a besugárzás után 4 órával izoláltuk, és közvetlenül használtuk fel az apoptózis vizsgálatához. Az egyes sejtpopulációk spontán apoptózisa jelentős eltéréseket mutatott. A CD4+ és CD8+ sejtek spontán apoptózisa hasonló volt az összlépsejtekéhez, viszont a B-sejteké sokkal alacsonyabb, míg az NK sejteké, Treg sejteké és DC sejteké sokkal magasabb 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. Érdekes megfigyelés, hogy a CD8+ és B-sejtek populációjában már 0,05 Gy dózisú besugárzás után is enyhén emelkedett az apoptózisos sejtek aránya. Nagyobb dózisú (0,5 Gy – 2 Gy) besugárzás következtében a legtöbb vizsgált populációban megnőtt az apoptózis. Két Gy besugárzás után az összlépsejtek majdnem negyede elpusztult. A B-sejtek bizonyultak a legérzékenyebbek, a CD4+ T-sejtek, Treg sejtek és CD8+ sejtek rezisztensebbek voltak az összlépsejtekhez képest, és az NK és a DC sejtek pusztultak a legkevésbé a kontrolhoz képest.

Az eredmények azt mutatták, 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. A

CD4+Foxp3+ (Treg) sejtek apoptotikus rátáját 2 Gy dózisú egésztest besugárzás után 4 órával, 1 nappal és 3 nappal is meghatároztuk, hogy az apoptózis időbeli változásából a fenti arányra magyarázatot találjunk. A Treg sejtek és a CD4+ T-sejtek apoptózis kinetikája is eltérő volt: az összlépsejtek relatív apoptózis maximuma 4 órával, a CD4+ sejtek mindkét alpopulációjában egy nappal a besugárzás után volt. A besugárzás után 3 nappal a Treg-ek apoptózisa ismét elérte a kontroll szintet, míg a CD4+ T-sejtek esetében ez még nem történt meg. 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. A nagyfokú limfopénia után a sejtek homeosztatikus osztódása biztosítja a sejtszám helyreállítását a szervezetben. Az egyenlőtlen mértékű osztódás szerepet játszhat a limfocita populációk időleges arányváltozásaiban is. A CD4+Foxp3- effektor T-sejtek és a CD4+Foxp3+ Treg sejtek proliferációs rátája közötti különbség vizsgálatokkor azt tapasztaltuk, hogy 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.

Citokin génexpresszió megváltozása sugárzás hatására

A besugárzott egerek lépsejtjeiből RNS-t izolálva meghatároztuk a citokin génexpressziós profiljukat. A vizsgált citokinek között a Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ , LT- β és TNF- α) és a Th2 (IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β), valamint hematopoetikus növekedési faktor jellegűek (GM-CSF, IL-5) is voltak. Vizsgáltuk továbbá a GDF15 expressziójának a változását a sugárzás hatására. 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 a nagy dózisú változásokhoz képest. IFN- γ és az IL-2 expresszió csökkent kis dózisú besugárzás után, és nőtt 2 Gy besugárzás után minden vizsgálati időpontban. Az IL-12 expresszió csökkent kis dózis és nőtt nagy dózis hatására a besugárzás után 4 órával, 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 dózisfüggő 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. Kettő Gy dózis után azonban kétfázisú görbét mutatott: 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.

Treg sejtek funkcionális változása 2 Gy 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 besugárzás után 3 nappal, a CTLA-4, a GARP és a GITR molekuláét. A CTLA-4 molekulát kifejező Treg sejtek aránya 2 Gy besugárzás hatására majdnem kétszeresére emelkedett. A GARP és a GITR fehérje szintje is megnőtt a Treg sejteken a besugárzás hatására. Ezek azt mutatják, hogy 2 Gy besugárzás hatására mérsékelten megnőtt az aktivációs markerek expressziója a Treg sejteken.

A T-sejt gátlásban résztvevő sejtfelszíni markereken kívül a Treg sejtek több olyan citokint is kifejeznek, melyeknek a szuppressziós fenotípus fenntartásában jelentőségük van. Ezek közül mi az IL-10 és a TGF β citokinek expressziós változását vizsgáltuk 2

Gy besugárzás hatására izolált Treg sejtekben. Az IL-10 mRNS-expresszió besugárzás hatására enyhe emelkedést mutatott. A TGF β expresszió besugárzás után változatlan maradt az alapszinthez képest. Az eredményeink alapján a Treg sejtekben csak az IL-10 citokin expressziójában lehet eltérés besugárzás után, bár ez a különbség relatív kicsi, és nem feltétlenül tükrözi a szekretált citokin mennyiségének aktuális változását.

A Treg sejteknek a T effektor sejtek proliferációját gátló képességét *in vitro* funkcionális tesztekkel vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a besugározott állatból származó Treg sejtek kevésbé tudták csökkenteni a proliferáló T-sejtek arányát, mint a kontroll állatból származók. Ez a szignifikáns szuppressziós kapacitás-csökkenés arra utal, hogy a 2 Gy besugárzás kárt tesz a Treg sejtek funkcionális épségében.

DC-k funkcionális változása 2 Gy besugárzás hatására

Az érett egér lép DC-kre jellemző a CD80, CD86 és CD40 molekulák expressziója, mely aktiváció hatására fokozódik. Kis dózisu besugárzás után a receptorok kifejeződése nem változott, kivétel ez alól a 0,25 Gy besugárzás után tapasztalt enyhe emelkedés a CD80 szintjében, illetve a DEC205 markert kifejező DC-k mennyiségének kismértékű csökkenése. A T-sejt válasz kiváltásában szerepet játszó kostimulációs fehérjék 2 Gy besugárzás hatására a DC populáció nagyobb részének felszínén expresszáldtak. A T-sejt válasz gátlásában részt vevő B7-H1 marker kifejeződése a besugárzás hatására megemelkedett a sejteken. Megvizsgáltuk, hogy a DC-k antigénfelvevő és –bemutató képességére is hatással van-e a besugárzás. Azt találtuk, hogy 0,1 Gy besugárzás után a DC-k kevesebb jelölt OVA peptidet vettek fel, mint a kontroll sejtek. A nagy dózisu besugárzás nem változtatta meg a sejtek antigénfelvevő képességét. A 0,25 Gy besugárzás a kontrollhoz (0 Gy) képest csökkentette az DC-k antigénbemutató képességét 1 nappal besugárzás után. Ezek az eredmények logikus összhangban állnak azzal, amit a sejt felszíni DEC205 fehérje kifejeződésének változásával kapcsolatban tapasztaltunk 0,25 Gy dózisu besugárzás után: a DEC205 szintje csökkent, míg az antigén bemutató képesség (ennek megfelelően) visszaesett a kontrollhoz képest. A nagy dózisu (2 Gy) besugárzás után nem láttunk szignifikáns különbséget.

EV transzfer megváltoztatta a lépsejtek arányát

A limfociták számának változását és a limfocita alpopulációk (CD4+ és CD8+ T-sejtek, CD19+ B-sejtek, NK-sejtek és DC-k) osztódási képességét vizsgáltuk az EV recipiens állatokban. Jelentős bystander hatást mértünk ki a CD4+ és CD8+ T-sejt populációkban, a B-sejtek és NK-sejtek esetén viszont nem. A 2 Gy besugárzás után minden vizsgált populációban csökkent az osztódási arány. A sejtek proliferációs rátáját önmagában az EV transzfer (vagyis a 0 Gy állatokból izolált EV oltása) nem változtatta meg. A 2 Gy-el besugározott egerekből származó EV-kel oltott bystander állatokban a változás hasonló volt a direkt besugározott állatokban tapasztaltakhoz, de sokkal kisebb mértékű. A fent vizsgált limfocita alpopulációkkal ellentétben a DC-k száma nem csökkent a bystander állatokban egyik dózis után sem. A TLR4 fehérje kifejeződés a DC-k felszínén a 2 Gy közvetlen besugárzás után megnőtt, ugyanakkor meglepő módon a bystander állatokban jelentős mértékben csökkent a TLR4+ DC-k aránya, és ez a csökkenés a dózissal nem volt összefüggésben.

In vivo EV transzfer hatására megnőtt a lépsejteken a γ H2AX fókuszok aránya

A közvetlenül besugározott egerekben dózistól függően nőtt a γ H2AX fókuszok száma. A bystander állatokban, szintén megnőtt a fókuszok száma és a γ H2AX-pozitív sejtek aránya is, jóllehet kisebb mértékben, mint a közvetlen besugározott állatok lépsejtjeiben, és nem mutatott egyenes összefüggést a dózis nagyságával. 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 bystander hatás már kis dózisoknál is megfigyelhető.

EV transzfer megváltoztatta a vérben lévő fehérjék arányát

A vizsgált 105 protein közül, melyek között citokinek, kemokinek, növekedési faktorok találhatók meg, 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. Működését tekintve a legtöbb megváltozott fehérje a kemokinek vagy kemokin ligandok közül került ki. A változás kismértékű volt, csak néhány fehérje esetén haladta meg a 2-szeres csökkenést vagy növekedést.

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

A kontroll egerek csontvelő eredetű EV-iből átlagosan 500 miRNS-t tudtunk azonosítani mintánként. Nem találtunk olyan miRNS-t, ami jellemzően a sugárzás 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 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 összehasonlítva pedig 90 miRNS eltérő expresszióját azonosítottuk. Ezen kívül 8 miRNS-t találtunk, ami a 0,1 Gy és 2 Gy besugárzás után is változott: öt miRNS expressziós szintje csökkent, három miRNS expressziós szintje pedig nőtt. Ezen miRNS-ek szintjének változása dóziszfüggő volt.

A plazmából izolált EV-kben 174 miRNS-t azonosítottunk, ami minden mintában jelen volt, ezek közül legalább 1,3-szoros eltérést 7 ill. 11 miRNS-t mutatott a 0,1 Gy ill. a 2 Gy mintában.

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 jeláviteli útvonalakban szerepelnek. Azokat a miRNS-eket vizsgáltuk meg részletesebben, melyek a 0,1 Gy és 2 Gy besugárzás után is megváltozott mennyiségben voltak jelen a csontvelőből izolált EV-kben (ilyenből 8 volt) a KEGG és a GO adatbázisok összevetésével. A GO adatbázis alapján a 8 miRNS-sel összefüggésben talált útvonalak a sejtdifferenciáció, metabolikus folyamatok, sejt növekedés, motilitás és sejthalállal kapcsolatosak voltak. A KEGG adatbázist használva a sugárzás kiváltotta sejten belüli válasszal, a DNS-javító mechanizmusokkal, valamint a hematopoetikus rendszerrel kapcsolatos jeláviteli útvonalakat azonosítottunk.

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 dózisu besugárzás hatására megjelenik a plazma EV-kben, mégis 26 közös útvonalat tudtunk beazonosítani, többek között az

akut mieloid leukémia (AML), TCR jelátvitel, mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK), TGF β , FoxO, Hippo jelátviteli útvonalakat.

Következtetések

- elsőként írtuk le szisztematikusan, hogy a kis és nagy dózisú *in vivo* besugárzás hogyan változtatja meg az egyes lépsejt alpopulációk sugárzérzékenységét egér modellen
 - *in vivo* kis dózisú besugárzás jelentős hatással van az egér lépsejtekre
 - kis és nagy dózisú besugárzás hatására más-más mechanizmusok aktiválódnak, különböző jelátviteli szignálokön keresztül hat
 - nagy dózisok: gyors sejtszám csökkenés, a regeneráció még hét nappal a besugárzás után is tart
 - 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 dózisú besugárzás hatására megnő a CD4⁺ lépsejteken belüli aránya, mely valószínűleg a kismértékű apoptotikus rátájának és jobban megtartott proliferációs készségének köszönhető
 - másrészt azonban a besugárzott 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-kből 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

Saját közlemények jegyzéke

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 Radiat Biol. 2018 Mar 29:1-11.

* megosztott elsőszerzőség