



Országos Onkológia Intézet



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Sugárérzékenység mérése cervix tumoros betegekben, a RILA módszer finomhangolása

TDK dolgozat

Készítette: **Tar Andrea-Viktória**

III. éves biomérnök hallgató

Témavezetők:

Dr. Sándor Gyöngyvér Orsolya sugárbiológus

Országos Onkológia Intézet, Sugárterápiás Központ, Klinikai Sugárbiológiai és
Onkocitogenetikai Osztály

Dr. Jurányi Zsolt osztályvezető főorvos

Országos Onkológia Intézet, Sugárterápiás Központ, Klinikai Sugárbiológiai és
Onkocitogenetikai Osztály

Belső Témavezető:

Dr. Sveiczter Ákos egyetemi docens

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és
Élelmiszertudományi Tanszék

BME, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, 2023.

Tartalomjegyzék

1	Rövidítésjegyzék:	3
2	Bevezetés.....	7
3	Irodalmi áttekintés.....	8
3.1	Sugárbiológia:	8
3.2.	Az ionizáló sugárzás:.....	9
3.3.	Ionizáló sugárzások biológiai hatása:	9
3.4.	Sugárterápia:.....	10
3.4.1.	Teleterápia (Távolsugárkezelés):.....	11
3.4.2.	Brachyterápia (Belső sugárkezelés):	12
3.4.3.	Sugárérzékenység.....	13
3.5.	A DNS károsodások észlelése és javítása:	15
3.6.	A sejthalál:.....	18
3.7.	A CD4 ⁺ és a CD8 ⁺ T-limfociták.....	21
3.8.	Áramlási citometria (FACS).....	22
3.9.	A méhnyakrák (carcinoma cervicis uteri).....	23
3.10.	Radiation Induced Lymphocyte Apoptosis (RILA)	25
4.	Célkitűzések	27
5.	Vizsgálati módszerek	28
5.1.	A kutatásban résztvevő betegcsoport:	28
5.2.	A citrullin méréshez szükséges minták előkészítése:	28
5.3.	RILA (Radiation Induced Lymphocyte Apoptosis) mérés:.....	29
5.4.	Mellékhatások nyomonkövetése	30
6.	Eredmények.....	31
6.1.	RILA értékek meghatározása cervix tumoros betegek esetében	31
6.2.	RILA mérés beállítása	32
6.3.	RILA módszer egyszerűsítése	32
6.4.	Mellékhatások nyomon követése	35
7.	Összefoglalás.....	37
8.	Irodalmijegyzék.....	39
9.	Függelék.....	45
9.1.	RILA mérés laboratóriumi eljárás lépései:.....	45
9.2.	EMBRACE kérdőív	47
9.3.	EORTC QLQ-C30 kérdőív.....	51
9.4.	EORTC QLQ-CX24 kérdőív.....	53
10.	Köszönetnyilvánítás	55

1 Rövidítésjegyzék:

¹⁰³**Pd**: palládium-103 izotóp

¹²⁵**I**: jód-125 izotóp

¹⁴**C**: szén-14 izotóp

¹⁹²**Ir**: irídium-192 izotóp

¹⁹⁸**Au**: arany-198 izotóp

²²**Na**: nátrium-22 izotóp

²³⁵**U**: urán-235 izotóp

²³⁸**U**: urán-238 izotóp

²⁴**Na**: nátrium-24 izotóp

3D: 3 dimenziós

³**H**: trícium

⁴⁰**K**: kálium-40 izotóp

⁶⁰**Co**: kobalt-60 izotóp

⁹⁰**Sr**: stroncium-90 izotóp

AL: after loading (utántöltés)

AmCyan: bright cyan fluorescent protein isolated from the coral reef organism Anemonia majano (Anemonia majano-ból származó cián fluoreszcens fehérje)

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated (ataxia telangiectázia mutáns fehérje)

ATR: ATM and RAD3-related (az ATM fehérjével rokonságban álló fehérje)

bFGF: basic Fibroblast Growth Factor (fibroblaszt növekedési faktor)

Bid: pro-apoptotic protein of the Bcl-2 family (a Bcl-2 családhoz tartozó pro-apoptotikus fehérje)

BSA: Bovine Serum Albumin (szarvasmarha szérum albumin)

Cdk: Cyclin dependent kinase (ciklin függő kináz)

CO₂: szén-dioxid

CT: Computed Tomography (komputertomográfia)

CtIP: C-terminal interacting protein

CTV: Clinical Target Volume (mikroszkópikus terjedésű tumor)

DMSO: Dimethyl Sulfoxide (dimetil-szulfoxid)

DNS: dezoxiribonukleinsav

DNS-PKcs: DNS-protein kinase catalytic subunit (DNS-fehérje kináz katalitikus alegysége)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (etilén-diamin-tetraecetsav)

ELISA: Entzyme-linked immunosorbent assay (enzimhez kötött immunszorbens vizsgálat)

EMBRACE II: Image guided intensity modulated External beam radiochemotherapy and MRI based adaptive BRAchytherapy in locally advanced Cervical cancer II (Képvezérelt intenzitásmodulált külső sugárzású radiokemoterápia és MRI-alapú adaptív brachyterápia lokálisan előrehaladott méhnyakráknál II)

EORTC-Cx24: European Organization for Research and Treatment of Cancer – Cervical Cancer Module 24 (Európai Rákkutatási és Rákkezelési Szervezet - Méhnyakrák-modul 24)

EORTC-QoL-C30: European Organization for Research and Treatment of Cancer- Quality of Life - Cervical Cancer Module 30 (Európai Rákkutatási és Rákkezelési Szervezet - Életminőség – Méhnyakrákmodul 30)

EXO1: exonuclease 1 (exonukleáz 1)

FACS: Flow cytometry (áramlási citometria)

Fas: fatty acid synthase (zsírsav szintáz)

FBS: Fetal bovine serum (fötális borjúsavó)

FITC: fluorescein isothiocyanate (fluoreszcein-izocianát)

FITC: fluorescein isothiocyanate (fluoreszcens izocianát)

FSC: forward scatter (előre irányuló fényszórás)

G₁: az első nyugalmi fázis a sejtcikluson belül

G₂: a második nyugalmi fázis a sejtcikluson belül

GI: gastrointestinal (gasztrointesztinális)

GTV: Gross Tumor Volume (makroszkópikus terjedésű tumor)

GU: genitourinary (genitourinális)

Gy: Gray (az elnyelt dózis mértékegység)

Hepes: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (ikerionos szulfonsav pufferanyag)

HPV: Humán Papilloma Vírus

HR: Homologous Recombination (homológ rekombináció)

IGRT: Image Guided Radiation Therapy (képvezérelt sugárterápia)

Ku: fehérje

Ku70: a Ku fehérje alkotója

Ku80: a Ku fehérje alkotója

Li-heparin: lítium-heparin

LINEAC: Linear Accelerator (lineáris részecskegyorsító)

M: mitózis

MHC I: Major Histocompatibility Complex I. (fő hisztokompatibilitási komplex I.)

MHC II: Major Histocompatibility Complex II. (fő hisztokompatibilitási komplex II.)

MHC: Major Histocompatibility Complex (fő hisztokompatibilitási komplex)

MRI: Magnetic Resonance Imaging (mágneses rezonancia vizsgálat)

MRN: MRE11-RAD50-NBS1 complex ontributes to the detecion and repair of DNA damge

NHEJ: Non-Homologous End Joining (nem homológ DNS végeket összekapcsoló javító mechanizmus)

NK: Natural Killer (természetes ölősejtek)

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell (perifériás vér mononukleáris sejtejei)

PBS: Phosphate-buffered saline (foszfát pufferelt sóoldat)

PE: Phycoerythrin (fikoeritrin)

PET: Positron Emission Tomography (pozitron emissziós tomográf)

PI: propidíum jodid

RAD51: homológ rekombinációban résztvevő rekombináz

RILA: Radiation Induced Lymphocyte Apoptosis (sugárzás indukált limfocita apoptózis)

RNase: ribonuclease (ribonukleáz)

ROS: Reactive oxygen species (reaktív oxigén gyökök)

rpm: revolutions per minute (percenkénti fordulatszám)

RPMI: Roswall Park Memorial Institute medium (sejttenyésztéshez használt médium)

RTG: Röntgen

S: szintézis fázis a sejtciklusban

SSC: side scatter (oldalirányú fényszórás)

SSD: Source-Surface Distance

Sv: Sievert (dózisegyenérték vagy ekvivalens sugárzási dózis métekegység)

T_c: cytotoxic T cell (citotoxikus T-sejt)

TCR: T-cell receptor (T-sejt receptor)

T_h: helper T cell (segítő T-sejt)

UH: ultrahang

XFL: XRCC4-like factor (röntgensugaras javító keresztkomplementer fehérjéhez hasonló faktor)

XRCC4: X-ray repair cross-complementing protein 4 (röntgensugaras javító keresztkomplementer fehérje 4)

2 Bevezetés

A sugárterápia régóta alkalmazott módszer a tumorok gyógyítására (Allen, Her and Jaffray, 2017), sajnos azonban ennek a kezelésnek is vannak mellékhatásai (Dilalla *et al.*, 2020). A betegek 5-10%-ban pedig súlyos mellékhatásokat okoz, ezért régóta kutatnak olyan markerek után, amelyek segítségével a kezelés előtt meg lehetne mondani, hogy valaki sugárérzékeny-e (Talbot *et al.*, 2019) (Lapierre *et al.*, 2022). Erre jelenthet megoldást a Radiation Induced Lymphocyte Apoptosis (RILA), ami ígéretes és egyszerű klinikai módszernek tűnik a sugárérzékenység kimutatására. A módszer lényege, hogy perifériás vérből vizsgáljuk a sugárzás hatására apoptotózissal elpusztult CD8⁺ és CD4⁺ limfociták számát. Elsőre logikátlanak tűnik, de a nagy RILA érték alacsony kockázatot jelent a sugárkezelés következtében létrejövő késői mellékhatások kialakulására, amíg a kis RILA értékkel rendelkező betegeknél könnyebben alakulnak ki késői mellékhatások. Ez azzal magyarázható, hogy a nagy RILA értékkel rendelkező betegek limfocitái nagyobb mértékben pusztulnak el apoptotózissal a sugárkezelés hatására, és kisebb mértékben lesznek szeneszcens sejtek, míg a kis RILA értékkel rendelkező betegeknél ez pont fordított arányban van (Lapierre *et al.*, 2022).

A méhnyakrák világszerte az egyik vezető tumoros megbetegedés a nők körében, ami többségében HPV fertőzés következtében alakul ki. A vírus hatására a normál epithél sejtek tumorossá válnak. Sajnos még mindig kevés nő kapja meg a HPV elleni védőoltást, így még ma is problémát jelent az infekció, és annak következménye. A metasztatizáló méhnyakrák már gyógyíthatatlan, de a korán diagnosztizált tumor még kezelhető (Shen *et al.*, 2020). A kezelésnek fontos része a sugárterápia, ami azonban súlyos mellékhatásokat okozhat, amelyek a betegek életminőségét nagy mértékben csökkenthetik (Fernandes and Andreyev, 2021).

Kutatócsoportunk sugárbiológiai vizsgálatokkal foglalkozik, így célunk volt egy olyan módszer kidolgozása, amellyel könnyen és gyorsan megállapíthatjuk még a kezelés előtt, hogy valaki sugárérzékeny-e. Mivel a méhnyakrákos betegeknél gyakori a sugárterápiás kezelés, és sokszor súlyos mellékhatások alakulnak ki esetükben, így ezt a betegcsoportot választottuk először, hogy a RILA módszert beállítsuk laborunkban és tovább egyszerűsítsük. Dolgozatomban ennek munkafolyamatát és eredményeit mutatom be. Reméljük eredményeinkkel sikerül egy olyan vizsgálatot kidolgozni, amit más laborok is átvehetnek majd, és így meg tudnánk könnyíteni ezeknek a betegeknél a kezelés utáni életüket.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 Sugárbiológia:

Bizonyítottnak 1895-től beszélhetünk sugárzáshoz kötődő tudományokról (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 2-18. old.). Több tudós is végzett sugárzással kapcsolatos kísérleteket, mint például Henri Becquerel, Thomas Edison, Pierre Curie, Marie Curie és Wilhelm Conrad Röntgen, aki az egyik legnagyobb áttörést fedezte fel akkoriban az ő általa X-sugárzásnak elnevezett katódsugárcsőből eredő sugárzást, ami a gammasugárzáshoz hasonló az elektromágnesessége miatt, de ettől jóval kisebb energiájú és nagyobb hullámhosszúságú sugárzás (Nias and Nias, 1998) (Nias and Nias, 1998, 1-2. old.). Már 1896-ban el is végezték az első terápiás célú sugárkezelést (Allen, Her and Jaffray, 2017) (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 2-18. old.) (Kálmán, Sztanyik and Unger, 1963, 11-16. old.).

Ahogy fejlődtek az ionizáló sugárzással kapcsolatos kutatások, mind a természetes eredetű, mind a mesterséges sugárzás esetében egyaránt bebizonyosodott, hogy a sugárzásnak erős szövetkárosító hatása is van (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 2-18. old.). Az első sugárkezelések után egyre több betegnél jelentkeztek a sugárzást követően fekélyek, illetve bőrpír keletkezett a bőrfelületen, így elsősorban a testfelszínen látható szövetkárosodásokkal kezdtek el foglalkozni, de hamarosan rájöttek, hogy az ionizáló sugárzás nem csak a felszínen tud károsítani, hanem adott esetben a test mélyében lévő szöveteket is, sőt daganatkeltő hatása is lehet (Joiner and Kogel, 2018) (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 2-18. old.) (Kálmán, Sztanyik and Unger, 1963, 11-17. old.) (Joiner and Kogel, 2018, 1-3. old.). Ezért szabályozásokat kellett bevezetni, arra vonatkozóan, hogy a sugárzás kedvező terápiás hatásai mellett a káros hatásokat minimalizálni lehessen. Ennek megoldására az első felvetések közé tartozott az expozíciós idő (az az idő, amíg az adott személy sugárforrásnak van kitéve) rövidítése, ami mai napig használt módszer. Létrejöttek bizottságok, amelyek sugárvédelmi javaslatokat tettek, az ionizáló sugárzással dolgozók védelmére, ilyen volt a dózis korlát, illetve a film alapú személyi doziméter (a doziméter célja a mérhető, illetve számolható sugárzási viszonyok alapján becsülni a várható károsodást, továbbá annak kockázatát; maga a doziméter nagyon kicsi, a praktikus okokból kifolyólag, hogy munka közben is magukon tudják hordani a dolgozók) bevezetése (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 2-18. old.) (Kanyár, 2005). Akkoriban az első javaslatok a dózis korlátra 2 mSv volt naponta, amit mára 100 mSv 5 évre módosítottak (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 2-18. old.).

3.2. Az ionizáló sugárzás:

Ionizáló sugárzásnak nevezünk minden sugárzást, mely képes elektromos töltésű részecskéket létrehozni semleges közegben. Élő és élettelen anyaggal is kölcsönhatásba tud lépni, ha részecskeenergiája elegendő ahhoz, hogy alkotóelemeit ionizálja. Eredetük szerint a sugárforrások lehetnek: természetes és mesterséges források (National Research Council (U.S.), 1990, 9-26. old.) (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 20-24. old.) (Kálmán, Sztanyik and Unger, 1963, 17-38. old.) . Természetes eredetű sugárforrások az elsődleges kozmikus sugarak, amelyek kiindulópontjuk alapján lehetnek galaktikusak (a naprendszeren kívüli tér), illetve szolárisak (Napból eredőek). Előfordulnak köztük alfa-részecskék, röntgen-fotonok, másodlagos részecskék, amelyek további radioaktív elemeket tudnak képezni (^3H , ^{22}Na , ^{24}Na , ^{14}C), és vannak földi eredetű radioizotópok is (^{40}K , ^{238}U , ^{235}U) (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 20-24. old.) (Bornemisza and Pávó, 2012). A mesterséges sugárforrások közül az orvosi sugárforrások az egyik legjelentősebbek, és ezek jelentik a legnagyobb terhelést a lakosság számára. Orvosi sugárforrások lehetnek:

- **röntgendiagnosztikai vizsgálatok** (röntgenfelvételek, komputertomográfiás vizsgálatok (CT))
- **izotópdiagnosztikai** (pozitron emissziós tomográf (PET))
- **radiofarmakonok** (radioaktív izotópgenerátorok, radionukleotid tartalmú készítmények).

A mesterséges sugárforrások közé tartoznak még egyes ipari tevékenység (izotópok ipari felhasználása, nukleáris energiatermelés, és a nem nukleáris energiatermelés) (White and Mallya, 2012).

Az élő szervezetekhez viszonyítva helyzetük alapján pedig lehetnek külső- vagy belső sugárforrások. Ezt főként a terápiáknál szokták elkülöníteni: a teleterápia során külső sugárforrást alkalmaznak, míg a brachyterápia során pedig belső sugárforrást (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 24-29. old.).

3.3. Ionizáló sugárzások biológiai hatása:

Az ionizáló sugárzások biológiai hatását többféle szempontból tanulmányozhatjuk. Első sorban, azt vizsgáljuk, hogy kit érintett a sugárzás. Ezt egy példán keresztül mutatom be: a szomatikus, illetve genetikus biológiai hatás esetében, terhesség esetében ha az anyát érint egy biológiai hatás azt szomatikusnak nevezzük, de ha a születendő gyereket érinti akkor genetikus

biológiai hatásnak nevezzük (Bornemisza and Pávó, 2012). Ezt követően a szomatikus egyedeket idő szempontjából tovább vizsgáljuk, hogy mikor érhette őket sugárzás. Akut vagy korai hatásnak nevezzük, ha azonnal, a kezelés alatt, vagy azt követően jelentkezik, és későinek, ha több év elteltével a kezelés után alakul ki (Bornemisza and Pávó, 2012). Szervezeti szinten az ionizáló sugárzásokat még további csoportokra tudjuk bontani: sztochasztikusra és determinisztikusra (Mettler, 2012). A sztochasztikus hatások véletlenszerűek, nincs küszöbdózis ami alapján kategorizálnánk. Gyakorisága függ a dózistól, de a súlyossága ettől független, értelemszerűen, ha valaki nagyobb sugárdózist kap, nagyobb valószínűséggel fog kialakulni véletlenszerű sztochasztikus hatás, de előfordulhat az is, hogy a nagy sugárdózis következtében sem alakul ki mellékhatás. A lappangási időtartam egyes esetekben jóval hosszabb lehet, akár több év is. A determinisztikus hatások, egy bizonyos küszöbdózis felett következnek be, és súlyosságuk dózisfüggő. Kialakulhatnak jellegzetes tünetek, maga a hatás általában akut. Determinisztikus hatások közé sorolható a vérképző rendszeri szindrómát, ami 1,5 Sv dózis felett alakul ki, a látencia időszak 2-4 hét a vérzések miatt szepszis, anémia, granulocitopénia is kialakulhat, de letális is lehet, 10 Sv dózis felett pedig gyomor-bél rendszeri szindróma alakulhat ki, aminek a lappangási ideje 5-7 nap, ez általában egy tünetmentes időszak, majd több napig tartó hasmenés kezdődik, ami kiszáradást, majd kardiovaszkuláris sokkot okozhat, és ugyancsak halálos kimenetelben végződhet (White and Mallya, 2012) (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 16-18. old.).

3.4. Sugárterápia:

A sugárterápia célja elpusztítani az ionizáló sugárzások által a daganatos sejteket úgy, hogy az egészséges sejteket, szöveteket a lehető legkevésbé károsítsuk. Ionizáló sugárzás hatására morfológiailag a sejt bizonyos esetekben sérülhet mikroszkopikus mértékben, de adott esetekben makroszkopikus elváltozások is kialakulhatnak (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 29-30. old.) (Kálmán, Sztanyik and Unger, 1963, 59-85. old.). A szövettani elváltozások jellegét és mértékét sok minden befolyásolhatja, de összességében a frakcionált sugárterápia következtében, mint már korábban említettem, kétfajta sugárkárosodás alakulhat ki az egészséges szövetekben: a korai- és késői normál szöveti károsodások. Ezek leginkább az összdózistól, kezelési időtől, sugárzás térfogatától és típusától függenek, amit a sugárterápia során alkalmaznak. A korai károsodások 90 napon belül jelennek meg, ilyenek például a gyulladással járó folyamatok vagy fekélyek. A késői mellékhatások 90 nappal, vagy akár évekkel később jelennek meg a sugárterápia következtében. A késői mellékhatások okozzák a legnagyobb problémát, mivel ezek a már hosszabb ideig is fennmaradhatnak és ronthatják az

életminőséget. Ezért szükséges általában a sugárkezelést követően a betegmegfigyelés, ami akár több évig is eltarthat (Elgazzar and Kazem, 2006), (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 16-18. old.).

Legelőször a kobalt technológia (kobalt 60-as izotóppal felszerelt gépezetek) került bevezetésre sugárterápia használatára, majd ezt követték a nagy energiájú lineáris gyorsítók (LINAC). Ezzel párhuzamosan a képalkotók is fejlődtek, a konvencionális röntgen (RTG), a komputertomográfia (CT) és a mágneses rezonancia vizsgálatok (MRI) (Cselik *et al.*, 2014, 33-40. old.). A keresztmetszeti képalkotók jelentették az egyik legnagyobb áttörést, mivel ezek segítségével már 3D besugárzási terveket lehetett készíteni, ami nem csak annyit jelent, hogy pontosabban lehet bejelölni a céltérfogatot, hanem azt is, hogy lehetővé teszi a rizikószervek (a céltérfogaton kívül eső szervek, amelyeket védeni kell, ezeket védendő szerveknek is szokták nevezni) dózisterhelésének a csökkentését (Steinmeier, Schulze Schleithoff and Timmermann, 2019) (Cselik *et al.*, 2014, 33-40. old.). A keresztmetszeti képalkotón jól definiálható a célterület és ezáltal a védendő szervek körvonala is amit manuálisan be lehet jelölni. A tervezési folyamat elején már be lehet állítani a szükséges dóziskritériumokat ami alapján fog elkészülni a besugárzási terv. A modern képalkotás 3D-alapú konvencionális besugárzás tervezés, ami lehet CT-n, MRI-n, UH-n vagy ezek kombinációja (Minniti, Goldsmith and Brada, 2012) (Schau and McBride, 2015). A képalkotók lehetővé teszik a GTV (Gross Tumor Volume) látható tumor és a CTV (Clinical Target Volume) mikroszkópos terjedés definiálását (Cselik *et al.*, 2014, 33-40. old.). Az alapján, hogy mekkora a tervezet besugárzási terület elkülöníthetünk több sugárterápia típust:

3.4.1. Teleterápia (Távolsugárkezelés):

Külső sugárforrásból történő kezelés, kobaltágyúval, ami napjainkban már nem annyira használatos, és elektrongyorsítók (lineáris gyorsítók) segítségével (Steinmeier, Schulze Schleithoff and Timmermann, 2019). A besugárzási tervet mindig egyénre szabottan, a beteg anatómiájának függvényében kell megválasztani, figyelembe véve SSD (Source-Surface Distance) a mezőméretet a bőrfelszínen.

A képvezérelt sugárterápiát (IGRT: image guided radiation therapy) azért fejlesztették ki, hogy csökkentsék a hibalehetőséget hiszen azok a betegek, akik sugárkezelésben vesznek részt, és naponta, de akár hetekig eltartó kezelésekben kell részt venniük, nagyon sok lenne a hibalehetőség kezelésük során, ha mindig változtatni kellene a kezelések között a terveken. Létrejöhét interfrakcionális hiba (kezelés közötti), ilyen például a hirtelen fogyás vagy

meghízás következtében alakulhat ki, és intrafrakcionális hiba (kezelés alatti), ilyenek például a fektetési, és az elmozdulási hibák (szervmozgás, légzés) (Lutz *et al.*, 2016) (Mitchell, Formenti and DeWyngaert, 2010). Az előbb említett hibák kiküszöbölésére valós kezelési pozícióba fekvő betegnél a célterület helyzetét (portal imaging) figyeljük képalkotó segítségével, majd az alapján manuálisan korrigálható a terv. A tumorok biológiai viselkedése is vizsgálhatóvá vált a 3D molekuláris képalkotás fejlődésével, amit befolyásol a hipoxia, a celluláris aktivitást és az apoptotikus aktivás is (Minniti, Goldsmith and Brada, 2012) (Schaue and McBride, 2015) (Cselik *et al.*, 2014, 31-57. old.).

3.4.2. Brachyterápia (Belső sugárkezelés):

A brachyterápiát közelbesugárzásnak is szokták nevezni, hiszen a teleterápiával ellentétben a zárt sugárforrást a testüregen belülré helyezik a szövetekbe szúrt tűk, vagy applikátorok segítségével. Ezzel a módszerrel hatékonyabb és biztonságosabb a besugárzás, mivel a céltér fogaton kívül meredek a dózisesés, ezért nagy pontosságot igényel a sugárforrások behelyezése (Steinmeier, Schulze Schleithoff and Timmermann, 2019) (Tanderup *et al.*, 2017) (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 272-296. old.) (Cselik *et al.*, 2014, 54-57. old.). A képalkotók a brachyterápiás kezeléseknél is fontos szerepet töltenek be a besugárzási terv elkészítésénél. Itt is használatos az UH-vezérelt eljárás, ami lehetőséget ad a légyszöveti struktúrák monitorozására a kezelés alatt. Legtöbb esetben ezt a prosztatatumorok esetében szokták alkalmazni. Ilyenkor egy „élő képen” követik a légyszöveti mozgásokat, ugyanis az UH transducer a rectumba van felhelyezve. Illetve a CT- és MR-n való tervezés, adott esetben ezek fúziójával való 3D tervezésére is lehetőség van (Deng *et al.*, 2017) (Cselik *et al.*, 2014, 92-324. old.).

A leggyakrabban alkalmazott brachyterápiás források közé sorolhatóak a γ -források (^{60}Co , ^{125}I , ^{192}Ir , ^{198}Au) és β -források (^{90}Sr). Kezelés időtartama szerint vannak ideiglenes implantátumok: afterloading, amelyeket a kezelés után kivesznek a betegből, mint például a cervix tumoros betegek esetében a brachytűzdelés, és vannak permanens implantátumok, amelyeket kezelés után a kezelt területen maradnak, és idővel lebomlanak (Hannoun-Lévi and Peiffert, 2014). Ezek általában 5 mm x 1 mm nagyságú fémtokban vannak, leggyakrabban a prosztatatumoros betegeknél alkalmazzák (Karius *et al.*, 2023) (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 30. old.).

3.4.3. Sugárérzékenység

Ahogy korábbi fejezetekben is említettem, ahhoz, hogy az ionizáló sugárzást akár iparban, orvosi diagnosztikai vagy sugárterápiás célra felhasználják szükség volt már a kezdetek során határokat szabni, hogy csökkentsék a sugárzás kártékony hatásait. Ezek a szabályzatok azt feltételezték, hogy az emberek egyformán reagálnak az ionizáló sugárzásra (Schnarr *et al.*, 2007). Az évek során arra is fényderült, hogy a betegek közül nem mindenki reagál azonosan a sugárkezelésekre akkor sem, ha ugyanakkora sugárdózist kapnak, sőt a betegek 5-10%-nál súlyos korai, illetve késői mellékhatások is kialakultak (Schnarr *et al.*, 2007). Mára már bebizonyosodott, hogy a sugárérzékenység meghatározása nagyon fontos a sugárbiológiai tanulmányok során, és véletlenül sem szabad figyelmen kívül hagyni (Datta, 2023). Holthusent említik elsőként aki klinikai megfigyeléseket tett a sugárérzékenységgel kapcsolatban (Lapierre *et al.*, 2022). A sugárérzékenység lehetséges mellékhatásai közé sorolhatjuk a bőrpírt, a hajvesztést, teleangiectáziát, fibrózist, kialakulhatnak GU (genitourinális) és GI (gastrointestinális) mellékhatások is (Kis, 2019). Egyértelművé vált, hogy a kialakuló mellékhatásokat nagyban befolyásolja az egyéni sugárérzékenység (Pesnyák and Sáfrány, 2017) (Guogytè *et al.*, 2017).

Ha lehetséges lenne, hogy azoknál a betegnél akik sugárterápiára kerülnek még a kezelés megkezdése előtt meglehetne vizsgálni valamilyen mérési módszerrel az egyéni sugárérzékenységet, akkor könnyebben lehetne személyre szabott kezelést összeállítani a betegeknek és kisebb mellékhatást, vagy egyáltalán nem okozna mellékhatást a kezelés. Például azoknál a betegeknél akik sugárérzékenységet észlelnek, lehetne csökkenteni a sugárdózist, vagy akár teljesen más terápiás módszert alkalmazni, és azoknál a betegeknél akiknél sugárrezisztenciát vesznek észre, meg lehetne növelni a daganatra tervezett sugárdózist, így növelni a kezelés hatékonyságát (Pesnyák and Sáfrány, 2017, 380-397 old.) (Kis, 2019)

Ahhoz, hogy egyénileg lehessen vizsgálni a sugárérzékenységet, először valamiféle biológiai mintát kell a vizsgálandó személytől venni. Az alábbi szempontokat kell figyelembe venni a mintavételkor: könnyen hozzáférhető helyről legyen, gyorsan regenerálódó területről származzon, olcsó és gyors felhasználású legyen, lehetőleg ne okozzon kellemetlenséget. Ez esetben az egyik legoptimálisabb a vérminta levétele, azon belül is a fehérvérsejtek, illetve a limfociták vizsgálata vagy a bőrbioptizációs mintákból való fibroblaszt sejtek vizsgálata.

Több módszert is kifejlesztettek már a sugárérzékenység kimutatására. Eddigi ismeretes sugárérzékenységet kimutató módszerek:

- A **kolonogenitás vizsgálat** alkalmazták in vivo és in vitro körülmények között egyaránt. A fibroblasztok regenerálódási képességet és sugárérzékenységét vizsgálják bőrbioptziás mintákból, de vérből származó limfocitákkal is elvégezhető. Sajnos nagyon időigényes akár 2-3 hétig is eltarthat, mivel a bőrbioptziás mintákból sejkultúrát kell létrehozni, majd ha a kialakult telepek szabad szemmel láthatóvá válnak, megszámlálásra kerülnek, ami hibafaktor lehet. A fibroblasztokat sokáig aranystandardnak tekintették a késői mellékhatások vizsgálatára tekintve, sajnos azonban sok év kísérletezés után most már kimondható, hogy nem megfelelő vizsgálati módszer. Hiszen egyetlen tanulmány sem mutatott ki szignifikáns összefüggést a fibroblasztok sugárérzékenysége között és a sugárzás okozta toxicitás vizsgálat között a betegekben (Peszyński and Sáfár, 2017, 385. old.) (Kis, 2019) (Azria *et al.*, 2018) (Brennes *et al.*, 2017) .
- A **comet teszt**tel a DNS hibajavító képességét lehet vizsgálni. Csak a kétlancú DNS törések esetében alkalmazható módszer, amit gél-elektroforézis segítségével mutatnak ki. Ez már sokkal gyorsabb eljárási módszer mint a kolonogenitás vizsgálat. Általában vérből származó limfocitákat szoktak vizsgálni. Nagyon kevés olyan tanulmány van amely mutatott szignifikáns összefüggést a fibroblasztok sugárérzékenysége között és a sugárzás okozta toxicitás között a betegekben. Jelenleg is fejlesztés alatt áll ez a módszer (Moneef *et al.*, 2003) (Collins *et al.*, 2008)
- A **kromoszóma aberrációk mérése**: ez a mérés a sejtciklus metafázisában megfigyelhető kromoszómákon alkalmazható, így speciális módon kell a sejteket blokkolni a sejtosztódás során. Általában sugárhatást követően szokták elvégezni a vizsgálatot. A mérést el lehet végezni a vérből származó limfocitákon, de fibroblasztsejteken is. Itt főként a kromoszóma rendellenességeket szokták megvizsgálni. A sugárérzékenység kimutatására nem a legalkalmasabb vizsgálat, viszont a sugárhatás okozta kár megállapításra annál inkább (Vral, 2004).
- **RILA** (sugárzás indukált limfocita apoptózis): a klonogén tesztek után fejlesztették ki ezt a fajta vizsgálatot. Ami szintén vérből származó limfocitákkal történik. Több vizsgálat után kiderült, hogy a CD8⁺ T-limfociták apoptózisa és a korai mellékhatások között nem volt szignifikáns összefüggés, viszont a késői mellékhatások között jelentős volt különböző daganatos megbetegedésekben. Megbízhatónak és reprodukálhatónak bizonyult a vizsgálat. Jelenleg is értékelik a RILA klinikai érvényességét,

Franciaországban már egy cég elkezdte alkalmazni ezt a módszert a betegek sugárérzékenységének kimutatására (Azria *et al.*, 2015) (Azria *et al.*, 2017).

3.5. A DNS károsodások észlelése és javítása:

Ionizáló sugárzás következtében sérülések jöhetnek létre a sejtekben, melyek közül a legfontosabbak a DNS károsodások (Joiner and Kogel, 2018) (Pesznyák and Sáfrány, 2017). A DNS kémiai szerkezetében a sugárzás hatására az alábbi változások jöhetnek létre:

- egyszálú DNS-törések, amikor a DNS-nek csak az egyik szála törik el
- kétszálú DNS-törések, amikor a DNS-nek mind a két szála eltörik
- báziskiesés
- báziskárosodás
- nem oda illő keresztkötések alakulhatnak ki a DNS molekulák között
- a két lánc denaturációja

Ezáltal a DNS-ben létrejöhetnek pontmutációk vagy kromoszómaaberrációk is (kialakulhatnak dicentrikus-, vagy gyűrűkromoszómák), amelyeket olyan kétláncú DNS-törések hoznak létre, amiket a következő sejtosztódásig nem tudják kijavítani a sejtek (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 74-84. old.). A sejtek sugárérzékenysége jelentős mértékben függ attól, hogy mennyire eredményes a sejtek kétláncú DNS-törések hibajavító mechanizmusai, illetve, hogy a sejt a sejtosztódás mely szakaszában található (Joiner and Kogel, 2018) (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 74-84. old.) (Joiner and Kogel, 2018, 21-81- old.).

Az ionizáló sugárzás hatására kialakult egyszálú DNS-töréseket egyszerűbb kijavítani, mint a kétszálú töréseket, mivel a másik szálon lévő genetikai információ segítségével könnyen tudja a sejt detektálni a hibát és pótolni a hiányzó genetikai információt. Ellentétben a kétszálú DNS-törésekkel, ahol, ha nem történik osztódás, illetve, ha nem-kódoló régióban található a DNS-törés, addig nem okoz gondot. A sejtosztódás során azok a DNS darabok, amelyek letörtek és genetikai információt hordoztak elvesznek, és nem fognak átkerülni az utódsejtbe. Az utódsejtek ezzel az információ hiánnyal általában nem képesek túlélni, ezáltal elpusztulnak. Ez ad magyarázatot arra is, hogy azok a sejtek, amelyek intenzíven osztódnak sugárérzékenyebbek, míg a nyugalmi állapotban lévő sejtek esetében sugárrezisztencia alakulhat ki (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 74-84. old.).

Első lépésben a DNS-károsodásokat be kell azonosítani a sejtnek, amire több DNS károsodást felismerő rendszerrel képes:

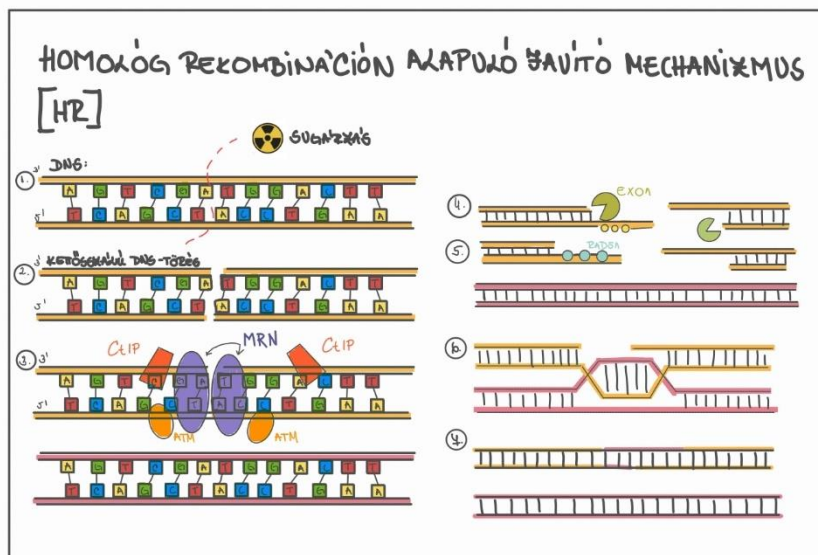
1. ATM (Ataxia Telangiectáziában Mutáns) fehérje
2. DNS függő protein kináz enzim
3. ATR (ATM related) az ATM fehérjével rokonságban álló fehérje

A felismerést követően az ATM fehérjék elindítják az effektor (végrehajtó) folyamatokat, ezáltal megkezdik a DNS-törések kijavítását, ha ez a folyamat sikertelen és mégsem tudják kijavítani a töréseket bekövetkezik a sejthalál (Joiner and Kogel, 2018) (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 74-84. old.) (Joiner and Kogel, 2018, 21-81. old.).

Az effektor folyamatok hatására elindult DNS károsodásokat javító repair-mechanizmusokat, további két csoportra oszthatjuk:

- **HR (Homológ Rekombináción alapuló javító mechanizmus):**

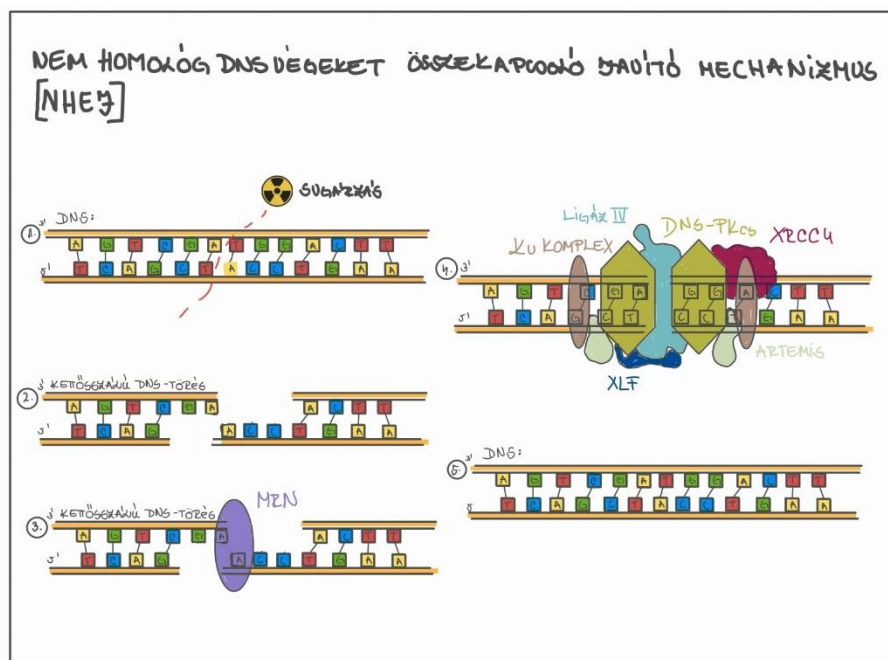
A DNS kettősszál-törések nagy pontosságú javítási mechanizmusa, amelyet DNS-károsító folyamatok indukálnak. A folyamat működéséhez nem szükséges, hogy a teljes DNS szál homológ legyen, elegendő lehet egy homológ szekvencia is, ami egymás közelében helyezkedik el. A HR magába foglalja a homológ templátból irányított DNS-szintézist, ami azt jelenti, hogy a homológ templát segítségével DNS szintézis történik és kialakul a Holiday-híd struktúra (Ray and Langer, 2002). Meg kell jegyezni azonban, hogy a homológ rekombináció nem jellemző magasabb rendű emlősökben, illetve leginkább a késői S, és a G₂ fázisban lehetséges (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 78-80. old.) (1. ábra).



1. ábra: Homológ rekombináción alapuló javító mechanizmus lépései: 1. Sugárzás éri a DNS-t. 2. Sugárzás hatására két szálú DNS törés alakul ki. 3. Az MRN-komplex képes a megváltozott DNS végeket detektálni, majd a CtIP és az ATM becsatlakoznak. 4. EXO1 tovább hasítja a DNS végeket. 5. RAD51 csatlakozik a DNS szálhoz. 6. Végbemegy a homológ rekombináció. 7. Végeredményben a kijavított és rekombinált két szálú DNS. (A szerző saját ábrája.)

- **NHEJ (Nem-Homológ DNS végeket összekapcsoló javító mechanizmus):**

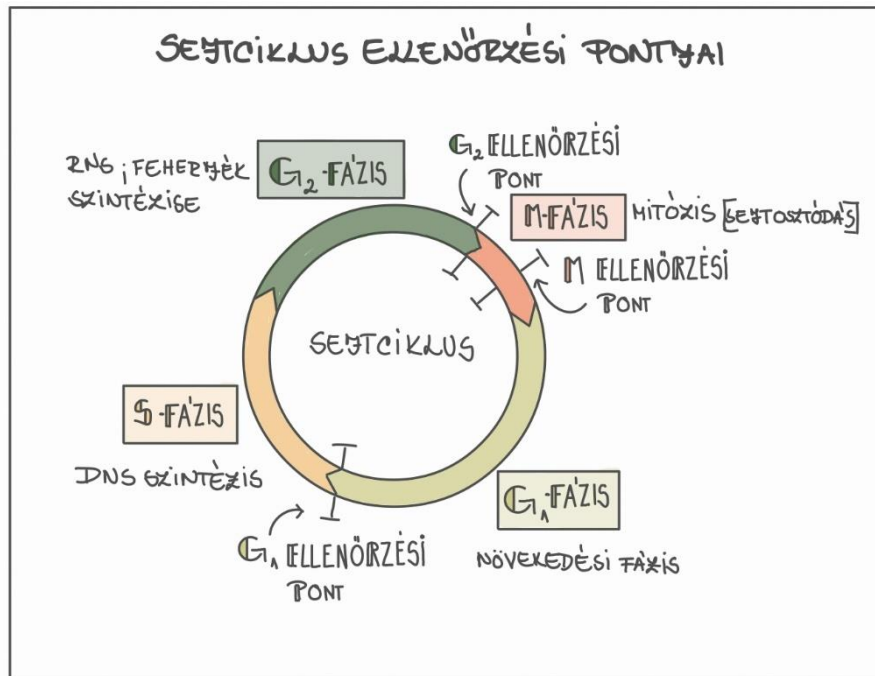
1. Első lépésben egy enzim komplex alakul ki, amely a DNS függő protein-kináz alegységéből Ku komplex (Ku70 és Ku80 fehérjéből áll) csatlakozik a szabad kétláncú DNS végekhez.
2. Ezt követően a DNS-PKcs (DNS-protein kinase catalytic subunit) kapcsolódik a Ku komplexhez.
3. A DNS-PKcs elkezd autofoszforilálni az Artemist (endo- és exonukleáz hatással bíró fehérje) ezáltal aktiválva azt. Majd az Artemis felelős a foszfodiészter elvágásában a DNS törött végénél (Chang and Lieber, 2016).
4. Az utolsó lépésben az XFL, a XRCC4, és a DNS ligáz IV komplexet alkotva bekötődik a DNS végekhez és összekapcsolják azokat (Burma, Chen and Chen, 2006) (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 77-78. old.) (2. ábra).



2. ábra: Nem homológ DNS végeket összekapcsoló javító mechanizmus lépései: 1. Sugárzás éri a DNS-t. 2. Sugárzás hatására két szálcú DNS törés alakul ki. 3. Az MRN-komplex képes a megváltozott DNS végeket detektálni. 4. Becsatlakozik a Ku-komplex, a DNS-PKcs, XRCC4, XLF, Artemis és a Ligáz IV majd összekapcsolják a DNS végeket. 5. Végeredményben a kijavított két szálcú DNS. (A szerző saját ábrája.)

A sejtosztódás folyamatához, mint már említettem létfontosságú a genetikai információ épsége, és annak fenntartása, hogy a tárolandó információ sejtosztódáskor sértetlenül kerüljön az utódsejtbe. Ha a sejtet ionizáló sugárzás éri, és az szabálytalan osztódásba kezd magasabb szervezetekben ez már a daganatok kialakulását is maga után vonhatja. Ez esetben a sejtnek mindenképp meg kell akadályoznia, a sejtosztódás bekövetkeztét addig, ameddig ki nem javítja a DNS károsodást. Ezért vannak kontrollmechanizmusok, melyek egyfajta önellenőrző pontok

a sejt számára. A sejtciklusról szóló **(3.ábra)** ábrán látható, hogy az első ellenőrzési pont a G_1 ellenőrzési pont (itt dől el, hogy a sejtek tovább osztódnak-e vagy sem), ami a G_1/S fázisok határán található. Itt ellenőrzésre kerül a DNS épsége, és a szükséges tápanyagok és növekedési faktorok jelenléte, amelyek nélkülözhetetlenek a sejtosztódás folyamatához. A G_2 ellenőrzési pontnál ellenőrzi a sejt a DNS épségét, integritását, és hogy a teljes DNS megkettőződött-e az S fázisban. Ha hibát észlel leáll a sejtciklus addig, amíg a hibát ki nem javítja, vagy elindul az apoptózis. Ez az ellenőrzési pont a G_2/M fázis határon található. Az M ellenőrzési pontnál a sejtek megvizsgálják, hogy az összes testvérkromatida helyesen kapcsolódik-e a mikrotubulusokhoz. Ez az ellenőrzési pont a mitózis metafázis és anafázis szakaszai között található. Ez esetben is, ha a sejt hibát észlel leállíthatja a sejtosztódás folyamatát míg kijavítja a keletkezett hibát, vagy akár teljesen leállíthatja a sejtosztódást. A leállást az adott fázisra jellemző fehérje-kináz komplexek (ciklin és ciklin függő kináz komplexek) segítségével tudja a sejt szabályozni (Pietenpol and Stewart, 2002). A ciklinek regulátorai a sejtciklusnak, amelyek adott fázisokhoz, fázisátmenetekhez, vagy új fázis elindításához nyújtanak segítséget. A ciklinek továbbá serkentenek vagy éppen gátolnak adott fehérjéket, azzal, hogy adott enzimekhez, Cdk-khoz (ciklin függő kinázok), kötődnek (Pesznyák and Sáfrány, 2017, 80-84. old.) (Rye *et al.*, 2016).

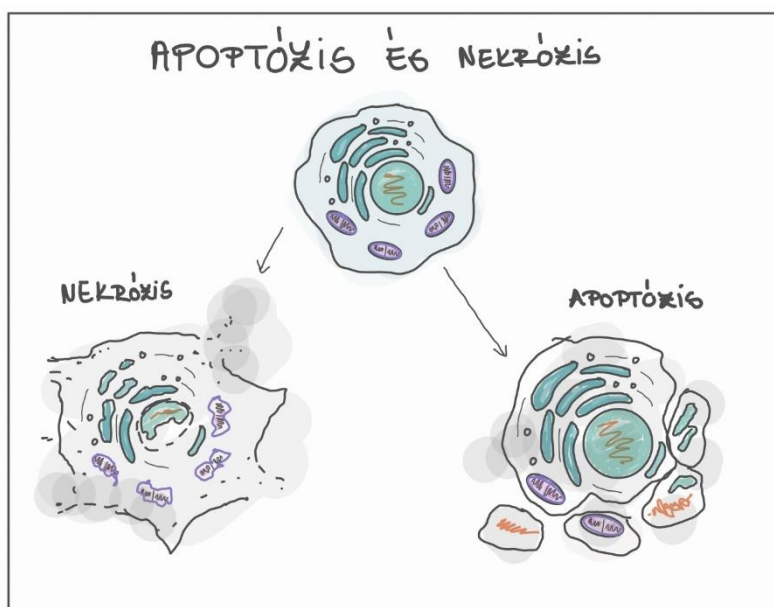


3. ábra: A sejtciklus részei. (A szerző saját ábrája.)

3.6. A sejthalál:

A szervezetnek szüksége van szelekcióra sejtes szinten, hogy megtudjon szabadulni a számára felesleges, előregedett, valamint a veszélyes sejtektől. Ezt két módon érheti el:

apoptózissal (programozott sejthalál) és nekrozissal (nem programozott, ellenőrizetlen sejthalál) (D'Arcy, 2019) (4. ábra). Sokszor az autofágiát is a sejthalálok közé sorolják, ami a sejtnak az önméztési folyamata, amely során a felesleges, vagy sérült citoplazmatikus anyagokat és sejtorganellumokat a sejt lizoszómán keresztül lebontja (Miller and Thorburn, 2021) (Maiuri *et al.*, 2007). A nekrosis a sejthalál oly módja mely során a sejt addig duzzad, amíg el nem hasad, így a sejt tartalom egyszerre felszabadul és károsíthatja a környező sejteket, ami gyulladásos folyamatokat indukál. Ez általában sérülések esetében szokott bekövetkezni (D'Arcy, 2019).

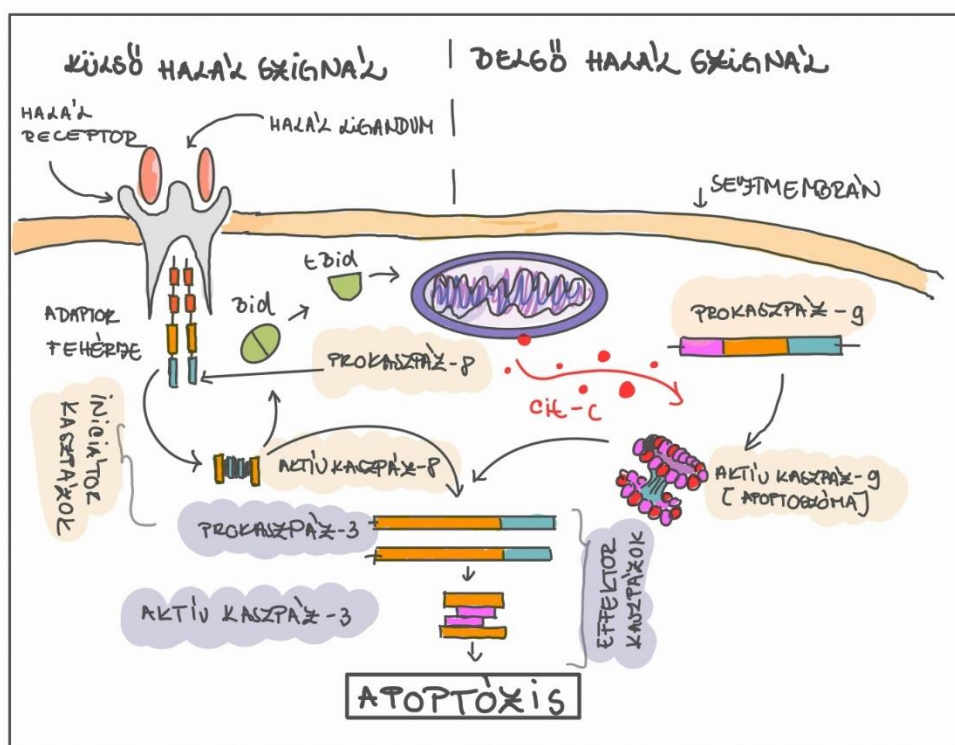


4. ábra: A sejthalál típusai: apoptózis és nekrosis. (A szerző saját ábrája.)

Az apoptózis a sejtek, illetve bizonyos sejtcsoportok időben és térben meghatározott elpusztulását jelenti. A sejthalál olyan módja, ami normális és természetes velejárója az egyedfejlődésnek. Például magzati korban bizonyos sejtek, mint az embrionális úszóhártya sejtjei is, így pusztulnak el. Szervezetünk az apoptózist megelőzésre is használja, mint például a vírusfertőzések, vagy tumorok esetében. Az egyik leglátványosabb változása a sejtanyag kondenzálódása (sejt jól láthatóan összezsugorodik, lebontva DNS-ét, sejtmagját) amely ezután szétesik sok kicsi darabra, lefűződnek kis membrán csomagokra, amiket apoptotikus testeknek nevezünk. Az apoptotikus testeket a környező sejtek fagocitálják, illetve az immunrendszer egyes sejtjei is bekebelezik őket. Ennek köszönhetően nem alakul ki gyulladás, hiszen nem kerülnek a makromolekulák az extracelluláris térbe. A nekrozist a testünk próbálja elkerülni, mivel általában valamilyen toxin, vagy valamilyen külső hatásra alakul ki. Ezzel ellentétben az apoptózis folyamatosan zajlik embrionális kortól megkezdve (például az ebihal ahhoz, hogy

békává tudjon alakulni lebontja az ebihal farkát, amit apoptózis segítségével tesz meg). Két típusát tudjuk elkülöníteni az apoptózisnak, annak függvényében, hogy külső vagy belső hatás indukálja (Alberts, 2002) (Apoptózis, 2002).

Kívülről kiváltható a kaspáz kaskád rendszer aktiválódása, ha egy fehérje (ezt Fas ligandumnak nevezzük) kötődik a Fas halál receptor felszínéhez. Majd a Fas fehérjék intracelluláris adaptor fehérjéket toboroznak, amelyek megkötik és aggregálják a kaspáz-8 molekulát, aztán a további prokaspázokat aktiválnak, így az apoptózis végbemegy. A belső jel által indukált apoptózist a mitokondriumok segítségével indul el, ugyanis citokróm c-t bocsátanak ki, amely kötődik és aggregálódik az Apaf-1 adaptorfehérjéhez. Ez a fehérje tovább aktiválja a prokaspáz-9 molekulát, ami a kaspáz kaskád rendszer elindításához vezet, mely végeredményben indukálja az apoptózist (5. ábra) (Alberts, 2002).



5. ábra: Az apoptózis típusai: külső és belső halál szignál által elindított apoptózis. (A szerző saját ábrája)

Számos indukáló és gátló fehérje van, ami szabályozza az apoptózist a sejtfelszíni receptorokon keresztül (Wilkins *et al.*, 2002). Összeségében az apoptózis feladata az egyensúly fenntartása. Abban az esetben, ha a sejt károsodást szenved, például egy kettős láncú DNS-törést, és nem tudja kijavítani a sejt elpusztul, ezzel megelőzve a kromoszómaaberrációk képződését, illetve a sejt rosszindulatúvá átalakulását. A sejthalál bekövetkezhet két mitózis között, az inetrfázis során vagy sugársérülés következtében, amikor eljut az első sejtosztódáshoz. Az apoptózis az immunrendszer fenntartásában is fontos szerepet tölt be,

hiszen a T- és B-limfociták érésük során, ha túlságosan kötődnek a saját fehérjékhez, akkor autoimmun folyamatokat indítanak el, ezért ezek a sejtek szelektálódnak és apoptózissal elpusztulnak (Arvanitis *et al.*, 2013) (Wilkins *et al.*, 2002) (Apoptózis, 2002).

3.7. A CD4⁺ és a CD8⁺ T-limfociták

A limfocitákat az adaptív immunválaszt kialakító fehérvérsejtek. A hematopoetikus őssejtek hozzák létre őket a csontvelőben. Funkcionálisan T-, B- és NK-sejtekre különíthetjük el őket. A B-sejtek a humorális immunválaszban játszanak szerepet, a T-sejtek pedig a celluláris immunválaszban vesznek részt. Az NK (Natural Killer, természetes ölősejtek) sejteket „nullsejteknek” is szokták hívni, ugyanis nincs antigénkötő receptoruk, ők a tumoros és vírussal fertőzött sejtek elpusztítását végzik (Brummelman, Pilipow and Lugli, 2018).

A T- és B – sejtek, ellentétben az NK sejtekkel, olyan limfociták, melyek receptorok segítségével képesek a környezetükben lévő antigéneket felismerni, és sejtspecifikusan immunválaszt indítanak el, melynek a végén immunológiai memória alakulhat ki. A B – sejt receptor membránkötött immunglobulin molekula, amihez, ha egy antigén kötődik, vagy egy antigén prezentáló sejt bemutatja neki, akkor úgynevezett plazmasejtté alakul a B-sejt, és elkezd ellenanyagokat termelni az adott antigén ellen (Brummelman, Pilipow and Lugli, 2018).

A T-limfocitáknak a szerepe ugyancsak az antigének felismerése és eltávolítása. A T-sejtek onnan kapták a nevüket, hogy a csontvelőből az éretlen előalakjuk a tímuszba mennek, és ott érnek működő T-sejtekké. Ennek folyamata a negatív szelekció, amely során azok a T-sejtek, amelyek kapcsolódnak a szervezet saját fehérjéihez apoptózissal elpusztulnak, így csak azok a sejtek jutnak ki a keringésbe, amelyek csak nem saját struktúra felismerésére képesek antigénkötő receptorral rendelkeznek. Erre a csak rájuk jellemző T-sejt receptorjukkal (TCR) képesek, amivel a fehérje természetű antigéneket ismerik fel, de csak az antigénprezentáló sejteken lévő MHC fehérjékhez kötötten képesek erre. Mindegyik T-sejt más antigénre specifikus receptorral rendelkezik, így csak a megfelelő TCR-rel rendelkező sejt aktiválódik. A TCR-komplexet szerkezetük alapján további csoportokra tudjuk bontani: α - és β -láncból álló, és a γ - és δ -láncokból álló. Fontos megjegyezni, hogy egy T-sejten csak α/β - vagy γ/δ -receptorok vannak jelen (Kay, 1991) (*Immunológia*, 2012, 73-75., 106-111, 266-296, 320-362.. old.).

Az α/β TCR-receptorú T-sejteket további csoportokra tudjuk bontani felszíni markereik alapján: CD4⁺ (segítő, T_h = T-helper) és CD8⁺ (citotxikus, T_c = T-citotoxikus) sejtekre. Ez a két sejttípus más antigénekre képes reagálni: a T_h sejtek az MHC-II, a T_c sejtek az MHC-I

fehérjékhez kötött antigénekre adnak választ. Az antigénnel való kapcsolódás hatására a T_h sejtek bizonyos citokineket, úgynevezett limfokineket termelnek, így specifikus immunválaszt indítanak el az adott antigénre, hiszen a megfelelő immunsejteket vonzzák oda és aktiválják őket (Cenerenti *et al.*, 2022) (Speiser *et al.*, 2023). A T_c sejtek ezzel ellentétben citotoxikus aktivitással rendelkeznek, és a vírussal, vagy intracelluláris kórokozóval fertőzött, illetve a tumorossá vált sejteket pusztítják el (Lees, 2020) (Mittrücker, Visekruna and Huber, 2014) (*Immunológia*, 2012, 73-75., 106-111, 266-296, 320-362.. old.).

Az antigénnel való találkozáskor mind a $CD4^+$, mind a $CD8^+$ T-sejtek effektor sejtekké differenciálódnak, majd a gyulladt szövetekbe vándorolnak, hogy felvehessék a harcot a fertőzésekkel, illetve a dagantokkal szemben. Ha sikeresen tudják eliminálni a célpontot, néhány sejt átalakul memória T-sejtté. A memóriasejtek képesek másodjára is támadni később, ha újra megjelenik az antigén, akár sokkal erőteljesebben is, mint az első alkalommal. Az effektor és a memória sejtek esetében több alcsoportot elkülöníthetünk, melyek különböző molekuláris jellemzővel, funkcióval rendelkeznek (Brummelman, Pilipow and Lugli, 2018).

Ezeket a különböző alcsoportokat extracelluláris markerek alapján lehet megkülönböztetni. Ezeknek az alcsoportoknak az azonosítása akár áramlási citométer használatával is lehetséges (Mousset *et al.*, 2019).

3.8. Áramlási citometria (FACS)

Az összetett sejtpopulációk összetételének jellemzésére hatékony eszköz lehet az áramlási citométer (Tarrant, 2005). Ezt a sejtekről szóródó fény detektálásával éri el. A FACS gép zárt, kettős keringési rendszerrel rendelkezik. A sejteket szuszpenzióban vizsgálják, amit a mérőcella nyílásába juttatnak a mintát körbevevő köpenyfolyadék segítségével. A hidrodinamikai fókuszálás következtében a sejtek egyenként kerülnek a mérőcellába, ahol a lézernyaláb megvilágítja őket (McKinnon, 2018). Itt a fényt szórja a sejt, illetve a fluoreszcens jelnek, amivel megjelölték a sejtet, megfelelő fluoreszcencia jön létre. Így háromféle jel keletkezik: az előre irányuló (FSC), az oldalirányú fényszórás (SSC), és a fluoreszcens jel. Az FSC jel a sejt méretét mutatja meg. Az SSC a sejt granuláltságáról ad információt. A fluoreszcens jel pedig az adott sejtfelszíni, vagy sejten belüli fehérje elleni fluoreszcens jellel ellátott ellenanyag jelét érzékeli. Ennek köszönhetően egy sejten akár több fehérje is detektálható különböző fluorofórok alkalmazásával. Az egyes fluoreszcens jelek szétválasztását dikroikus tükrök és a detektorok előtt elhelyezett optikai szűrők teszik lehetővé. A jelet végül a számítógép dolgozza fel (Manohar, Shah and Nair, 2021). A módszer előnye,

hogy egy sejt több tulajdonsága egyidejűleg tanulmányozható, és percenként akár 10000 sejt is mérhető, így nem meglepő, hogy mind alapkutatásban, mind klinikai vizsgálatokban szévesen alkalmazzák. Például a különböző T-sejt populációk elkülönítésére is használják ezt a technikát (Mura *et al.*, 2020) (Mousset *et al.*, 2019) (*Immunológia*, 2012, 206-207. old.)

3.9. A méhnyakrák (carcinoma cervicis uteri)

Nők körében jelenleg az egész világon az egyik leggyakrabban előforduló tumortípus a méhnyakrák (Volkova, Pashov and Omelchuk, 2021). Annak ellenére, hogy egyre több fajta lehetőség adott a megelőzésre: szűrések segítségével (a szűrés során citológiai mintavétel, bimanuális nőgyógyászati vizsgálat történik, de indokolt esetben vírus DNS-ét kimutató tesztek is végeznek), illetve már létezik HPV (Humán Papilloma Vírus) vírus elleni oltás is (Cselik *et al.*, 2014, 205-229. old.) (Pulay, no date).

A tumor kialakulásához sok tényező hozzájárulhat még, mint például a rossz szociális, higiéniai viszonyok, a terhességek-, vetélések-, abortuszok száma (Cselik *et al.*, 2014, 205-229. old.). Ennek ellenére 99,7%-ban megtalálható a nemiszervekre specifikus HPV vírus a cervix tumorokban, így a HPV fertőzés mondható a fő okozónak. Az anogenitális HPV-típusokat magas rizikójú (HPV 16, HPV 18, HPV 45) és alacsony rizikójú (HPV 40, HPV 44) csoportokba oszthatjuk (Tsikouras *et al.*, 2016), (Cselik *et al.*, 2014, 205-229. old.) (Pulay, no date).

A HPV vírus a *Papillomaviridae* családba tartozik. Körülbelül 50-60 nm átmérőjű kettősszájú DNS-el rendelkezik (Viveros-Carreño, Fernandes and Pareja, 2023). A vírus az epithél sejteket fertőzi, és képes a gazdasejt sejtmagjába integrálódni és elbújni az immunrendszer elől (Oyouni, 2023). Egészséges esetben fertőzés hatására a P53 fehérje megállítja a sejteket a sejtciklus G₁ fázisában való előrehaladásában, hogy lehetővé tegye a gazdasejt DNS javítását, és apoptózist indukál, ha ez nem lehetséges. A HPV vírus azonban képes hozzákapcsolódni a P53 fehérjéhez és a lebontását indukálni (Oyouni, 2023). Így az onkogén típusokkal való tartós fertőzés pre-invazív elváltozásokhoz vezethet, ami átalakulhat idővel tumorrá (Viveros-Carreño, Fernandes and Pareja, 2023).

A méhnyakrák laphám vagy mirigyhám eredetű lehet, ez utóbbit rosszabb indulatúnak tartják. Leggyakrabban laphám sejt karcinómák alakulnak ki, amelyek a méhnyakrákos esetek mintegy 75%-át jelenti (Small *et al.*, 2017).

Kezelés szempontjából kombinált kezeléseket szoktak alkalmazni a betegeknek, például sebészeti beavatkozás (Wertheim – féle radikális hysterectomia kétoldali szisztematikus medencei lymphadene lymphadenectomiával vagy Brunschwig – féle teljes kismedencei externáció) sugárkezeléssel alkalmazva, azon belül is főként brachyterápiával kiegészítve, vagy radiokemoterápiás kezelést, ami magába foglalja a sugárterápia és kemoterápia (a kemoterápia során citosztatikumokat alkalmaznak, amelyek különböző módokon a gyorsan osztódó sejteket pusztítják el, így a tumorsejteket is) párhuzamos alkalmazását egyidejűleg. Ez utóbbi jóval hatékonyabbnak bizonyult az évek során (Naszály and Patonay, 2001) (Cselik *et al.*, 2014). A sugárterápiát először külső sugárkezeléssel (lineáris gyorsítóval) szokták kezdeni, amit CT-alapú, 3D besugárzásitervezés alapján végeznek, majd a brachyterápiával folytatják (HDR (high-dose-rate) és AL (after loading)). A brachyterápiánál a céltérfogatra nagy dózist lehet leadni, mivel nagyon közel lehet felhelyezni a sugárforrást a tumorhoz, és a képalkotóknak köszönhetően be lehet jelölni az MRI vagy CT alapú számítógép-vezérelt 3D-s sugárterven a rizikószerveket, így az ép szövetek minimális dózisterhelést kapnak.

A sebészeti beavatkozások és a sugárkezelések kombinációit több csoportba lehet osztani:

- preoperatív radioterápia (műtétet megelőző időszakban történik a sugárkezelés)
- postoperatív (műtét utáni időszakban történő sugárkezelés)
- primer (definitív) sugárkezelés (a műtét helyett történő sugárkezelés, mivel a tumor inoperábilis).

A döntés, hogy épp melyik kezelésre kerül sor, a betegség stádiumától és a tumor nagyságától függ (Pulay, no date) (Cselik *et al.*, 2014).

A cervix tumoros betegeknél kialakulhatnak GU (genitourinális) és GI (gasztrointesztinális) mellékhatások a sugárkezelés következtében, melyek exponenciálisan függhetnek a dózisterheléstől, de a sugárérzékenységtől is. Ilyen mellékhatások lehetnek a bőrrerythema, a dysuria, vagy a vulvovaginitis. Ezek könnyedén kezelhetők gyulladáscsökkentőkkel, diétás kezelésekkal. Lehetnek azonban késői mellékhatások, mint a végbélszűkület, fisztulaképződés, incontinenencia, vagy a krónikus cystitis. Ezek a késői mellékhatások nagymértékben csökkentik a betegeknek életminőségét (Cselik *et al.*, 2014).

3.10. Radiation Induced Lymphocyte Apoptosis (RILA)

A sugárterápia a betegek 5-10%-ban súlyos mellékhatásokat okoz, ezért fontos lenne annak előrejelzése, hogy mely betegnél alakulnak ki mellékhatások a terápia következtében. A Radiation Induced Lymphocyte Apoptosis (RILA, sugárzás indukált limfocita apoptózis) ígéretes klinikai módszernek tűnik a sugárterápiás toxicitás biológiai előrejelzésére (Lapierre *et al.*, 2022).

A sugárterápia egy nagyon fontos módszer a dagantos megbetegedések kezelésére, mint korábbi fejezetekben említettem, ma már nagyon sokszínű, személyre szabott kezeléseket tudnak létrehozni a beteg számára, de egyes betegeknél olyan mellékhatások jelentkeznek, amelyek hosszútávon fennmaradhatnak és ezáltal csökkenthetik az életminőséget. Így a mellékhatások kialakulásának fokozott kockázatával rendelkező betegek előrejelzése nagyon fontos lenne, mert ezáltal lehetővé tenné a kezelés módosítását és más kezelési alternatívát lehetne találni ezeknek a betegeknél (Talbot *et al.*, 2019).

Számos vizsgálatot fejlesztettek ki az elmúlt évek során, de igazán szignifikáns elérést először Dr. Mahmut Ozsahin és Dr. David Azaria kutatócsoportjának sikerült elérniük 2005-ben (Ozsahin *et al.*, 2005). Jelenleg is fejlesztés alatt áll a vizsgálati módszer, már folyamatban vannak a frakcionálási tervek módosítása, illetve a gyógyszerekkel való megelőzése a hosszútávú toxicitásoknak (Lapierre *et al.*, 2022). A vizsgálathoz először Li-heparinos csövekbe vérmintákat vesznek a betegektől, amelyekhez tenyésztő mediumot adagolnak és 6 lyukú lemezekben 37 °C-on CO₂-os termosztátban tenyésztik 24 óráig. Az inkubációs idő leteltével külön választják a mintákat: maradnak besugarazatlan minták, kontroll mintaként és a többi besugárzásra kerül 8 Gy dózissal. A besugárzott véreket és a kontroll mintákat 48 órán keresztül tenyésztik tovább, majd a mintákra lízispuffer kerül, hogy elpusztítsa a vörösvértesteket és csak a fehérvérsejtek maradjanak meg. A megmaradt sejtekből specifikus festékekkel megjelölik a CD8⁺ T-sejteket majd PI-dal megfestik őket. Végül az apoptoizáló sejteket áramlási citométerrel vizsgálják (Lapierre *et al.*, 2022).

A nagy RILA érték alacsony kockázatot jelent a késői mellékhatások kialakulására, míg a kis RILA értékkel rendelkező betegekben könnyebben alakulhatnak ki késői mellékhatások. Ennek a pontos molekuláris háttere jelenleg sem tisztázott, azonban vannak hipotézisek amelyekkel próbálják megmagyarázni a sugárzás által kiváltott limfocita apoptózis betegeknél különbségét és kapcsolatát a mellékhatásokkal.

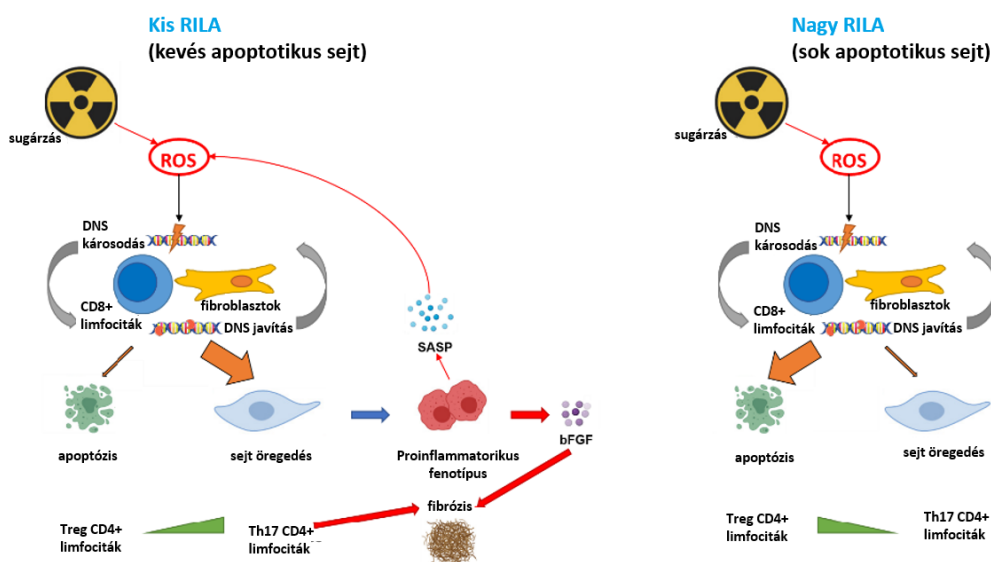
Az apoptózis mind a tumoros, mind a normál sejtekben végbemegy a sugárkezelés hatására. A limfociták esetében pedig ez a sejthaláltípus megy végbe sugárzás hatására (Lapierre *et al.*, 2022).

- **A kis RILA érték esetében:**

A sugárzás következtében ROS (reaktív oxigén gyök) alakul ki, amely DNS-károsodást indukál. Abban az esetben ha a DNS javítás sikeres akkor, a fibroblasztok és a T-limfociták egészséges sejtekként tovább funkcionálnak. Abban az esetben ha a DNS-károsodásokat nem sikerül kijavítani további két eset történhet: kisebb mértékben apoptózis következik be, nagyobb mértékben szenescens sejtekké (előregednek a sejtek) alakulnak. Ezek a sejtek proinflammatorikus fenotípussal rendelkeznek, amelyek újabb ROS-k termelését indukálhatják. Továbbá bFGF-t (fibroblaszt növekedési faktor) termelnek amelyek védelmet nyújtanak az endotélsejteknek, de a fibroblasztok számára mitogének, ezáltal fibrózis alakul ki. Ez a fibrózis lehet a felelős a mellékhatások kialakulásáért (6. ábra).

- **A nagy RILA érték esetében:**

Ebben az esetben, a sejttöregedés kisebb valószínűséggel következik be, így a sejtek nagyobb mértékben reagálnak az apoptózissal a sugárzásra, így nem alakul ki fibrózis (6. ábra).



6. ábra: A RILA értékek sejtbioológiai háttere. (Ariane Lapierre *et al.*, Cancers, 2022. alapján módosítva)

4. Célkitűzések

TDK dolgozatom célja, hogy bemutassam kutatócsoportunk cervix tumoros betegek mintáin végzett sugárérzékenység vizsgálat fejlesztését, amelyben én is aktívan részt veszek. A sugárterápia során a betegek 5-10%-ánál súlyos mellékhatások alakulnak ki, ezért szükséges ennek a módszernek a kidolgozása.

Ehhez olyan 18-75 év közötti cervix tumoros betegektől vettünk vérmintát, akik definitív radiokemoterápiás kezelést kapnak. Ezeknek a betegeknek a vérmintáiból RILA mérést végeztünk és két évig monitorozzuk majd a sugárterápia következtében kialakult mellékhatásokat. A betegektől vérmintát veszünk a kezelések előtt (ebből a mintából végezzük el a RILA mérést), és a kezelések után 3 hónappal, 1 évvel, és 2 évvel. A fehérvérsejt populáción belül a limfocitákat, azon belül is az apoptotikus sejtek mennyiségét mérjük. A limfocita típusok, amelyeket vizsgálunk: $CD8^+$ (citotoxikus T sejt, T_c) és a $CD4^+$ (segítő T sejt, T_h). A kezelést követő mintákból citrullin fehérje mérését tervezzük, mivel ezt összefüggésbe hozták a gasztrointesztinális mellékhatásokkal (Yoneyama *et al.*, 2019). Minden mintavételi pontnál a mellékhatások monitorozására kérdőívet töltünk ki a betegekkal, illetve képalkotó vizsgálat is készül, így a RILA eredményeket a mellékhatásokkal tudjuk majd validálni.

Munkánk során célunk volt laborunkban beállítani a RILA vizsgálatot cervix tumoros betegek esetében. A RILA határértékek centrumokként, és betegcsoportonként változhatnak, így meg szeretnénk volna határozni az Országos Onkológiai Intézetben kezelt cervix tumoros betegeink esetében. Továbbá célunk volt a RILA vizsgálat egyszerűsítése, hogy más laborok is át tudják venni, így elterjedt vizsgálat lehessen. Megvizsgáltuk, hogy szükséges-e a CO_2 gáz jelenléte a vérminták tenyésztése során, hogy van-e összefüggés az egyes tárolási és feldolgozási időpontok és a RILA értékek között, illetve lerövidíthető-e a vizsgálat 4 napról 3 napra. Végül megvizsgáltuk, hogy lehetséges-e a minták besugárzását kiváltani bleomycin kezeléssel, így nem venné el a gépidőt a minták besugárzása.

Kutatómunkám során az alábbi munkafolyamatokban vettem részt:

- vérminták feldolgozása
- a RILA minták előkészítése, besugárzása, tenyésztése
- bleomycin kezelés
- FACS mérések

5. Vizsgálati módszerek

5.1. A kutatásban résztvevő betegcsoport:

A kutatásunk során, olyan 18 és 75 év közötti cervix tumoros betegeket vontunk be, amelyek radiokemoterápiás kezelésben részesültek. A sugárterápia során a kismedence területe került besugárzásra (besugárzási dózis: 50,4/1,8 Gy), illetve nyirokcsomó áttét esetében a nyirokcsomók (besugárzási dózis: 56/2 Gy) is. Ezzel egyidejűleg kaptak kemoterápiás kezelést: 5 ciklus ciszplatint. A ciszplatin, vagy cisz-diaminminiklór-platina, egy nehézfém komplex, amely lassú adagolásban hatásosabb, mivel ekkor a G₁ fázisban sokkal intenzívebben tud hatni az ott lévő sejtekre. Képes keresztkötéseket létrehozni a DNS-ben lévő purin bázisokkal, így megakadályozza a DNS javítását, és apoptózist indukál (Aldossary, 2019) (Dasari and Tchounwou, 2014). A teleterápiát és kemoterápiát követően pedig brachyterápiás kezelést kaptak a betegek (besugárzási dózis: 4 alkalommal 7 Gy-t). Természetesen a protokoll betegenként kis mértékben eltérő lehet, annak függvényében, hogy a beteg miként viselte a kezelést, ugyanis személyre szabott kezelést alkalmaztak minden beteg esetében

5.2. A citrullin méréshez szükséges minták előkészítése:

A RILA vizsgálathoz nem használt vérből Ficoll gradient centrifugálással való PBMC (peripheral blood mononuclear cell) elválasztást végeztünk. Ez a metodika a vér szeparálásáért felel, hogy a fehérvérsejteket és a plazmát el tudjuk különíteni a vérből, és hogy hosszútávon tudjuk tárolni oly módon, hogy ezeket a későbbiekben is fel tudjuk majd használni. A betegtől levett vér Li-heparinos csőben érkezik (18-27 ml). A vért lecentrifugáljuk 3000 rpm fordulatszámon 10 percig, majd óvatosan leszívjuk a plazmát és fagyasztócsövekbe helyezük, amelyeket először Mr.Fosty-ba (izopropanolos edény, ez felel a sejtek gyors és egyenletes fagyasztásáért) tesszük, majd -80 °C-os hűtőbe helyezük. Amennyi plazmát leszívtunk, annyi PBS-el töltjük fel a vért. Egy tiszta tenyésztőcsőbe belepipettázunk 3 ml Histopaqot majd a PBS-el feltöltött vért óvatosan rápipettázuk a Histopaq tetejére. A féket kikapcsoljuk a centrifugán, majd 2500 rpm fordulatszámon 15 percig centrifugáljuk. A kivált „felhő” réteget egy új Falcon csőbe tesszük és 5 ml hideg PBS-t adagolunk hozzá. Ezt 3000 rpm fordulatszámon 10 percig centrifugáljuk. A centrifuga lejártával leöntjük a felülúszót és újra 5 ml hideg PBS-t adunk hozzá. Újra leöntjük a felülúszót a centrifuga lejártával majd végső lépésben csövenként 500 µl FBS, 400 µl RPMI és 100 µl DMSO felfuszpendáljuk a sejteket majd 1000 µl-ként Cryo csövekbe tesszük őket és azokat Mr.Frosty-ba helyezük a plazmák mellé. A plazmákat és a sejteket hosszú távon folyékony nitrogén tartályokban tároljuk. A

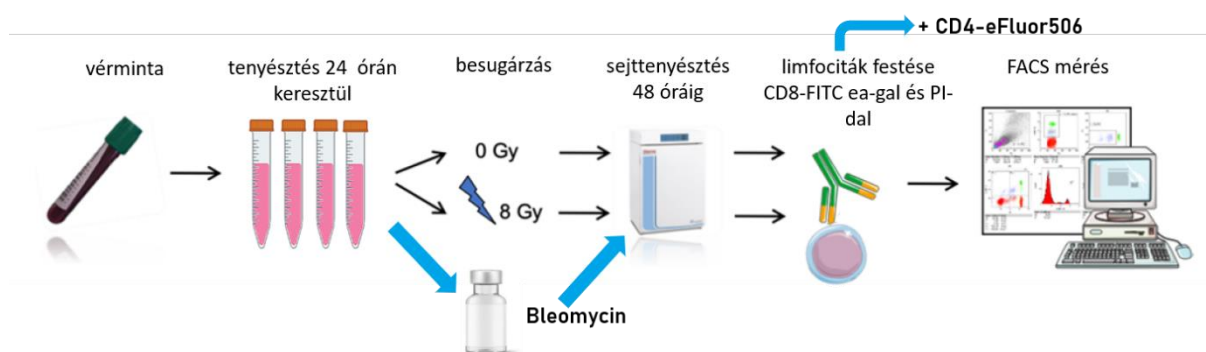
plazma mintákból tervezzük majd a citrullin fehérje mérését ELISA-val vagy kromatorgráfiával.

5.3. RILA (Radiation Induced Lymphocyte Apoptosis) mérés:

A betegektől levett vért sejttenyésztő oldatba tesszük. A 200-200 µl vért pipettázunk 2 db Cryo csőbe és 4 db 15 ml-s Falcon csőbe, majd ezekhez adagolunk 2000 µl tápoldatot (20% FBS + RPMI). A Cryo csövekben lévő mintákat besugarazzuk 8 Gy-el (1 Gy/perc), ennek idejét feljegyezzük. Ezt követően a mintákat 5% CO₂-os termosztátban 37 °C-on tároljuk a besugárzáshoz képest 48 órán át. A 24 óra leteltével a 4 Falconban lévő mintából kettőt 70, illetve 80 µg/ml bleomycinnel kezelünk (a bleomycin egy citosztatikum, mely megakadályozza a sejtek szaporodását, pontosabban a DNS szintézist gátolja, illetve DNS kettős töréseket hoz létre a daganatos sejtekben, tehát hasonló DNS károsodást okoz, mint a sugárkezelés (Bender *et al.*, 1989)) 5 óra elteltével a minták lecentrifugálása és PBS-es mosása után további tápoldatot adagolunk, majd visszahelyezzük őket a termosztátba további 17 órára. Az idő leteltével lecentrifugáljuk a mintákat 5 percig 2500 rpm fordulatszámon, majd 5 µl CD4-eFluor 506 (invitrogen 69-0049-42) és 10 µl CD8-FITC (Merck, Termeclula California 92590, MABF1674) ellenanyagokkal 200 µl PBS-ben, szobahőmérsékleten, fénytől elzártan, folyamatos rázatással, 20 percig jelöljük a sejteket. Ezután 3 ml egyszeres lízis puffert (BD FACS Lysing Solution, 349202) adunk a sejtekhez, hogy a vörösvértestektől megtisztítsuk a mintát, és újra 20 percig fénytől elzárt területen inkubáljuk őket. Ezt követően lecentrifugáljuk a mintákat majd megismételjük az előző lízáló lépést. Újabb centrifugálást, majd 4 ml PBS-es mosást és centrifugálást követően DNS festést végzünk a sejteken. 200 µl FACS pufferben (5 mM EDTA, 25 mM Hepes, 1% BSA, PBS) felvesszük a sejteket, majd 5 µl Propidium-jodidot (PI) és 10 µl RNase-t adunk hozzájuk 2 percig. Az RNase-os kezelésre azért van szükség, hogy a mintában lévő RNS-ekhez ne tudjon kapcsolódni a PI, így ne kapjunk műterméket. Ezt követően tovább higítjuk 200 µl FACS pufferrel, majd átszűrjük 40 µm szűrőn FACS csövekbe (7. ábra). A mérést BD FACS Canto II. Flow Cytometer-en végeztük, BD FACS Diva softwerrel a következő mérési paraméterekkel FSC: 250 V, FSC threshold: 3000 V, SSC: 300 V, FITC: 500 V, FITC threshold: 800V; PE: 350 V, AmCyan: 620 V. Mintánként 4 percig mérünk. A mérés lépsei és egy minta mérési eredménye a Függelék 9.1. fejezetében láthatóak.

Betegenként az alábbi mintákat mértük:

2 db 0 Gy, 2 db 8 Gy, 1 db 70 µg/ml Bleomycin, 1 db 80 µg/ml Bleomycin



7. ábra: A RILA protokoll lépései (Ariane Lapierre et al., Cancers, 2022. alapján módosítva)

5.4. Mellékhatások nyomonkövetése

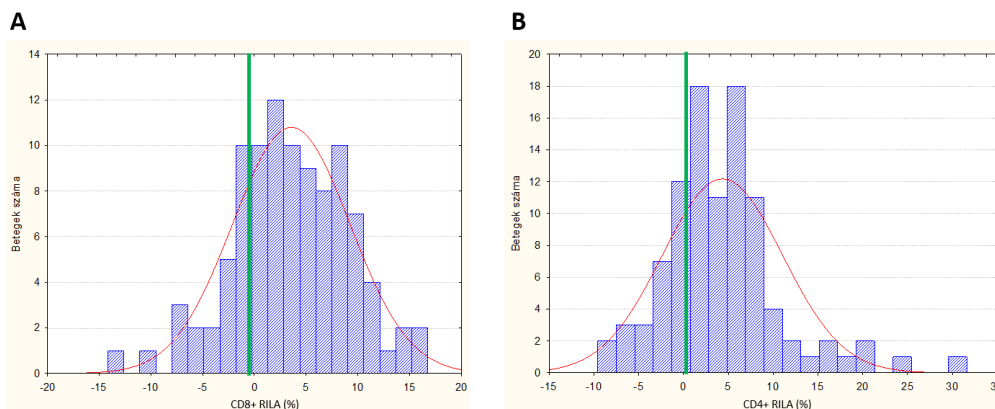
A kutatásban résztvevőket egy írásos tájékoztatóban tájékoztatjuk, a kutatás pontos menetéről. A betegektől 4 alkalommal veszünk vérmintát. Az első vérmintát a kezelést megelőzően vesszük le a betegektől, majd 3 hónap elteltével, 1 év és végül 2 év elteltével vesszük mintákat. Minden alkalommal 2 db 9 ml-s Li-Heparinos cső vért veszünk le a betegektől, ami elenyésző mennyiség, nem terhelő a szervezet számára. Ez vérvételenként 16 cm³ vért jelent, ami a testben keringő vér teljes mennyiségének körülbelül 0,4%-a. Az első alkalommal RILA vizsgálatot végzünk a levett vérből. A további alkalmakon citrullin (az L-citrulin egy nem esszenciális aminosav amely a májban és a belekben termelődik, nagyon specifikus metabolizmussal rendelkezik, a vérben lévő mennyiségekkel a gastrointestinalis mellékhatások kialakulásával (Yoneyama *et al.*, 2019)) aminosavat tervezünk mérni, valamint olyan gyulladásos fehérjék mennyiségét, amelyek összefüggésben lehetnek a mellékhatások súlyosságával, hogy további markereket találhassunk a mellékhatásokhoz (Papadia *et al.*, 2018) (McRae, 2016) (Zhang *et al.*, 2021)

Továbbá minden alkalommal EMBRACE II (Függelék 9.2.), EORTC-QoL-C30 (Függelék 9.3.), és EORTC-Cx24 (Függelék 9.4.) kérdőíveket töltünk ki a betegekkal, hogy monitorozzuk, az estelegesen fellépő mellékhatásokat. Ezek a kérdőívek nemzetközileg elfogadott és használt kérdőívek.

6. Eredmények

6.1. RILA értékek meghatározása cervix tumoros betegek esetében

Eddig 84 beteget vontunk be a vizsgálatunkba. Mindegyik betegnél a kezelés előtti vérvételnél elvégeztük a RILA vizsgálatot és felvettük a kezelés előtti tüneteiket a kérdőívek segítségével. A vérből a RILA méréshez tenyészeteket indítottunk. A megmaradt vért ficolozással szétválasztottuk, és a plazmát és a fehérvérsejteket eltettük későbbi vizsgálatokhoz. A RILA tenyészetekből elvégeztük a RILA vizsgálatot, és megállapítottuk minden betegnél a $CD8^+$ és $CD4^+$ RILA értékeket. A FACS-os mérés során először FSC-SSC dotploton bekapuztuk a limfocita sejtpopulációt, a limfociták kis mérete és kis granuláltsága alapján. Ezt követően elkülönítettük a $CD8^+$ sejteket a FITC fluoreszcens jel, illetve a $CD4^+$ sejteket az AmCyan fluoreszcens jel segítségével. Ezen belül pedig a méret és DNS tartalom, amit propídium-jodiddal (PI) jelöltünk (PE fluoreszcens jellel detektáltunk), alapján azonosítottuk az apoptotikus testeket, mivel a kis méretű, kisebb PI jellel fognak rendelkezni az apoptotikus testek (Crompton *et al.*, 1999). A PI ép sejtmembránon nem képes áthatolni, így csak a halott sejteket fogja megjelölni (Crowley *et al.*, 2016). Az így mért mintákból megállapítottuk a RILA értékeket, amit úgy kaptunk meg, hogy a 8 Gy-el besugarazott minták mért értékéből kivontuk a kontroll (0 Gy) minták eredményét. Ezt követően pedig meghatároztuk a cervix tumoros betegeinkre vonatkozó határértékeket $CD4^+$ (0,28%) és $CD8^+$ (-0,03%) limfociták esetében is (8. ábra), amit az alsó kvadráns megállapításával tettünk meg. Ennél az értéknél kisebb RILA értékkel rendelkező betegek nagy valószínűséggel sugárérzékenyek, így náluk feltételezhetően ki fognak alakulni késői mellékhatások, ezért az ő kezelésük esetében módosítani lehetne a protokollt. A mért értékeink nagyon hasonlóak az eddigi irodalmi adatokhoz, azonban a végleges határérték megállapításához még validálni kell ezeket az adatokat a mellékhatásokkal.



8. ábra: A RILA értékek eloszlása és a határértékek $CD8^+$ és $CD4^+$ limfociták esetében cervix tumoros betegeknél: A. $CD8^+$ limfocitákra vonatkozó RILA értékek és a határérték: -0,03 % (n=84) B. $CD4^+$ limfocitákra vonatkozó RILA értékek és a határérték: 0,28% (n=84)

6.2. RILA mérés beállítása

Szeretnénk a RILA mérést más laborokban is bevezetni, hogy minél elterjedtebb vizsgálat lehessen, ezért megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés az egyes tárolási és feldolgozási időpontok (tárolási idő, preirradiációs idő, posztirradiációs idő, FACS mérés előtti idő, teljes feldolgozási idő) és a RILA értékek között. A tárolási idő az az idő, ami a vérvételi időpont és a táp hozzámérése között eltelik. A preirradiációs idő a besugárzás előtti inkubációs idő (a táp hozzáadása és a besugárzás közti idő). A posztirradiációs idő a besugárzást követő inkubációs idő (a besugárzás után a vörösvértestek líziséig eltelt idő). A FACS mérés előtti idő pedig a vörösvértestek lízisétől a FACS mérésig eltelt idő. Azt találtuk, hogy csak a CD4⁺ limfociták esetében a posztirradiációs idő növekedése változtatott szignifikánsan a RILA értékeken, a CD8⁺ limfociták esetében pedig egyik tárolási vagy feldolgozási idő változása sem változtatott szignifikánsan a RILA értékeken (1. táblázat). A posztirradiációs idő növekedését ki tudjuk küszöbölni, ha az egyes feldolgozási lépéseket mindig ugyanannyi idő elteltével végezzük el, így a CD4⁺ limfociták esetében tapasztalt változást meg tudjuk oldani. Tehát megállapíthatjuk, hogy a módszer beállítottak tekinthető.

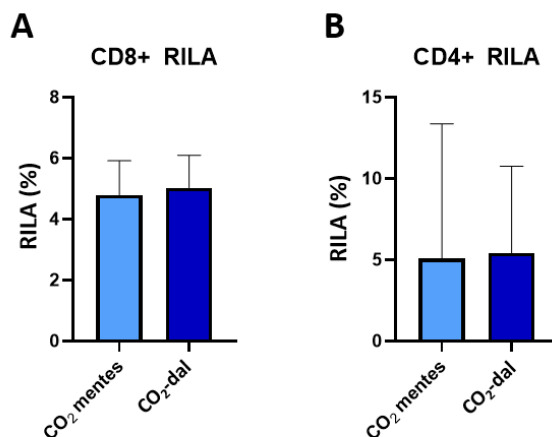
	tárolási idő (h)	preirradiációs idő(h)	posztirradiációs idő (h)	FACS mérés előtti idő (h)
CD8+	0,0325	-0.134	-0.106	-0.019
CD4+	-0.093	-0.125	-0.222	-0.049

1. táblázat: Spearman korrelációs koefficiensek a preparálási idők és a RILA eredmények között: Csak a CD4⁺ limfociták esetében a posztirradiációs időnél volt szignifikáns különbség (n=84). Szignifikancia esetén: a pozitív korrelációnál: kicsi: [0-0,5]; közepes: [0,5-0,7]; nagy: [0,7-1,0]; negatív korrelációnál: kicsi: [0--0,5]; közepes: [-0,5--0,7]; nagy: [-0,7--1,0].

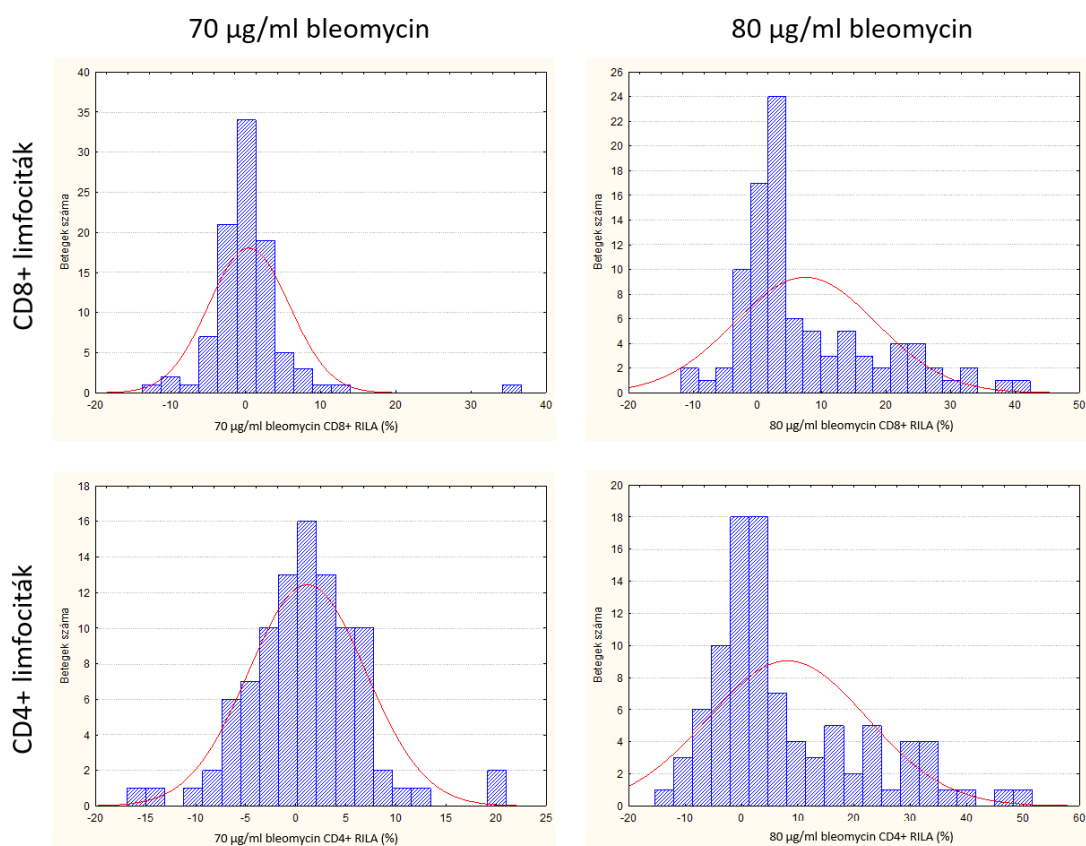
6.3. RILA módszer egyszerűsítése

Célunk volt a RILA módszer egyszerűsítése annak érdekében, hogy más laborok is könnyen át tudják venni, és így a klinikumban elterjedt vizsgálat lehessen. Az irodalom alapján CO₂ használatára lenne szükség a vér tenyésztése során, azonban valójában a limfociták tenyésztéséhez nem szükséges (Azria *et al.*, 2015) (Bender *et al.*, 1989). A kromoszóma preparátumok készítésénél a limfociták tenyésztéséhez laborunk sem használ CO₂-ot, így megvizsgáltuk, hogy elhagyható-e, hiszen ez is könnyítené a módszer elterjedését más laborokban, ahol nincs olyan felszerelés, hogy CO₂ használata lehetséges lenne. Nem találtunk szignifikáns különbséget sem a CD8⁺, sem a CD4⁺ limfociták esetében a CO₂ mentes és CO₂-

os tenyésztés esetében a RILA értékek között (9. ábra). Így megállapíthatjuk, hogy a CO₂ alkalmazása elhagyható.



9. ábra: RILA értékek CO₂ mentes és CO₂-dal való tenyésztést követően: A. CD8⁺ limfociták esetében (p=0,7650) B. CD4⁺ limfociták esetében (p=0,8198). Egyik limfocitánál sem találtunk szignifikáns különbséget a CO₂ mentes és CO₂-dal való tenyésztés RILA értékei között. Párosítatlan t-tesztet alkalmaztunk, az átlag + szórás lett ábrázolva .



10. ábra: A RILA értékek eloszlása 70 és 80 µg/ml koncentrációjú bleomycin kezelést követően CD8⁺ és CD4⁺ limfociták esetében. Mindkét koncentráció a sugározott mintákhoz hasonló eloszlást mutatott (n=84).

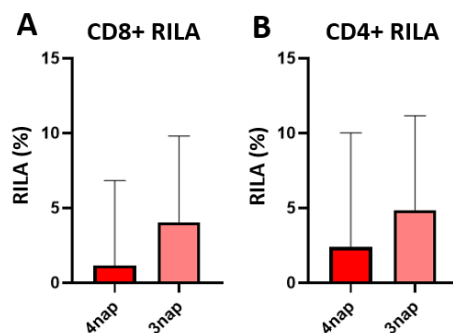
A vizsgálathoz a vér besugárzása szükséges, ami elveszi a gépidőt, így nagyszámú beteg esetén problémát jelenthet, ezért megvizsgáltuk, hogy a sugárzás kiváltható-e bleomycin alkalmazásával. A bleomycin olyan kemoterápiás szer, amely sugármimetikum, tehát hasonló

DNS károsodást okoz, mint a sugárkezelés, így alkalmas lehet a sugárzás modellezésére (Bender *et al.*, 1989). Egy francia cég már kidolgozta, hogyan lehet alkalmazni a bleomycint erre a mérésre, azonban ez nem publikus adat, így nekünk kellett kikísérleteznünk, hogy mi lehet a megfelelő koncentráció és alkalmazási idő. Laborunk a kromoszóma preparátumok készítésénél használja a bleomycint, és ehhez hasonlóan ennél a vizsgálatnál is a tenyésztés második napján (24 órával a mérés előtt) 5 órán át alkalmazott bleomycin kezelés tűnik a leghatékonyabbnak. Továbbá a 70 és 80 µg/ml koncentráció mutatta a sugárkezeléshez leghasonlóbb eloszlást (10. ábra). Azonban a végleges koncentráció megállapításához itt is az eredmények mellékhatásokkal való validálására van még szükség.

Az irodalomban vitatott, hogy szükséges-e a besugárzás előtt tenyésztési nap (Talbot *et al.*, 2019). Ha ez a tenyésztési lépés elhagyható lenne, akkor a vizsgálat kivitelezése 4 nap helyett 3 napra csökkenthető lenne, így akár több mintát lehetne egy héten vizsgálni. Ezért elkezdtük a minták 3 és 4 napos vizsgálatát is. Először megvizsgáltuk, hogy az egyes tárolási és feldolgozási időpontok a 3 napos tenyésztésnél befolyásolják-e a RILA értékeket. A CD8⁺ limfociták esetében egyik idő változása sem okozott szignifikáns változást a RILA értékekben, míg a CD4⁺ limfociták esetében 4 napos protokollnál csak a FACS mérés előtti idő növekedése mutatott szignifikáns változást (2. táblázat).

		tárolási idő (h)	preirradiációs idő(h)	posztirradiációs idő (h)	FACS mérés előtti idő (h)	Teljes feldolgozási idő (h)
3 napos protokoll	CD8 ⁺	0.037	0.085	-0.087	-0.006	-0.039
	CD4 ⁺	-0.039	0.057	-0.224	0.085	-0.116
4 napos protokoll	CD8 ⁺	0.001	-0.089	-0.186	0.003	-0.259
	CD4 ⁺	-0.337	0.203	-0.172	-0.418	0.179

2. táblázat Spearman korrelációs koefficiensek a preparálási idők és a RILA eredmények között 3 és 4 napos protokollal. Csak a CD4⁺ limfociták esetében 4 napos protokollnál a FACS mérés előtti idő növekedése mutatott szignifikáns változást (n=26).



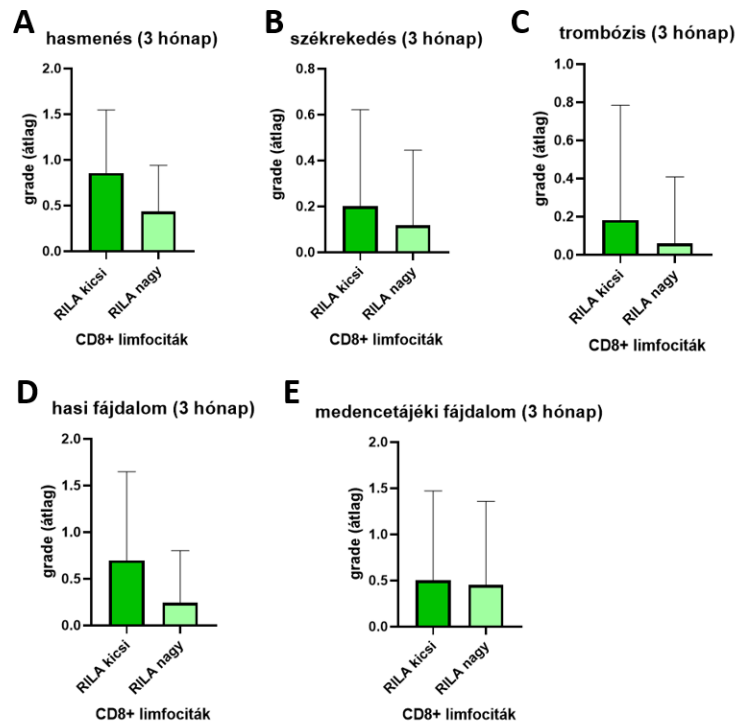
11. ábra: RILA értékek 3 és 4 napos tenyésztést követően. Sem a A. CD8⁺ limfociták esetében ($p=0,1000$), sem a B. CD4⁺ limfociták esetében nem volt szignifikáns különbség ($p=0,1085$). Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk, az átlag + szórás lett ábrázolva.

A 3 és 4 napos értékek között sem volt szignifikáns különbség (11. ábra). Ahhoz azonban, hogy biztosan meg tudjuk állapítani, hogy a 3 napos mérés mennyire megfelelő még szükség van a mellékhatások 2 éven át tartó nyomon követésére.

6.4. Mellékhatások nyomon követése

Betegeinknél a kialakult mellékhatásokat 2 évig kérdőívek és képalkotó vizsgálatok segítségével követjük a kezelés után. Eddig a betegcsoportunkból 42 ember jutott el a 3 hónapos időpontig, így ebből az időpontból van előzetes eredményünk a mellékhatásokra vonatkozóan. 3 hónapnál mellékhatások mértékében még nincs szignifikáns különbség a kis és nagy RILA csoportok mellékhatás értékei között (12. ábra), ami valószínűleg annak köszönhető, hogy a RILA a késői mellékhatások kimutatására alkalmas módszer, így feltételezhetően az 1 és 2 éves mérési pontoknál lesz különbség a kis és nagy RILA értékkel rendelkező csoportok között (Bregues *et al.*, 2017) (Bregues *et al.*, 2017).

Eddigi eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a CD8⁺ limfociták érzékenyebben reagálnak a sugárzásra, mint a CD4⁺ limfociták. Irodalmi adatok alapján pedig elmondható, hogy a CD8⁺ limfociták RILA értéke jobban korrelál a mellékhatásokkal, így ezeknek a sejteknek a vizsgálatával jobban ki lehet mutatni a sugárérzékeny betegeket (Ozsahin *et al.*, 1997) (Ozsahin *et al.*, 2005). Az 5. ábrán ezért a CD8⁺ limfociták RILA értékeit ábráztuk, és azokat a mellékhatásokat mutatjuk be, amelyek 3 hónapnál megjelentek a betegeinknél.



12. ábra: CD8+ limfociták RILA értékek 3 hónappal a kezelést követően jelentkező mellékhatásokkal validálva: A. hasmenés ($p=0,1293$) B. székrekedés ($p=0,6059$) C. trombózis ($p>0,999$) D. hasi fájdalom ($p=0,0711$) E. medencetájéki fájdalom ($p=0,8565$). Egyik esetben sincs szignifikáns különbség a kis és nagy RILA értékkel rendelkező betegek csoportjai között. Mann-Witney tesztet alkalmaztunk, az átlag + szórás lett ábrázolva.

7. Összefoglalás

A sugárkezelés okozta mellékhatások, amelyek lehetnek korai vagy késői mellékhatások, a betegek jelentős részét érintik. Ezeknek a megjelenése és erőssége egyénenként teljesen eltérő lehet, abban az esetben is, ha a betegek azonos mennyiségű sugárdózist kapnak egy kezelés során. Ezért szükség lenne a kezelés megkezdése előtt letesztelni az egyéni sugárérzékenységet a pácienseknél, így annak függvényében lehetne módosítani a kezelésüket.

Jelenleg még nincs egy elfogadott vizsgálati módszer, amelyet alkalmazni lehetne a sugárérzékenység mérésére. Ezért célunk volt kialakítani egy olyan módszert, amely könnyedén alkalmazható, rövid időn belül kiértékelhető, és nem túl drága. A TDK munkám során a RILA (Radiation Induced Lymphocyte Apoptosis) módszert finomítottuk, és eddigi méréseink alapján ígéretes eredményeket kaptunk. Legfőbb célunk az volt, hogy olyan vizsgálatot alakítsunk ki, amely a klinikumban alkalmazható lehessen és más laboratóriumok is könnyen át tudják venni.

A módszer önmagában a betegek számára a lehető legkevesebb kellemetlenséggel jár, hiszen vérmintából végezzük a mérést, illetve elenyésző mennyiségű vérre van szükség hozzá. A kutatásba olyan betegek kerültek bevonásra, akik 18-75 év közötti cervix tumor miatt radiokemoterápiás kezelést kaptak. Azért esett a választásunk a cervix tumoros betegekre, mivel nők körében ez az egyik leggyakrabban előforduló tumortípus az egész világon, és a sugárkezelés okozta késői mellékhatások jelentős mértékben rontják a betegek életminőségét.

Az eddig elért eredményeink közé sorolhatjuk, hogy sikerült a RILA mérést beállítani laborunkban. Meghatároztuk a RILA határértékeket cervix tumoros betegek esetében a $CD4^+$ (0,28%) és a $CD8^+$ (-0,03%) limfocitákra nézve. Azok a betegek, akik ezeknél az értékeknél kisebb RILA értékkel rendelkeznek nagy valószínűséggel sugárérzékenyek, így már a kezelés megkezdése előtt náluk módosítani lehetne majd a protokollt, ezzel elkerülve a késői mellékhatások kialakulását, amelyek nagymértékben rontják a betegek életszínvonalát. Munkánk során egyszerűsítettük a mérési protokollt. Nem találtunk szignifikáns különbséget a CO_2 -os és a CO_2 mentes tenyésztés között, ezért ezt elhagyhatónak tekintjük a további vizsgálatokhoz. A minták besugárzás előtti tenyésztési napjának szükségessége az irodalomban eléggé vitatott, ezért méréseket végtünk 3 és 4 napos mintákon is. Eddig nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, azonban a teljes protokoll lerövidítéséhez még szükség van a mellékhatások kiértékeléséhez. A mintáknak a besugárzását szeretnénk kiváltani, hogy ne vegyen el gépidőt a betegektől, illetve, hogy olyan laborokban is elvégezhető legyen a vizsgálat,

ahol nincs lehetőség használniuk besugárzó készüléket. Ezt 70 és 80 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú bleomycin kezeléssel próbáltuk kiváltani, hiszen a bleomycin hasonló DNS károsodásokat okoz, mint a sugárkezelés. Ahhoz, hogy eldöntsük melyik koncentráció a legalkalmasabb a besugárzás kiváltására még szintén szükség van a mellékhatásokkal való validálásra.

További céljaink közé tartozik a citrullin, és olyan gyulladásos fehérjék mennyiségnek mérése, amelyek összefüggésben lehetnek a mellékhatások kialakulásával, hogy további markereket találhassunk a sugárérzékenység kimutatására. A mellékhatások kiértékelését követően a RILA módszer protokolljának véglegesítése, és a mérési módszer klinikumba való elterjedésének segítése.

8. Irodalmijegyzék

- Alberts, B. (ed.) (2002) *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science.
- Aldossary, S.A. (2019) 'Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin', *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(1), pp. 07–15. Available at: <https://doi.org/10.13005/bpj/1608>.
- Allen, C., Her, S. and Jaffray, D.A. (2017) 'Radiotherapy for Cancer: Present and Future', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 109, pp. 1–2. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.01.004>.
- Apoptózis* (2002). Budapest: Medicina.
- Arvanitis, M. *et al.* (2013) 'Apoptosis in *C. elegans*: lessons for cancer and immunity', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, p. 67. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00067>.
- Azria, D. *et al.* (2015) 'Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial', *EBioMedicine*, 2(12), pp. 1965–1973. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.10.024>.
- Azria, D. *et al.* (2017) 'Data-Based Radiation Oncology: Design of Clinical Trials in the Toxicity Biomarkers Era', *Frontiers in Oncology*, 7, p. 83. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00083>.
- Azria, D. *et al.* (2018) 'Personalizing Breast Cancer Irradiation Using Biology: From Bench to the Accelerator', *Frontiers in Oncology*, 8, p. 83. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00083>.
- Bender, M.A. *et al.* (1989) 'Chromosomal aberration and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample II. Extension of age range', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 212(2), pp. 149–154. Available at: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(89\)90065-1](https://doi.org/10.1016/0027-5107(89)90065-1).
- Bornemisza, G. and Pávó, G. (2012) 'Sugárvédelmi gyakorlat fizikushallgatóknak', 15 November.
- Brengues, M. *et al.* (2017) 'T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues', *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(2), pp. 119–127. Available at: <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1271715>.
- Brummelman, J., Pilipow, K. and Lugli, E. (2018) 'The Single-Cell Phenotypic Identity of Human CD8⁺ and CD4⁺ T Cells', in *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 63–124. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.007>.
- Burma, S., Chen, B.P.C. and Chen, D.J. (2006) 'Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity', *DNA Repair*, 5(9–10), pp. 1042–1048. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.05.026>.

Cenerenti, M. *et al.* (2022) 'The Era of Cytotoxic CD4 T Cells', *Frontiers in Immunology*, 13, p. 867189. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867189>.

Chang, H.H.Y. and Lieber, M.R. (2016) 'Structure-Specific nuclease activities of Artemis and the Artemis: DNA-PKcs complex', *Nucleic Acids Research*, 44(11), pp. 4991–4997. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw456>.

Collins, A.R. *et al.* (2008) 'The comet assay: topical issues', *Mutagenesis*, 23(3), pp. 143–151. Available at: <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>.

Crompton, N.E.A. *et al.* (1999) 'Altered apoptotic profiles in irradiated patients with increased toxicity', *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, 45(3), pp. 707–714. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(99\)00256-4](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(99)00256-4).

Crowley, L.C. *et al.* (2016) 'Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry', *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(7), p. pdb.prot087163. Available at: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087163>.

Cselik, Z. *et al.* (2014) *Sugárterápia*. Edited by Á. Kovács. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.

D'Arcy, M.S. (2019) 'Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy', *Cell Biology International*, 43(6), pp. 582–592. Available at: <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.

Dasari, S. and Tchounwou, P.B. (2014) 'Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action', *European Journal of Pharmacology*, 740, pp. 364–378. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.

Datta, S.K. (2023) 'Radiosensitivity', in Datta, S. K., *Induced Mutation Breeding*. Singapore: Springer Nature Singapore, pp. 95–108. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-19-9489-0_6.

Deng, X. *et al.* (2017) 'Brachytherapy in the treatment of breast cancer', *International Journal of Clinical Oncology*, 22(4), pp. 641–650. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10147-017-1155-5>.

Dilalla, V. *et al.* (2020) 'Radiotherapy side effects: integrating a survivorship clinical lens to better serve patients', *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 27(2), pp. 107–112. Available at: <https://doi.org/10.3747/co.27.6233>.

Elgazzar, A.H. and Kazem, N. (2006) 'Biological Effects of Ionizing Radiation', in A.H. Elgazzar (ed.) *The Pathophysiologic Basis of Nuclear Medicine*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 540–548. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-540-47953-6_23.

Fernandes, D.C.R. and Andreyev, H.J.N. (2021) 'Gastrointestinal Toxicity of Pelvic Radiotherapy: Are We Letting Women Down?', *Clinical Oncology*, 33(9), pp. 591–601. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clon.2021.04.009>.

Guogytè, K. *et al.* (2017) 'Assessment of Correlation between Chromosomal Radiosensitivity of Peripheral Blood Lymphocytes after In vitro Irradiation and Normal Tissue Side Effects for Cancer Patients Undergoing Radiotherapy', *Genome Integrity*, 8, p. 1. Available at: <https://doi.org/10.4103/2041-9414.198907>.

Hannoun-Lévi, J.-M. and Peiffert, D. (2014) ‘Dose rate in brachytherapy using after-loading machine: Pulsed or high-dose rate?’, *Cancer/Radiothérapie*, 18(5–6), pp. 437–440. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2014.07.156>.

Immunológia (2012). Budapest: Medicina Kiadó Zrt.

Joiner, M. and Kogel, A. van der (eds) (2018) *Basic clinical radiobiology*. Fifth edition. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group.

Kálmán, E., Sztanyik, L. and Unger, E. (1963) *Sugárbiológia*. Edited by V. Várterész. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.

Kanyár, B. (2005) ‘Ionizáló sugárzások dozimetriája’. *SE Bővített fokozatú sugárvédelmi tanfolyam*, 21 March.

Karius, A. *et al.* (2023) ‘Seed-displacements in the immediate post-implant phase in permanent prostate brachytherapy’, *Radiotherapy and Oncology*, 183, p. 109590. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2023.109590>.

Kay, J.E. (1991) ‘Mechanisms of T lymphocyte activation’, *Immunology Letters*, 29(1–2), pp. 51–54. Available at: [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(91\)90198-J](https://doi.org/10.1016/0165-2478(91)90198-J).

Kis, E. (2019) ‘Sugárérzékenységi vizsgálatok: a kolónia-képző assay és a comet-assay próbája’, *Hadmérnök*, 14(1), pp. 138–152. Available at: <https://doi.org/10.32567/hm.2019.1.12>.

Lapierre, A. *et al.* (2022) ‘Improving Patients’ Life Quality after Radiotherapy Treatment by Predicting Late Toxicities’, *Cancers*, 14(9), p. 2097. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers14092097>.

Lees, J.R. (2020) ‘CD8+ T cells: The past and future of immune regulation’, *Cellular Immunology*, 357, p. 104212. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104212>.

Lutz, C.M. *et al.* (2016) ‘Setup error and motion during deep inspiration breath-hold breast radiotherapy measured with continuous portal imaging’, *Acta Oncologica*, 55(2), pp. 193–200. Available at: <https://doi.org/10.3109/0284186X.2015.1045625>.

Maiuri, M.C. *et al.* (2007) ‘Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), pp. 741–752. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2239>.

Manohar, S.M., Shah, P. and Nair, A. (2021) ‘Flow cytometry: principles, applications and recent advances’, *Bioanalysis*, 13(3), pp. 181–198. Available at: <https://doi.org/10.4155/bio-2020-0267>.

McKinnon, K.M. (2018) ‘Flow Cytometry: An Overview’, *Current Protocols in Immunology*, 120(1). Available at: <https://doi.org/10.1002/cpim.40>.

McRae, M.P. (2016) ‘Therapeutic Benefits of l-Arginine: An Umbrella Review of Meta-analyses’, *Journal of Chiropractic Medicine*, 15(3), pp. 184–189. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcm.2016.06.002>.

Mettler, F.A. (2012) 'Medical effects and risks of exposure to ionising radiation', *Journal of Radiological Protection*, 32(1), pp. N9–N13. Available at: <https://doi.org/10.1088/0952-4746/32/1/N9>.

Miller, D.R. and Thorburn, A. (2021) 'Autophagy and organelle homeostasis in cancer', *Developmental Cell*, 56(7), pp. 906–918. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.02.010>.

Minniti, G., Goldsmith, C. and Brada, M. (2012) 'Radiotherapy', in *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp. 215–228. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52138-5.00016-5>.

Mitchell, J., Formenti, S.C. and DeWyngaert, J.K. (2010) 'Interfraction and Intrafraction Setup Variability for Prone Breast Radiation Therapy', *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 76(5), pp. 1571–1577. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.07.1683>.

Mittrücker, H.-W., Visekruna, A. and Huber, M. (2014) 'Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells', *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(6), pp. 449–458. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>.

Moneef, M.A.L. *et al.* (2003) 'Measurements using the alkaline comet assay predict bladder cancer cell radiosensitivity', *British Journal of Cancer*, 89(12), pp. 2271–2276. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601333>.

Mousset, C.M. *et al.* (2019) 'Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry', *Cytometry Part A*, 95(6), pp. 647–654. Available at: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23724>.

Mura, M. *et al.* (2020) 'Optimized flow cytometric protocol for the detection of functional subsets of low frequency antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells', *MethodsX*, 7, p. 101005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101005>.

Naszály, A. and Patonay, P. (2001) 'A radiokemoterápia biológiai alapjai', *Magyar onkológia*, 45(4), pp. 323–326.

National Research Council (U.S.) (ed.) (1990) *Health effects of exposure to low levels of ionizing radiation: BEIR V*. Washington, D.C: National Academy Press (BEIR, 5).

Nias, Anthony Hugh Wade and Nias, A. H. W. (1998) *An introduction to radiobiology*. 2nd ed. Chichester Weinheim: Wiley.

Oyouni, A.A.A. (2023) 'Human papillomavirus in cancer: Infection, disease transmission, and progress in vaccines', *Journal of Infection and Public Health*, 16(4), pp. 626–631. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.02.014>.

Ozsahin, M. *et al.* (1997) 'Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes', *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 38(2), pp. 429–440. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(97\)00038-2](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(97)00038-2).

Ozsahin, M. *et al.* (2005) 'CD4 and CD8 T-Lymphocyte Apoptosis Can Predict Radiation-Induced Late Toxicity: A Prospective Study in 399 Patients', *Clinical Cancer Research*, 11(20), pp. 7426–7433. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2634>.

Papadia, C. *et al.* (2018) ‘Citrulline in health and disease. Review on human studies’, *Clinical Nutrition*, 37(6), pp. 1823–1828. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.10.009>.

Pesznyák, C. and Sáfrány, G. (2017) *Sugárbiológia*.

Pietenpol, J.A. and Stewart, Z.A. (2002) ‘Cell cycle checkpoint signaling’, *Toxicology*, 181–182, pp. 475–481. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00460-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00460-2).

Pulay, T. (no date) ‘A méhnyakrák’, *Magyar orvos* [Preprint].

Ray, A. and Langer, M. (2002) ‘Homologous recombination: ends as the means’, *Trends in Plant Science*, 7(10), pp. 435–440. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02327-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02327-0).

Rye, C. *et al.* (2016) *Biology*. Houston, Texas: OpenStax. Available at: <https://openstax.org/books/biology/pages/1-introduction>.

Schaue, D. and McBride, W.H. (2015) ‘Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer’, *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 12(9), pp. 527–540. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.120>.

Schnarr, K. *et al.* (2007) ‘Individual radiosensitivity and its relevance to health physics’, *Dose-Response: A Publication of International Hormesis Society*, 5(4), pp. 333–348. Available at: <https://doi.org/10.2203/dose-response.07-022.Schnarr>.

Shen, S. *et al.* (2020) ‘Potential role of microRNAs in the treatment and diagnosis of cervical cancer’, *Cancer Genetics*, 248–249, pp. 25–30. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2020.09.003>.

Small, W. *et al.* (2017) ‘Cervical cancer: A global health crisis: Cervical Cancer: A Global Health Crisis’, *Cancer*, 123(13), pp. 2404–2412. Available at: <https://doi.org/10.1002/cncr.30667>.

Speiser, D.E. *et al.* (2023) ‘CD4+ T cells in cancer’, *Nature Cancer*, 4(3), pp. 317–329. Available at: <https://doi.org/10.1038/s43018-023-00521-2>.

Steinmeier, T., Schulze Schleithoff, S. and Timmermann, B. (2019) ‘Evolving Radiotherapy Techniques in Paediatric Oncology’, *Clinical Oncology*, 31(3), pp. 142–150. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clon.2018.12.005>.

Talbot, C.J. *et al.* (2019) ‘Multi-centre technical evaluation of the radiation-induced lymphocyte apoptosis assay as a predictive test for radiotherapy toxicity’, *Clinical and Translational Radiation Oncology*, 18, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2019.06.001>.

Tanderup, K. *et al.* (2017) ‘Advancements in brachytherapy’, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 109, pp. 15–25. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.09.002>.

Tarrant, J.M. (2005) ‘The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine’, *The Veterinary Journal*, 170(3), pp. 278–288. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.06.010>.

Tsikouras, P. *et al.* (2016) ‘Cervical cancer: screening, diagnosis and staging’, *Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 21(2), pp. 320–325.

Viveros-Carreño, D., Fernandes, A. and Pareja, R. (2023) 'Updates on cervical cancer prevention', *International Journal of Gynecologic Cancer*, 33(3), pp. 394–402. Available at: <https://doi.org/10.1136/ijgc-2022-003703>.

Volkova, L.V., Pashov, A.I. and Omelchuk, N.N. (2021) 'Cervical Carcinoma: Oncobiology and Biomarkers', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), p. 12571. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222212571>.

Vral, A. (2004) 'Chromosomal aberrations and in vitro radiosensitivity: intra-individual versus inter-individual variability', *Toxicology Letters*, 149(1–3), pp. 345–352. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.044>.

White, S. and Mallya, S. (2012) 'Update on the biological effects of ionizing radiation, relative dose factors and radiation hygiene', *Australian Dental Journal*, 57(s1), pp. 2–8. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2011.01665.x>.

Wilkins, R.C. *et al.* (2002) 'The effect of the ratio of CD4 + to CD8 + T-cells on radiation-induced apoptosis in human lymphocyte subpopulations', *International Journal of Radiation Biology*, 78(8), pp. 681–688. Available at: <https://doi.org/10.1080/09553000210144475>.

Yoneyama, T. *et al.* (2019) 'A Citrulline-Based Translational Population System Toxicology Model for Gastrointestinal-Related Adverse Events Associated With Anticancer Treatments', *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 8(12), pp. 951–961. Available at: <https://doi.org/10.1002/psp4.12475>.

Zhang, Y. *et al.* (2021) 'Arginine deprivation as a strategy for cancer therapy: An insight into drug design and drug combination', *Cancer Letters*, 502, pp. 58–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.12.041>.

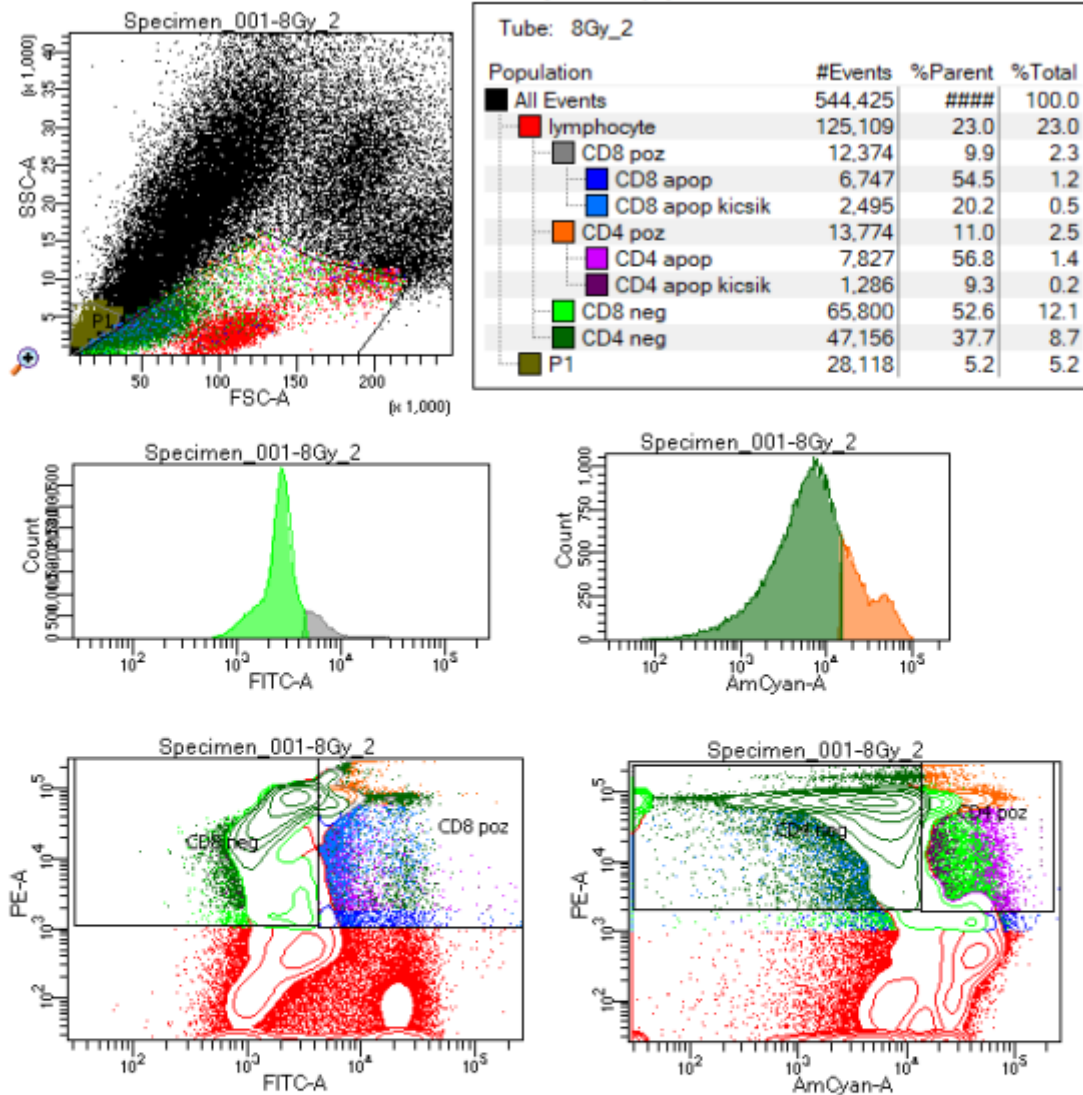
9. Függelék

9.1. RILA mérés laboratóriumi eljárás lépései és eredményei:

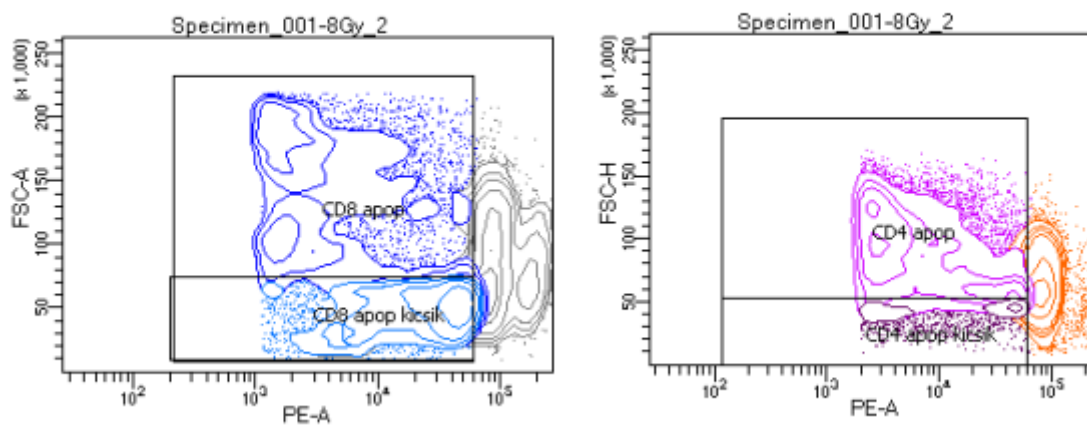


13. ábra: RILA vizsgálat lépései: 1-2. minták besugárzása 3. minták tenyésztése 4. bleomycin kezelés 5. sugározott minták áthelyezése falcon csőbe 6. centrifugálás 7. felülúszó leszívása 8. CD8-FITC ellenanyag hozzáadása 9. CD4-eFluor506 ellenanyag hozzáadása 10. minták sötétbe helyezése 11. minták lízise 12. minták sötétbe helyezése 13. PBS-es mosás utáni állapota a mintáknak 14. PI festés 15. RNáz kezelés 16. minták felfuszpendálása 17. minták hígítása és szűrése 18. minták mérése

BD FACSDiva 9.0



BD FACSDiva 9.0



14. ábra: FACS mérés az egyik beteg 8Gy-el kezelt mintájának

9.2. EMBRACE kérdőív

Név		Hónapok			
Idő		0	3	12	24
Datum					
GI CTC v4.0					
1. Hasmenés		Grade:			
1. A széklet gyakorisága emelkedett, de kevesebb, mint 4x naponta; stoma: mérsékelt cserélési kényszer 2. A széklet ürítés gyakorisága emelkedett napi 4-6 alkalom; infúzió szükséges <24 h; közepes cserélési kényszer stomásoknál; a napi tevékenységet nem befolyásolja 3. A széklet ürítés gyakorisága emelkedett napi ≥7; inkontinencia; infúzió szükséges ≥24 h; kórházi ápolás; gátolja a napi tevékenységet 4. Életet fenyegető következmények (pl.: hemodinamikai kollapszus) 5. Halál					
2. Székrekedés		Grade:			
1. Alkalmoszerű vagy idéglens tünetek; időnként székletlágító, hashajtó, étrend módosítás vagy beöntés 2. Tartós tünetek rendszeres hashajtó vagy beöntés szükséges 3. Gátolja a napi tevékenységben; székrekedés, amelyhez kézi eltávolítás szükséges 4. Életet fenyegető következmények (pl.: bélelzáródás, toxikus megacolon) 5. Halál					
3. Széklet inkontinencia		Grade:			
1. Esetenként szüksége van betétre 2. Mindennap szükséges a betét használata 3. Gátolja a napi tevékenységben; műtéti beavatkozás szükséges					
4. Végbelgyulladás (Proctitis)		Grade:			
1. Rectalis diszkomfort, nem igényel beavatkozást 2. Tünetek jelentkeznek; orvosi beavatkozás szükséges, korlátozza a napi aktivitást 3. Súlyos tünetek, sürgető székelesi inger vagy inkontinencia; gátolja az önellátást vagy a napi aktivitást 4. Életet fenyegető következmények (pl.: perforáció); akut beavatkozást igényel 5. Halál					
5. GI vérzés		Anus	Grade:		
		Rectum	Grade:		
		Sigma	Grade:		
		Colon	Grade:		
		Vékonybel	Grade:		
1. Enyhe, egyéb beavatkozást nem igényel, mint a vas pótlást 2. Tüneti és orvosi beavatkozás, vagy kisebb kauterizálás szükséges 3. Transzfúzió, intervenció radiológia, endoszkópia, vagy műtéti beavatkozás; sugárterápia (ügymint a vérzőoldalon hemostasis) 4. Életet fenyegető következmények; akut beavatkozást igényel 5. Halál					
6. Stenosis		Anus	Grade:		
		Rectum	Grade:		
		Sigma	Grade:		
		Colon	Grade:		
		Vékonybel	Grade:		
1. Tünetmentes; csak klinikai vagy radiológiai lelet 2. Tünetek; megváltozott GI funkció 3. Tünetek és súlyosan megváltozott GI funkció (pl.: megváltozott étkezési szokások, hasmenés, vagy GI folyadék veszteség); infúzió, mesterséges táplálás, vagy teljes parenteralis táplálás szükséges ≥24 h; műtéti beavatkozás szükséges 4. Életet fenyegető következmények; műtéti beavatkozást igényel komplett szervi resectio (pl.: total) 5. Halál					

7. Fistula	Anus	Grade:	
	Rectum	Grade:	
	Sigma	Grade:	
	Colon	Grade:	
	Vékonybél	Grade:	
1. Tünetmentes; csak radiológiai lelet			
2. Tünetek; megváltozott GI funkció (pl.: megváltozott étkezési szokások, hányás, vérzés, hasmenés); infúzió szükséges <24 h			
3. Tünetek és súlyosan megváltozott GI funkció (pl.: megváltozott étkezési szokások, hasmenés, vagy GI folyadék veszteség); infúzió, mesterséges táplálás, vagy teljes parenteralis táplálás szükséges ≥24 h; műtéti beavatkozás szükséges			
4. Életet fenyegető következmények; műtéti beavatkozást igényel komplett szervi resectio (pl.: total colectomia)			
5. Halál			
8. Egyéb gastro/ intestinalis		Grade:	
a)			
b)			
c)			
d)			
ADL: (Activities of daily living) Mindennapi teendők. A mindennapi élet feladatai.			
Self care ADL (napi tevékenység. Vagy önellátás): étkezés, az öltözködés, a felkelés, vagy a lefekvés, a fürdés és a toalett.			
IADL (Instrumental activities of daily living): főzés, pénzkeresés, vásárlás, házimunka, és a telefon			
GU, CTC v3-4.0			
9. Vizelet gyakoriság/ sürgősség		Grade:	
1. Az alapállapothoz képest 2x-er gyakoribb vizelet vagy éjszakai vizelet, bevezetés			
2. Az emelkedés a normálisnál 2x több, de kevesebb, mint óránként			
3. Óránként többször; sürgős vizeleti inger; katéter szükséges			
10. Vizelet inkontinencia		Grade:	
1. Esetenkénti (pl.: köhögéskor, tüsszentéskor, stb.), betét nem szükséges			
2. Spontán, betét szükséges, mindennapi eszközös aktivitást limitálja			
3. A napi tevékenységben gátolja; beavatkozás (pl.: műsphincter, kollegén injekció stb), operáció szükséges, önellátást gátolja			
11. Cystitis		Grade:	
1. Tünetmentes			
2. Neheztelt gyakori vizelet; makroszkópos hematuria			
3. Transzfúzió; iv fájdalomcsillapító injekció; hólyag irrigáció szükséges			
4. Nagyon súlyos vérzés; akut beavatkozás szükséges			
5. Halál			
12. GU vérzés	Hólyag	Grade:	
	Ureter	Grade:	
	Uretra	Grade:	
1. Enyhe, egyéb beavatkozást, mint pl vas pótlás nem igényel			
2. Tüneti és orvosi beavatkozás, vagy kisebb kauterizálás szükséges			
3. Transzfúzió, intervenciós radiológia, endoszkópia, vagy műtéti beavatkozás szükséges; sugárterápia (úgy mint a vérzőoldalon hemostasis)			
4. Életet fenyegető következmények; akut beavatkozást igényel			
5. Halál			
13. Stenosis	Hólyag	Grade:	
	Ureter	Grade:	
	Uretra	Grade:	
1. Tünetmentes; csak radiológiai vagy endoszkópos lelet, intervenció nem szükséges			
2. Tünetek jelentkeznek, de nincs hydronephrosis, sepsis vagy vese dysfunkció; tágtítás vagy katéterezés (hólyag vagy suprapubicus) szükséges			
3. Tünetek és megváltozott szerv funkció (pl.: sepsis vagy hydronephrosis, vagy vese dysfunkció); elektív (radiológiai, endoszkópos vagy sebészi) beavatkozás szükséges			
4. Életet fenyegető következmények; azonnali sürgős műtéti beavatkozást igényel			
5. Halál			

14. Fistula	Hólyag	Grade:	
	Ureter	Grade:	
	Uretra	Grade:	
1. Tünetmentes, csak radiológiai lelet			
2. Tünetek; non-invazív beavatkozást szükséges vagy maximum katéterezés (hólyag vagy suprapubicus) permanens vizelet deviáció			
3. Tünetek gátolják az önellátást, elektív (radiológiai, endoszkópos vagy sebészi) beavatkozás szükséges			
4. Életet fenyegető következmények; azonnali sürgős műtéti beavatkozást igényel			
5. Halál			
15. Egyéb hólyag		Grade:	
a)			
b)			
c)			
d)			

Vagina, CTC v4.0			
Rendszeres vaginális tágitás		Grade:	
0: nincs			
2: igen			
9: nem ismert			
16. Hüvely szárazság		Grade:	
1. Enyhe, nincs hatással a szexuális életre			
2. Gátolja a szexuális funkciót; fájdalmas közösülés, beavatkozás szükséges			
3. Súlyos hüvelyszárazság, fájdalmas közösülés vagy súlyos diszkomfort			
17. Vagina stenosis/ hosszúság		Grade:	
1. Tünetmentes, enyhe hüvely rövidülés vagy szűkület			
2. Hüvely szűkület és/vagy rövidülés nem gátolja a fizikális vizsgálatot			
3. Hüvely szűkület és/vagy rövidülés, mely gátolja a tampon használatot, szexuális életet vagy fizikális vizsgálatot			
18. Vérzés (menstruációt kivéve)		Grade:	
1. Minimális vagy mikroszkopikus vérzés, beavatkozás nem szükséges			
2. Súlyos vérzés, gyógyszeres kezelés			
3. Transzfúzió, radiológiai beavatkozás, endoszkópos vagy műtéti beavatkozás szükséges, sugárterápis (vérzéscsillapítás a vérzés helyén)			
4. Életet fenyegető következmények; azonnali sürgős műtéti beavatkozást igényel			
5. Halál			
19. Fájdalmas közösülés		Grade:	
1. Enyhe diszkomfort vagy fájdalom behatoláskor, mely síkosítókkal vagy ösztrogénnel teljesen			
2. Közepes diszkomfort vagy fájdalom behatoláskor, mely csak részlegesen enyhíthető síkosítókkal vagy			
3. Súlyos diszkomfort vagy fájdalom behatoláskor, mely nem enyhíthető síkosítókkal vagy ösztrogénnel oldható			
20. Vagina mucositis		Grade:	
1. Mucosa erythemája; minimális tünetek			
2. Foltos ulceratio; közepes tünetekkel vagy közösülési képtelenség			
3. Összefolyó ulceráció; vérzés sérüléssel; nem képes elviselni a hüvelyi vizsgálatot, a közösülést vagy a tampon felhelyezését			
4. Szöveti necrosis; szignifikáns spontán vérzés; életet fenyegető következmények			
21. Fistula		Grade:	
1. Tünetmentes, csak radiológiai lelet			
2. Tünetek; non-invazív beavatkozást szükséges			
3. Tünetek gátolják a napi tevékenységben; invazív beavatkozás szükséges			
4. Életet fenyegető következmények; részleges vagy teljes szervi resectio, állandó vizelet elvezetés			
5. Halál			

22. Egyéb hüvely	Grade:
Speciális kategória:	
ADL: (Activities of daily living) Mindennapi teendők. A mindennapi élet feladatai. Self care ADL(napi tevékenység. Vagy önellátás): étkezés, az öltözködés, a felkelés, vagy a lefekvés, a fürdés és a toalett. IADL (Instrumental activities of daily living): főzés, pénzkérés, vásárlás, házimunka, és a telefon	

Nyirokkeringés CTC v4.0	
23. Oedema: végtag	Grade:
1. 5-10 % különbség a két végtag között a térfogatban vagy a körfogatban ahol a látható különbség a legnagyobb; megtekintéskor duzzanat vagy az anatómiai szerkezet megváltozása látható, ujjbenyomatot megtartó oedema	
2. 10 és 30 % közötti a különbség a két végtag között a térfogatban vagy a körfogatban ahol a látható különbség a legnagyobb; könnyedén látható az anatómiai szerkezet megváltozása; bőrredők eltűnése; anatómiai körvonal megváltozása	
3. 30 % feletti a két végtag térfogata közötti különbség; nyirokfolyás; nagy eltérés a normál anatómiai kontúrtól; gátolja a napi tevékenységet	
4. Rosszindulatú progresszió (úgy mint lymphangiosarcoma); amputáció szükséges, rokkantság	
5. Halál	

24. Fájdalom		
	Hasi	Grade:
	Medencetájék	Grade:
	Hát	Grade:
	Izom, csont, lágyrész	Grade:
1. Napi tevékenységgel nem interferáló, enyhe fájdalom		
2. Mérsékelt fájdalom;a fájdalom vagy a fájdalomcsillapító használata zavaró, de a napi tevékenységet nem befolyásolja		
3. Súlyos fájdalom;a fájdalom vagy a fájdalomcsillapító használata zavarja az ADL-t		
4. Bénító fájdalom		

25. Tromboembolikus esemény	Grade:
1. Vénás trombózis (pl. felületes vénákat érintő trombózis)	
2. Vénás trombózis (pl.komplikáció mentes mélyvénás trombózis), gyógyszeres kezelést igényel	
3. Trombózis (pl.komplikáció mentes tüdő embólia [véna], nem-embolias kardialis fali [arteriális]trombus)), gyógyszeres kezelést igényel	
4. Életet veszélyeztető (tüdő embólia, cerebrovaszkuláris esemény, artériás elégtelenség) keringési elégtelenség vagy neurológiai zavar, sürgős beavatkozás szükséges	
5. Halál	

26. Hóhullámok	Grade:
1. Enyhe	
2. Mérsékelt	
3. Mindennapi teendőkben gátolja	

Egyéb, fentiekben nem szerepelt betegség besorolás CTC v4.0	
27. Egyéb, speciális kategória és grade	Grade:
a) ADL: (Activities of daily living) Mindennapi teendők. A mindennapi élet feladatai. Self care ADL(napi tevékenység. Vagy önellátás): étkezés, az öltözködés, a IADL (Instrumental activities of daily living): főzés, pénzkérés, vásárlás, házimunka, és a telefon	

Dohányzás (U=igen/1=nem)/ mennyiség		
Alkohol szedett gyógyszerrel		
Fogamzásgátlót szedett-e/mennyi ideig		
Első menstruáció/Utolsó menstruáció		
Terhesség/ gyerekek száma		

9.3. EORTC QLQ-C30 kérdőív

HUNGARIAN



EORTC QLQ-C30 (version 3)

A következőkben szeretnénk feltenni néhány, az Ön egészségi állapotával kapcsolatos kérdést. Kérjük, hogy az állapotát legjobban leíró számválasz bekarikázásával önállóan válaszoljon minden kérdésre. Nincs "jó" vagy "rossz" válasz. A kérdésekre adott válaszokat szigorúan titkosan kezeljük.

Kérjük, írja ide nevének kezdőbetűit:

--	--	--	--	--

Születési idejét (nap, hónap, év):

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

A kitöltés dátumát (nap, hónap, év):

31

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	Egyáltalán nem	Egy kissé	Meglehe- tően	Nagymér- tékben
1. Gondot okoz-e az Ön számára, ha megerőltető tevékenységet végez, például nehéz bevásárlószatyrot vagy bőröndöt cipel?	1	2	3	4
2. Jelent-e valamilyen problémát egy <u>hosszabb</u> séta?	1	2	3	4
3. Jelent-e valamilyen problémát egy a lakáson kívüli <u>rövid</u> séta?	1	2	3	4
4. Szükséges-e, hogy ágyban vagy karosszékekben legyen a nap folyamán?	1	2	3	4
5. Segítségre szorul-e étkezésnél, öltözködéskor, mosakodásnál vagy WC-használatnál?	1	2	3	4

Az elmúlt héten:

	Egyáltalán nem	Egy kissé	Meglehe- tően	Nagymér- tékben
6. Korlátozva volt-e mindennapi munkájában vagy egyéb szokásos napi tevékenységében?	1	2	3	4
7. Korlátozva volt-e abban, hogy szabadidős tevékenységeinek hódoljon?	1	2	3	4
8. Volt-e légszomja?	1	2	3	4
9. Fájt-e valamije?	1	2	3	4
10. Szüksége volt pihenésre?	1	2	3	4
11. Volt alvászavara?	1	2	3	4
12. Gyengének érezte magát?	1	2	3	4
13. Étvágytalan volt?	1	2	3	4
14. Volt-e hányingere?	1	2	3	4
15. Hányt?	1	2	3	4

Fordítson!

Az elmúlt héten:

	Egyáltalán nem	Egy kissé	Meglehe- tősen	Nagymér- tékben
16. Volt-e székrekedése?	1	2	3	4
17. Volt-e hasmenése?	1	2	3	4
18. Fáradtnak érezte magát?	1	2	3	4
19. Mindennapi tevékenységében gátolta-e fájdalom?	1	2	3	4
20. Nehézséget jelentett-e olyasmire koncentrálnia, mint az újságolvasás vagy TV nézés?	1	2	3	4
21. Feszültnak érezte-e magát?	1	2	3	4
22. Aggódott-e valami miatt?	1	2	3	4
23. Ingerlékenynek érezte-e magát?	1	2	3	4
24. Levertnek érezte-e magát?	1	2	3	4
25. Gondot okozott-e a dolgokat fejben tartani?	1	2	3	4
26. Befolyásolta-e fizikai állapota vagy orvosi kezelése <u>családi</u> életét?	1	2	3	4
27. Befolyásolta-e fizikai állapota vagy orvosi kezelése <u>közösségi</u> tevékenységét?	1	2	3	4
28. Befolyásolta-e fizikai állapota vagy orvosi kezelése az Ön anyagi helyzetét?	1	2	3	4

**A következő kérdéseknél karikázza be azt az 1 és 7 közé eső számot,
amelyik a legjobban illik Önre!**

29. Az előző hétre vonatkozóan hogyan értékelné általános egészségi állapotát?

1 2 3 4 5 6 7

Nagyon rossz

Kitűnő

30. Az előző hétre vonatkozóan hogyan értékelné általános életminőségét?

1 2 3 4 5 6 7

Nagyon rossz

Kitűnő

9.4. EORTC QLQ-CX24 kérdőív

HUNGARIAN



EORTC OLO – CX24

A betegek néha a következő tünetekről vagy problémákról számolnak be. Kérjük, jelölje meg, hogy milyen mértékben tapasztalta ezeket a tüneteket vagy problémákat. Válaszként karikázza be az Önre leginkább jellemző számot.

Az elmúlt héten (7 nap alatt):	Egyáltalán nem	Egy kissé	Meglehetősen	Nagymértékben
31. Voltak hasi görcsei?	1	2	3	4
32. Nehézséget okozott székletürítésének szabályozása?	1	2	3	4
33. Volt vér a székletében ?	1	2	3	4
34. Gyakran vizelt?	1	2	3	4
35. Érzett fájdalmat vagy égető érzést vizeléskor?	1	2	3	4
36. Volt vizeletelcseppenése?	1	2	3	4
37. Okozott nehézséget húgyhólyagjának kiürítése?	1	2	3	4
38. Volt megdagadva egyik vagy mindkét lába?	1	2	3	4
39. Fájt-e a dereka?	1	2	3	4
40. Érzett bizsergést vagy zsibbadást a kézfejében vagy a lábfejében?	1	2	3	4
41. Lépett fel irritáció vagy fájdalom a hüvelyében vagy a külső nemi szervein?	1	2	3	4
42. Volt hüvelyfolyása?	1	2	3	4
43. Volt szokatlan hüvelyvérzése?	1	2	3	4
44. Voltak hőhullámai és/vagy verejtékezése?	1	2	3	4
45. Volt olyan érzése, hogy betegsége vagy a kezelés következtében testileg kevésbé vonzó?	1	2	3	4
46. Volt olyan érzése, hogy betegsége vagy a kezelése következtében kevésbé nőies?	1	2	3	4
47. Elégedetlen volt a testével?	1	2	3	4

Kérjük, folytassa a következő oldalon!

Az elmúlt 4 héten:		Egyáltalán nem	Egy kissé	Meglehetősen	Nagymértékben
48.	Aggódott amiatt, hogy a szexuális együttlét fájdalmas lesz?	1	2	3	4
49.	Szexuálisan aktív volt?	1	2	3	4
Kérjük, csak akkor válaszoljon a következő kérdésekre, ha az elmúlt 4 hét folyamán szexuálisan aktív volt:		Egyáltalán nem	Egy kissé	Meglehetősen	Nagymértékben
50.	Száraznak érezte a hüvelyét a szexuális tevékenység során?	1	2	3	4
51.	Érezte rövidnek a hüvelyét?	1	2	3	4
52.	Érezte szűknek a hüvelyét?	1	2	3	4
53.	Volt fájdalma szexuális aktus vagy más szexuális tevékenység során?	1	2	3	4
54.	Élvezetes volt az Ön számára a szexuális tevékenység?	1	2	3	4

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet nyilvánítani mindazoknak, akik segítettek és támogattak dolgozatom elkészítésében.

Köszönöm **Prof. Dr. Polgár Csaba Ph.D., DSc.** és **Dr. med.habil Takácsi-Nagy Zoltánnak, Ph.D.**, hogy otthont adtak ennek a kutatásnak és a labori munkálatokhoz minden szükségletet biztosítottak.

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek **Dr. Sándor Gyöngyvér Orsolyának Ph.D.**, hogy munkám során mindvégig lelkesen támogatott, biztatott és megpróbált legjobb tudása szerint felkészíteni, hogy ezt a dolgozatot sikeresen elkészíthessem. Köszönöm a rengeteg motivációt, szakmai segítséget, a sok segítséget az elméleti háttér megértéséhez. Nélküle ez a dolgozat biztosan nem készült volna el.

Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Jurányi Zsolt Ph.D.** és **Dr. Kocsis S. Zsuzsának Ph.D.**, hogy szakmai tudásukkal segítettek megtanulni újfajta eljárásokat, amelyek számomra ismeretlenek voltak azelőtt.

Köszönöm a belső konzulensemnek **Dr. Sveiczter Ákosnak** akinek az egyetem első félévétől nagyon hálás vagyok, hogy erős sejtbiológiai és mikrobiológiai alapokat sajátíthattam el az előadásai során, majd az egyéni feladatok során biztatott a TDK elkezdéséhez, és elvállalta a belső konzulensi feladatot, amit nagyon lelkesen be is töltött.

Köszönettel tartozom labortársaimnak **Dr. Farkas Gyöngyi Ph.D., Székely Gábor, Vass Nagyzezsda, Kiss Krisztina** és **Fodor Martin**, hogy segítettek elsajátítani a laboratóriumi alapfolyamatokat, a gépezetek ismeretét és helyes használatát, illetve a sugárterápiás módszerek elméleti hátterének megértését.

Köszönöm **Nádas Orsolya** és **Pirmann Tamás** intézeti könyvtárosoknak, akik segítettek hozzáférni sokszínű szakkönyvekhez, ezáltal is hozzájárulva a dolgozatom szakmai hátterének bővítéséhez.

Hálás vagyok **Hegyi Eszternek, Róna Baláznak** és **Székely Ferencz Zoltánnak**, hogy az informatikai nehézségeimben töretlenül segítettek.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm **családomnak, barátaimnak** és **lakótársaimnak** aki mindvégig mellettem álltak, támogattak és biztattak lelkileg munkám során.