

A kis dózisu ionizáló sugárzás biológiai hatásai, az egyéni érzékenység szerepe a sugárhatásban

A pályázat keretein belül arra kerestünk választ, hogy kis dózisok hatására milyen folyamatok alakulnak ki a sejtekben, és hogy az egyéni sugárérzékenység hogyan befolyásolja a sugárhatásra kialakuló károsodásokat. Vizsgálataink során a molekuláris biológia, immunológia legmodernebb eszköztárait használtuk fel.

Primer emberi fibroblaszt sejteket tartalmazó sejtbank kialakítása

Egy korábbi OTKA pályázat keretein belül megkezdett munkát folytatva kezdetben bőrbioptiás mintát gyűjtöttünk daganatos betegekből és primer fibroblaszt sejt kultúrákat alakítottunk ki (engedélyszám: 6008/1/ETT/2002). Jelenleg közel 100 primer fibroblaszt kultúrával rendelkezünk. Sugárérzékenységük tanulmányozására a fibroblaszt sejteket 2 Gy Co-gamma sugárzással kezeltük és kolónia képző assay-vel meghatároztuk a túlélő sejtek arányát (SF2 frakció). A fibroblasztok SF2 értéke a 11-48% tartományba esik, és normál megoszlást mutat. Az átlagérték 29%, 8%-os standard eltérés mellett. Ennek alapján a 20-35%-os SF2 tartományba tartozó sejteket normál sugárérzékenységűnek, a 20% alatti SF2 értékkel rendelkező sejteket sugárérzékenyek, és a 35%-ot meghaladó SF2-vel rendelkező sejteket pedig sugár-rezisztensnek tekintjük. Az így kialakított és sugárérzékenység szempontjából jellemzett sejtbank a tudományos közösség rendelkezésére áll (9).

Különböző sugárérzékenységű sejtekben kialakuló DNS károsodások, DNS repair különbségek

Tanulmányoztuk, hogy a különböző sugárérzékenységű fibroblasztokban eltérő-e a sugárhatásra keletkező DNS károsodások mennyisége, illetve, hogy a sejtek DNS repair kapacitása befolyásolja-e sugárérzékenységüket. A fibroblasztokat kis (0,2 Gy) és nagy (2 Gy) dózissal sugárztuk be és egy-sejt elektroforézis assay-vel (komet assay) követtük az egy, illetve a kétláncú DNS sérülések kialakulását, javítását. Egyik esetben sem találtunk a normáltól való jelentős eltérést ezért ez irányban a továbbiakban nem folytattuk vizsgálatainkat. A repair folyamatok további vizsgálata során azt vettük észre, hogy ionizáló sugárzás hatására aktiválódik a sejteken belül a dezoxicitidin kináz (dCK) enzim, amely egyik feladata a dezoxiribonukleotid-prekursorok folyamatos utánpótlásának a biztosítása. Megfigyeléseink szerint a dCK aktiválódása csak nagy dózisok (>2 Gy) hatására következik be, és a dCK szint változtatása arra is felhasználható, hogy a sejtek sugárérzékenységét fokozzuk, és ezzel együtt a sugárterápia hatásfokát javítsuk. E témából az OTKA pályázatra való hivatkozással megjelent egy közleményünk (1).

Transzkripciósváltozások primer fibroblaszt sejtekben

A továbbiakban azt tanulmányoztuk, hogy milyen egyéni szintű transzkripciósváltozások következnek be besugárzott sejtekben. Vizsgálatainkhoz a teljes emberi genomot lefedő (42400 gén) oligo-DNS chip-et használtunk (Az összes mikroarray vizsgálatot a Semmelweis Egyetem, Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai Intézetének (tanszékvezető: Prof. Dr. Falus A.) a mikroarray laboratóriumában végeztük. Megvizsgáltuk normál (7 primer

emberi fibroblaszt kultúra), és sugárérzékeny (3 primer fibroblaszt kultúra) sejtek génexpressziós változásait 2 Gy gamma besugárzás hatására. Megállapítottuk, hogy normál sugárérzékenységgű fibroblasztokban besugárzás hatására 109 gén expressziója növekedett, és 115 gén működése csökkent. A fokozott sugárérzékenységgű fibroblasztokban 144 gén működése fokozódott, míg 56 gén expressziója csökkent. A normál és a fokozottan sugárérzékeny sejtekben sugárhatásra bekövetkező változásokat összehasonlítva megállapítottuk, hogy 28 gén működése fokozódott, kettő pedig csökkent mindkét sejt-típusban. Ezen ún. konszenzus sugárválasz gének közel 60%-a tartozott a DNS károsodásra válaszoló, a sejtciklust és növekedést szabályozó, valamint a programozott sejthalál csoportba. A gének jelentős részének a transzkripcióját a p53 gén befolyásolja. Véleményünk szerint a konszenzus sugárválasz gének alapvető szerepet játszhatnak a sugárhatásra bekövetkező sejtválaszban, kóros működésük jelentősen növelheti a sejtek sugárérzékenységét. Azon gének, amelyek működése vagy csak a normál, vagy csak a fokozottan sugárérzékeny sejtvonalakban változott meg, valószínűleg nem létfontosságúak a sejtek túlélése szempontjából, de szerepet játszhatnak az egyéni sugárérzékenységben. A normál és a sugárérzékeny sejtek alapszintű (nem sugárhatásra bekövetkező) gén-expresszióját összehasonlítva megállapítottuk, hogy sugárérzékeny sejtekben 60 gén működése fokozódott, míg 150 gén expressziója csökkent. Ezek a gének szintén szerepet játszhatnak az egyéni sugárérzékenységben.

A transzkripció szintű sugárreakciók mélyebb analizésére a konszenzus sugárválasz gének közül kiválasztottunk hetet (*CDKN1A*, *GADD45A*, *PLK3*, *IER5*, *CYR61*, *TP53INP1*, *GDF15*), és valós idejű polimeráz láncreakcióval tanulmányoztuk dózis- és időfüggő transzkripció változásait két emberi, primer fibroblaszt sejtvonalon. Az egyik sejtvonalon (N1) egy idős beteg bőrbioptiás mintájából, a másik (F11) egy fiatal gyerek orvosi indikáció alapján, körülmételéssel eltávolított fitymájából került kialakításra. Ez lehetővé tette annak vizsgálatát is, hogy az egyének életkora befolyásolja-e sugárhatásra bekövetkezett génszintű válaszreakciójukat. A transzkripció válasz időfüggésének tanulmányozására az N1 és F11 sejtvonalkat 2 Gy γ -sugárzással kezeltük, majd különböző időpontokban (1, 2, 6 és 24 óra) a sejtekből RNS-t izoláltunk. A génaktivitás időbeni változásait kvantitatív RT-PCR-el követtük nyomon. N1 sejtekben a *CDKN1A*, *GADD45A*, *PLK3* és *IER5* gének transzkripciója a besugárzás után gyorsan nőtt (2 óráig), majd 6 órával a besugárzás után visszaesett egy még mindig megemelkedett (*CDKN1A*, *GADD45A*), vagy a kontrollhoz közeli (*IER5*, *PLK3*) szintre. 24 órával a besugárzás után az említett négy gén aktivált állapotban volt. A *CYR61* gén expressziója 6 órával a besugárzás után még gátolt állapotban volt, de érdekes módon 24 órával a besugárzás után enyhe aktivációt találtunk. F11 fibroblaszt sejtekben a tanulmányozott gének az N1 sejtekhez hasonlóan viselkedtek.

A transzkripció változások dózisfüggésének vizsgálatára az N1 és F11 sejteket különböző dózissal (0,04; 1; 2 és 8 Gy) sugárzással kezeltük, majd a sejtekből két óra elteltével izoláltuk az RNS-eket. Az alkalmazott sugárdózisoknak igen különböző hatása van a sejtekre. Nyolc Gy sugár-dózist gyakorlatilag elenyésző számú sejt fog túlélni. Egy és 2 Gy dózissal besugárzás hatására a fibroblasztok 30-90%-a elpusztul. 40 mGy dózissal nincs jelentős sejtpusztító hatása. N1 sejtekben a *CDKN1A* gén expressziója az összes alkalmazott sugárdózis hatására aktiválódott, maximumát 1 Gy körül érte el. A *PLK3* gén már 40 mGy sugárdózis hatására közel maximális szintre nőtt, és ezen a szinten maradt az összes sugárdózisnál. Az *IER5* és a *GADD45A* gének a maximális szintet 2 Gy-nél érték el. A *CYR61* gén működését a besugárzás dózisfüggően gátolta. Az F11 fibroblasztok sugárhatásra változó gén-expressziós mintázata igen hasonló volt az F11 sejtekéhez. A témából az OTKA pályázatra való hivatkozással megjelent egy közlemény (2).

Permanens sejt kultúra kialakítása primer emberi fibroblasztokból

A primer fibroblasztokkal való munkát igen megnehezíti, hogy csak korlátozott ideig tarthatók fent sejt kultúrában. Irodalmi adatok szerint a primer sejt vonalak immortalizálhatók a telomeráz gén stabil transzfekciójával. Dr. MP. Lansdorptól (University of British Columbia, USA) sikerült egy olyan plazmidot beszerezni, amely az emberi telomeráz (hTERT) gént és a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) génjét tartalmazza. A plazmid alkalmas retrovírus vektorok kialakítására is. A plazmid segítségével Fly13 sejtekből sikerült egy pakoló sejt vonal kialakítása, amely folyamatosan termeli a hTERT és GFP kódoló retrovírusokat. A retrovírus vektorral különböző sugárérzékenységgű primer fibroblaszt sejt vonalakat fertőztünk meg. A vektor transzdukciós hatásfoka meglehetősen alacsony volt, a fibroblaszt sejteknek csak 1-2%-a hordozta a GFP marker gént. Ezért áramlási citométerrel kiválogattuk és tovább tenyésztettük a GFP tartalmú sejteket. A sejtekből RNS-t izoláltunk, majd valós idejű PCR-el bizonyítottuk, hogy a sejtek kifejezik a hTERT gént. Jelenleg öt olyan hTERT pozitív fibroblaszt sejt vonallal rendelkezünk, amely hTERT pozitív és közel egy éve folyamatos tenyésztésben van. Ez arra utal, hogy valóban sikerült a sejteket immortalizálni. Némely esetben az eredeti primer sejt vonalat már el is veszítettük.

A továbbiakban azt tanulmányoztuk, hogy a hTERT gén bevitelével immortalizált sejt vonalak sugárreakciói mennyire felelnek meg a primer sejtek reakcióinak. Először a sejtek sugárérzékenységét hasonlítottuk össze. Lényeges különbségeket nem találtunk a primer és a hTERT pozitív fibroblasztok között. Ezt követően kiválasztottunk 2-2 sugárérzékeny (S1, S3), valamint normál (F11, N1) sejt vonalat és 7 konszenzus sugárválasz gént (*CDKN1A*, *GADD45A*, *CYR61*, *GDF15*, *TP53INP1*, *PLK3* and *IER5*). Valós idejű PCR-el tanulmányoztuk, hogyan alakul a gének alapszintű transzkripciója primer és hTERT pozitív sejt vonalakban. Azt találtuk, hogy az négy gén (*GADD45A*, *CYR61*, *PLK3* és *IER5*) esetében megegyezik. Három gén (*GDF15*, *TP53INP1*, *CDKN1A*) esetében a hTERT pozitív sejtekben a gén-expresszió mintegy fele volt a primer sejtekének. Ezt követően a nevezett 7 gén sugárdózis-függő (10, 40, 100 mGy, 2 és 8 Gy) válaszreakcióit követtük 2 órával a besugárzást követően. Nem találtunk lényeges különbséget a primer és a hTERT pozitív sejtek között. Érdekes módon négy gén (*GDF15*, *CYR61*, *CDKN1A*, *TP53INP1*) működését a kis dózisok is befolyásolták. Az eredményekből egy kézirat született (3).

Az ionizáló sugárzás genom instabilitást okozó és bystander hatása

A sugárbiológia klasszikus dogmája szerint az elsődleges sejtben belüli célpont a DNS. Amennyiben a sejtek hiba nélkül kijavítják a károsodásokat, akkor további kockázattal nem kell számolni. Az eredménytelen, vagy hibás javítás a sejt halálához, vagy mutációk kialakulásához vezet. A sejt szintű következmények minden esetben hamar megfigyelhetők, vagy magában a sugársérülést szenvedett sejtben, vagy annak közvetlen utódaiban. Újabban azonban bebizonyosodott, hogy az egészségesnek látszó sejtekben, kezdetben kimutathatatlan, hosszú távú következmények is kialakulhatnak. A sugársérülést szenvedett sejtek egy részének az utódaiban, akár 40-50 generációval később, ugrásszerűen megnő a spontán mutációk gyakorisága, vagyis az ionizáló sugárzás a genom instabilitását okozza. Munkánk során különböző sugárérzékenységgű fibroblaszt sejtekben tanulmányoztuk az ionizáló sugárzás genom instabilitást okozó hatását. A genom instabilitás következtében kialakuló mutációk egy része letális a sejtek számára. A letális mutációk úgy követhetők nyomon, hogy a besugárzás után mintegy 3-4 héttel meghatározzuk a túlélő sejtek klonogenitását. Ezt 13 különböző sugárérzékenységgel bíró primer sejt vonal esetében tettük meg 4 Gy besugárzást követően. Jelentős különbségeket kaptunk a genom instabilitásra való hajlamban az egyes

sejtvonalak között, de nem találtunk összefüggést a sejtek sugárérzékenységgel. A klonogén assayval sajnos csak nagy dózisok hatása mérhető. Ezért megpróbáltunk olyan metodikát kialakítani, amellyel a kis dózisok esetleges genom instabilitást okozó hatása is kvantitatív módon mérhető. Úgy gondoltuk, hogy a letális mutációk következtében apoptózis is kialakulhat a sejtekben és ez jól mérhető áramlási citométerrel. Két különböző detektálási technikát alkalmaztunk (kaspáz aktiváció, DNS létra kialakulás mérése), de sajnos sugárzás indukálta apoptózist nem tudtunk kimutatni primer fibroblaszt sejtekben (HeLa sejtekben kimutatható volt a sugárzás indukálta apoptózis). Az új irodalmi adatok is azt mutatják, hogy primer fibroblaszt sejtekben besugárzás hatására nem alakul ki apoptózis, a sejtek ehelyett senescence-be mennek át, vagyis leállítják osztódásukat. A kis dózisok genom instabilitást okozó hatásának mérésére tovább keressük az alkalmas metodikát. Jelenleg úgy tűnik, hogy a mitokondriális DNS-ben kialakuló mutációk mérése jó eredményeket adhat.

Az apoptózis vizsgálatok kezdetével egy időben úgy gondoltuk, hogy tanulmányozzuk az antiapoptotikus gének sugárválaszt befolyásoló hatását. Ezért kialakítottunk olyan adenovirális vektorokat, amelyek lehetővé teszik antiapoptotikus gének (Bcl2, Bcl_{XL}, bFGF) nagyhatásfokú bejuttatását fibroblaszt sejtekbe. Az adenovírus vektorok segítségével 1-1 sugárérzékeny és normál fibroblaszt sejtvonalba juttattuk be a nevezett géneket, majd klonogén assayval mértük a sejtek túlélését 4 Gy besugárzást követően. Az antiapoptotikus gének bevitele nem befolyásolta a sejtek túlélését. A vizsgálatokat nem folytattuk, mivel besugárzás hatására nem tudtunk apoptózist kimutatni fibroblaszt sejtekben. A kialakított vektorokat azonban egy kollaborációs munkában felhasználtuk (4), de az OTKA pályázatra a más jellegű téma miatt nem történt hivatkozás.

Hosszú ideig úgy gondolták, hogy a sugárzás következményeivel csak a közvetlenül sugártalálatot szenvedett sejtekben kell számolni. A sugársérült sejtek azonban kommunikálnak a közvetlen és a távoli környezetükben lévő sejtekkel. Ezekben, az úgynevezett bystander sejtekben is kimutathatóak különböző hatások, pl. sejthalál, vagy mutációk, de a bystander hatás pozitív is lehet. A bystander hatások egy részéhez szükséges lehet a sugártalálatot szenvedett és a bystander sejtek közvetlen kontaktusa, más esetben azonban a sejtek által kiválasztott oldható anyagok közvetítik a bystander hatást. A pályázat keretein belül különböző sugárérzékenységgű (F11 és S1) primer és hTERT pozitív fibroblaszt sejtekben tanulmányoztuk, hogy a genetikai háttérben megnyilvánuló különbségek hogyan befolyásolják a kis dózisok bystander hatását. A mérésekre két különböző metodikát alkalmaztunk. Az első eljárásban (együtt tenyésztési eljárás) a donor sejteket olyan sejtkultúra edényre oltottuk ki, amely az alján egy vizet és kis molekulású anyagokat átteresztő membránt tartalmazott. A sejteket különböző dózisokkal (10, 40, 100 és 500 mGy, 2 Gy) besugaraztuk, majd a membránon lévő sejteket rögtön besugarazatlan recipiens sejtek fölé helyeztük. A második eljárásban (médiüm csere eljárás) a donor sejteket normál tenyésztő edényre oltottuk, besugaraztuk őket, majd 2 órával később a besugarazott sejteken lévő médiümot besugarazatlan recipiens sejtekre helyeztük. A hatás nyomon követésére mind a közvetlenül besugárzott sejtekben, mind pedig a bystander recipiens sejtekben mértük a mikronukleuszok gyakoriságát. Mivel az ionizáló sugárzás jelentős mértékben befolyásolhatja a fibroblaszt sejtek osztódó képességét is ezért ezt is vizsgáltuk az úgynevezett binukleáris sejtek nyomon követésével.

Közvetlen sugársérülést szenvedett F11 (normál sugárérzékenység) sejtekben a binukleáris sejtek aránya jelentősen csökkent 500 mGy dózis felett. A sugárérzékeny S1 sejtekben a binukleáris sejtek aránya már kisebb dózisoknál is megfigyelhető volt, érdekes megfigyelés a 40 mGy dózisonál előforduló hiperszenzitivitás. A mikronukleuszok gyakorisága 100 mGy felett kezdett emelkedni besugárzott sejtekben és gyakoribb volt a sugárérzékeny fibroblasztokban. Sem a binukleáris sejtek arányát, sem pedig a mikronukleusz gyakoriságot nem befolyásolta a hTERT gén jelenléte.

Bystander sejtekben nagy dózisok hatására sem változott a binukleáris sejtek aránya. A mikronukleuszok gyakorisága már 10-40 mGy dózis hatására nőtt az együtt tenyésztési eljárással mind a normál, mind pedig a sugárérzékeny sejtekben. Magasabb dózisok hatására nem nőtt tovább a mikronukleuszok gyakorisága. A médium csere eljárással hasonló, bár némileg kisebb mértékű mikronukleusz gyakoriság fokozódást figyeltünk meg. Az adatok azt mutatják, hogy a bystander hatást fibroblasztok esetében a médiumba bekerülő anyagok közvetítik. Az is bizonyítottnak tekinthető, hogy a bystander hatás már kis dózisoknál is maximális intenzitással jelenik meg. Jelenleg nem ismert, hogy mi közvetíti a bystander hatást. A hatásmechanizmus tisztázásánál érdekes lehet, hogy a korábban ismertetett gén-expressziós vizsgálataink során azt találtuk, hogy már kis sugárdózisok hatására is nő a sejtekben a GDF15 termelés. A GDF15 egy a TGF β családba tartozó, a sejtek által kiválasztott citokin. Szerepét további vizsgálatokkal kívánjuk tisztázni.

A bystander hatás vizsgálatáról egy közleményt szeretnénk a közeljövőben megjelentetni. Emellett meg szeretnénk említeni, hogy a 2006-ban, az OTKA pályázatra való hivatkozással jelent meg egy összefoglaló közleményünk, amelyben az ionizáló sugárzás és a daganatellenes génterápia bystander hatásainak mechanizmusait, összefüggéseit elemeztük (5).

Kis dózisok hatására bekövetkező génszintű változások közvetlen sugársérülést szenvedett és bystander sejtekben

A korábbiakban láttuk, hogy hagyományos metodikai eljárásokkal (pl. mikronukleusz assay) a kis dózis tartományokban (< 100 mGy) nem, vagy csak nehezen mérhető az ionizáló sugárzás biológiai hatása. Emellett az sem ismert, hogy milyen sejten belüli utak aktiválódnak kis dózisú besugárzás következtében. A jelátviteli utak megismerésének a céljából, és jobb biodozimetriai eljárások kifejlesztésének az érdekében tanulmányoztuk a kis dózisok hatására bekövetkező transzkripciós reakciókat. Primer fibroblaszt sejteket 10, 100 és 500 mGy kobalt gamma-sugárzással kezeltünk, majd 2 órával később RNS-t izoláltunk. A transzkripciós változásokat a teljes genomot lefedő mikroarray-vel követtük. 10, 100 és 500 mGy besugárzás hatására 1414, 847 és 1119 gén működése változott meg. Százhuszonnégy olyan gént azonosítottunk, amely mindhárom sugárdózis esetén megváltoztatta működését. Ezen gének között egy olyan található (CCDC51), amelyet 2 Gy besugárzást követően korábban a konszenzus sugárválasz gének közé soroltunk. A csak az 500 mGy hatására változó transzkripciójú gének közül 9 tartozott a konszenzus sugárválasz gének közé.

A következőkben bystander sejtekben tanulmányoztuk a génextpressziós változásokat. Fibroblaszt sejteket 10, 40, 100 és 500 mGy dózissal kezeltünk, majd 2 órával később begyűjtöttük a médiumot a besugárzott sejtekről és nem besugarazott sejtekre helyeztük át. A transzkripciós változások követésére az RNS-t 2 óra múlva izoláltuk a sejtekből. Bystander sejtekben 655, 406, 152 és 619 gén működése változott 500, 100, 40 és 10 mGy hatására. 15 olyan gént találtunk, amely minden dózis hatására megváltoztatta működését bystander sejtekben.

A mikroarray vizsgálatok alapján 10 gént választottunk ki és dózis, valamint idő-függő transzkripciójukat valós idejű polimeráz láncreakcióval követtük. Az eredmények alapján 1 közlemény megírás alatt áll (6).

A kis dózisok immunrendszerre gyakorolt hatásai

A közelmúltban több közlemény jelent meg arra vonatkozóan, hogy már kis sugárdózisok jelentősen befolyásolhatják az immunrendszer működését. Az immunrendszeri

hatások egy része akár pozitív is lehet, mivel aktiválhatja a daganatellenes immunválaszt. Ezt nagy dózisok esetében saját vizsgálataink nem tudták megerősíteni. Munkánk során egér glioma (G1261) sejteket 2 Gy ^{60}Co γ -sugárzással kezeltünk és tanulmányoztuk, hogy a besugárzás megváltoztathatja-e a daganatsejtek immunogenitásában szerepet játszó molekulák (MHCI, MHCII, B7-1, B7-2) expresszióját. Adataink szerint sem az MHCI, MHCII, sem pedig a B7-1 és B7-2 molekulák transzkripciója nem változott. Ezen adatokat tartalmazó közleményünk az OTKA pályázatra való hivatkozással megjelent (7). Megkezdtük az ionizáló sugárzás közvetlenül az immunrendszerre gyakorolt hatásának tanulmányozását is. Egereket különböző dózissal (20 mGy, 100 mGy, 1 és 2 Gy) egésztest besugárzásnak vetettünk alá. Ezt követően az állatokra egér glioma sejteket (G1261) transzplantáltunk, és nyomon követtük a daganat növekedését. Érdekes módon azt figyeltük meg, hogy a 20-100 mGy egésztest besugárzás hatására jelentősen lecsökkent a G1261 daganat növekedése.

A hatásmechanizmus pontos tisztázása, az immunrendszer érintett sejtjeinek azonosítása érdekében eddig az alábbi vizsgálatokat végeztük: C57Bl6 egereket 10, 50, 100, 500 mGy, 1, 2 és 4 Gy egésztest besugárzásnak vetettünk alá. 1, 3 és 7 nappal a besugárzás után az állatok lépéből limfocitákat izoláltunk. Megállapítottuk, hogy már 100 mGy sugárdózis hatására jelentősen csökkent a lépsúly a besugárzás utáni 1. és 3. napon. Az 1 Gy feletti dózisok kivételével a 7. nappal a lépsúly visszaállt a kontroll értékre. A perifériális limfocita szám csökkenése 50-100 mGy dózis hatására volt megfigyelhető 1-3 nappal a besugárzást követően. Kis dózisok esetén 7 nap után a sejtszám rendeződött. Az egyes limfocita alpopulációkat nyomon követve megállapítottuk, hogy 1 nappal a 10-100 mGy besugárzást követően nőtt a CD4+ és CD8+ sejtek száma. A Treg, DC és B sejtek száma 1 nap után jelentősen csökkent a 10-100 mGy tartományban. E sejtek száma kevésbé csökkent 500 mGy körül, ami kis dózisok iránti hiperérzékenységre utal. NK sejtek esetében a kis dózisú hiperérzékenység 3 nappal a besugárzást követően volt megfigyelhető. Nagy dózisú besugárzást követően a Treg és NK sejtek regenerációja gyorsabban bekövetkezett, mint az egyéb sejtéké.

Tanulmányoztuk az egyes limfocita alpopulációk sugárzás gerjesztette apoptózis iránti érzékenységét. Az apoptózist mind a TUNEL, mind pedig a kaszpáz-3 aktiváción alapuló módszerrel tanulmányoztuk áramlási citométer segítségével. A TUNEL módszerrel általában magasabb értékeket kaptunk. Ez azt mutatja, hogy az immunrendszer sejtjeinek egy része besugárzás hatására a kaszpáz-3 útvonaltól eltérő apoptotikus utakat használ. Az összlímocita populációt tekintve 4 órával a besugárzás után csak 500 mGy feletti dózisok indukáltak apoptózist. Hasonló folyamat volt megfigyelhető CD8+ és Treg sejtek esetében is. DC és NK sejtekben az apoptózis jelentős fokozódása csak 1 Gy felett volt megfigyelhető.

Tanulmányoztuk besugárzott egerekből származó splenociták nem specifikus (concanavalinA) stimulusra való válaszreakcióit is. Egy nappal a besugárzást követően a limfociták proliferatív képessége 40%-al csökkent 100 mGy hatására. Magasabb dózisoknak még kifejezettebb hatása volt. Három nappal a besugárzás után az 50 mGy besugárzás hatása jóval kifejezettebb volt a limfocita proliferációra, ami kis dózisú hiperérzékenységre utal. Hét nappal a besugárzást követően a proliferáció gátlása már csak nagy dózisoknál (>1 Gy) volt megfigyelhető. Eredményeinkből egy közlemény megírás alatt áll (8).

Elkészült és megírás alatt álló publikációk

1. T. Szatmári, G. Huszty, S. Désaknai, T. Spasokoukotskaja, M. Sasvári-Székely, Mária Staub, Olga Ésik, G. Sáfrány and K. Lumniczky. (2008) Adenoviral vector transduction of the human deoxycytidine kinase gene enhances the cytotoxic and radiosensitizing effect of gemcitabine on experimental gliomas. *Cancer Gene Ther.* 15: 154-164. Impact factor: 4,187
2. E. Kis, T. Szatmári, M. Keszei, R. Farkas, O. Ésik, K. Lumniczky, A. Falus, G. Sáfrány (2006) Microarray analysis of radiation response genes in primary human fibroblasts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 66. 1506-14. Impact factor: 4,556
3. Benedek A., Kis E., Hegyesi H., Lumniczky K. and Sáfrány G. Low dose radiation-induced transcriptional alterations in primary and immortalised human fibroblast cells. *Submitted*
4. Gál A, Szilágyi G, Wappler E, Sáfrány G, Nagy Z. Bcl-2 or Bcl-XL gene therapy reduces apoptosis and increases plasticity protein GAP-43 in PC12 cells. *Brain Res Bull.* 76: 349-53. 2008. Impact factor: 1.684
5. K. Lumniczky and G. Sáfrány (2006) Cancer gene therapy: combination with radiation therapy and the role of the bystander cell killing in the anti-tumor effect. *Pathol Oncol Res.* 12. 118-124. Impact factor: 1,162
6. Hegyesi H., Benedek A., Kis E., Lumniczky K. and Sáfrány G.: Microarray analysis of low dose radiation-induced transcriptional alterations in directly irradiated and bystander cells. *MS in preparation*
7. T. Szatmári, K. Lumniczky, S. Désaknai, S. Trajcevski, EJ. Hídvégi, H. Hamada, G. Sáfrány. (2006) Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for glioblastoma therapy. *Cancer Science*, 97. 546-553. Impact factor: 3,829
8. E. Bogdándi, T. Szatmári, A Balogh, G. Sáfrány, K. Lumniczky: Low dose ionizing radiation-induced immune alterations in mice. *MS in preparation*

Az OTKA pályázatban résztvevők által készített értekezések

9. Sáfrány G. Az ionizáló sugárzás sejt és molekuláris szintű hatásainak vizsgálata: daganatkezelés és terápiás alkalmazások. MTA Doktora értekezés, 2007 (sikeresen megvédve 2008-ban) OTKA pályázat anyagának felhasználása: 15 %
10. Kis Enikő. Ionizáló sugárzás hatására kialakuló génszintű elváltozások emberi fibroblaszt sejtekben. PhD értekezés 2008. *megírás alatt* OTKA pályázat anyagának felhasználása: 100 %
11. Szatmári T. Agydaganatos egerek kombinált kezelése sugárterápiával és génterápiával. PhD értekezés 2008. *házi védés alatt.* OTKA pályázat anyagának felhasználása: 70 %