

Zebradánió halembrió, mint alternatív *in vivo* gerinces modell alkalmazása sugárbiológiai kutatásokban

Ph.D. értekezés tézisei

Szabó Emília Rita

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Onkoterápiás klinika

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Témavezető:

Dr. Hideghéty Katalin Ph.D., Habil.

Extreme Light Infrastructure - Attosecond Light Pulse Source

ELI-HU Nonprofit Kft.

Szeged

2018

A PhD értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó eredeti közlemények

- I.** Szabó E R, Plangár I, Tőkés T, Mán I, Polanek R, Kovács R, Fekete G, Szabó Z, Csenki Zs, Baska F, Hideghéty K. (2016) L-alpha glycerylphosphorylcholine as a Potential Radioprotective Agent in Zebrafish Embryo Model. *Zebrafish* 13: 481-488.
IF. 2,242
- II.** Szabó E R, Reisz Z, Polanek R, Tőkés T, Czifrus Sz, Pesznyák Cs, Biró B, Fenyvesi A, Király B, Molnár J, Daroczi B, Szabó Z, Brunner Sz, Varga Z, Hideghéty K. (2018) A novel vertebrate system for the examination and direct comparison of the relative biological effectiveness for different radiation qualities and sources. *Int J Radiat Biol*
IF. 1,99
- III.** Szabó E R, Tőkés T, Polanek R, Pesznyák Cs, Czifrus Sz, Hideghéty K. (2018) Gerinces modell alkalmazása különböző sugárminőségek relatív biológiai hatékonyságának tesztelésére. Eötvös Lóránd Fizikai Társulat Sugárvédelmi Szakcsoportjának On-line folyóirata
- IV.** Szabó E R, Brand M, Hans S, Hideghéty K, Karsch L, Leßmann E, Pawelke J, Schürer M, Beyreuther E. (2018) Radiobiological effects and proton RBE determined by wildtype zebrafish embryos. *Plos One*
IF. 2,806

Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó eredeti közlemények impakt faktora: 7,038

PhD értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó eredeti közlemények

- I.** Hideghéty K, Plangár I, Mán I, Fekete G, Nagy Z, Volford G, Tőkés T, Szabó E, Szabó Z, Brinyiczki K, Mózes P, Németh I. (2013) Development of a small-animal focal brain irradiation model to study radiation injury and radiation-injury modifiers. *Int J Radiat Biol* 89: 645–655.
IF: 1,895
- II.** Plangár I, Szabó ER, Tőkés T, Mán I, Brinyiczki K, Fekete G, Németh I, Ghyczy M, Boros M, Hideghéty K. (2014) Radio-neuroprotective effect of L-alpha-glycerylphosphorylcholine (GPC) in an experimental rat model. *J Neurooncol* 119: 253-61.
IF. 3,51
- III.** Tőkés T, Varga G, Garab D, Nagy Z, Fekete G, Tuboly E, Plangár I, Mán I, Szabó RE, Szabó Z, Volford G, Ghyczy M, Kaszaki J, Boros M, Hideghéty K. (2014) Peripheral inflammatory activation after hippocampus irradiation in the rat. *Int J Radiat Biol* 90: 1-6
IF. 1,895

- IV.** Mán I, Szebeni GJ, Plangár I, **Szabó ER**, Tőkés T, Szabó Z, Nagy Z, Fekete G, Fajka-Boja R, Puskás LG, Hideghéty K, Hackler L Jr. (2015) Novel real-time cell analysis platform for the dynamic monitoring of ionizing radiation effects on human tumor cell lines and primary fibroblasts. *Mol Med Rep* 12: 4610-4619.
IF. 1,559
- V.** Hideghéty K, **Szabó E R**, Polanek R, Szabó Z, Brunner Sz, Tőkés T. (2017) New approaches in clinical application of laser-driven ionizing radiation. *Spie Optics+ Opoelectronics Proceedings* vol. 10239
- VI.** Katalin Hideghéty, Emília Rita Szabó, Róbert Polanek, Zoltán Szabó, Bettina Ughy, Szilvia Brunner and Tünde Tőkés (2017) An evaluation of the various aspects of the progress in clinical applications of laser driven ionizing radiation. *Journal of Instrumentation* vol. 12
IF. 1,22
- VII.** Beyreuther E, Brüchner K, Krause M, Schmidt M, **Szabó E R**, Pawelke J. (2017) An optimized small animal tumour model for experimentation with low energy protons. *PLoS One* 18; 12(5):e0177428.
IF. 2,806
- VIII.** Katona M, Tőkés T, **Szabó E R**, Brunner Sz, Szabó Z I, Polanek R, Hideghéty K, Nyúl L. (2018) Automatic Segmentation and Quantitative Analysis of Irradiated Zebrafish Embryos *Computational Modeling of Objects Presented in Images. Fundamentals, Methods, and Applications: Heidelberg-Berlin, Springer Verlag, Lecture Notes in Computer Science* Vol. 10986

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó eredeti közlemények impakt faktora: 12,885

Összesített impakt faktor: 19,923

I. BEVEZETÉS

A sugárterápia a komplex rákkezelés egyik fő pillére. Az ionizáló sugárzást sikeresen alkalmazzák különböző primer és metasztatikus daganatokban szenvedő betegeknél (Larouche és *mtsai*, 2007). A rákos betegek több mint 50%-ánál alkalmaznak sugárterápiát betegségük során (Baskar és *mtsai*, 2012). A sugárbiológia több évtizedes kutatásai alapján ma már mélyreható ismeretek állnak rendelkezésre az ionizáló sugárzás fizikai, kémiai, biológiai hatás-mechanizmusáról, a hatást befolyásoló tényezőkről. Ez nagymértékben hozzájárult az optimális alkalmazás kidolgozásához, amely mind a sugárvédelem fejlődését, mind az ionizáló sugár széleskörű alkalmazását, ezek között a sugárterápia hatékonyságának fokozását, a mellékhatások, szövődmények csökkenését tette lehetővé, ami a terápiás index lényeges növekedését eredményezte. Az elmúlt években, jelentősen fejlődtek a sugárkezelési technikák, amelyek hozzájárultak a rákkezelés kimenetelének javulásához. Az új generációs lineáris gyorsítókkal elérhető intenzitás modulált sugárkezelések, a töltött atommag részecskék kedvező dózis elnyelési tulajdonsága hozzájárult a malignus sejtek szelektív eliminálásához, a normál szövetműködés megőrzése mellett. A fokozott konformalitással rendelkező fejlett foton besugárzási technikák és a szupravezető ciklotron/szinkrotron alapú részecske gyorsító berendezések révén, a gyorsan terjedő hadron-terápia egyre több daganatos beteg számára vált elérhetővé (Specht és *mtsai*, 2015). Ezen terápiás alkalmazások gyors növekedése, megbízható *in vivo* modellek kifejlesztését igényli, a nagy lineáris energia átadású (LET) részecske-sugárzás biológiai hatásainak preklinikai vizsgálatára. Rendkívül fontos a korábbi empirikus klinikai eredmények pathomechanizmusának, molekuláris hátterének kutatása, valamint a különböző új sugárminőségek tanulmányozása, az innovatív bináris, és multimodális kezelési koncepciók együtthatásának feltérképezése, a biológiai hatásainak tanulmányozása, mind a biztonságos klinikai bevezetés, mind a daganat ellenes terápiák hatékonyságának növelése érdekében (Lühr és *mtsai*, 2018).

1.1. Az ionizáló sugárzás sejtkárosító hatása

Régóta ismert, hogy az ionizáló sugárzás közvetlen sejtkárosító hatásának fő célpontja az örökítő anyag, a DNS, valamint, hogy a sugárzás okozta sejtkárosodások a sejt típusától, a sugárzási körülményektől és a sugárzás minőségétől függően különböző mértékűek és jelentőségűek lehetnek (Blank és *mtsai*, 1997). Az ionizáló sugárzás az atomokat ionizálja a test szöveteiben keresztülhaladása során, ahogy energiája elnyelődik. A sugárzás hatására bekövetkező károsodás közvetlen oka, hogy a célsejtekben az elektronok szóródnak, nagy reakcióképességű pozitív és negatív ionok keletkeznek, melyek szabadgyökök képződéséhez vezetnek (közvetett hatás), főleg a víz radiolízisén keresztül, illetve közvetlenül a makromolekulákkal lépnek reakcióba (közvetett hatás). A közvetlen, és a közvetett hatást a lineáris energia átadás (LET) mértéke határozza meg. A LET az egységnyi úton elnyelt energia

mennyiség, amikor keresztülhalad a közegen. Az alacsony LET-ű sugárzás, mint például a röntgen- vagy a gamma-sugárzás nagyjából közvetlen, szabadgyök képződés által okoz makromolekuláris főleg DNS és membrán károsodást, míg a magas LET-ű sugárzás, mint a neutron vagy α -részecskék, főleg direkt hatást fejtenek ki a sejtalkotókra, nagyobb biológiai hatékonyságot eredményezve (Prasad, 1995).

1.2. Terápiás index

A terápiás arány a tumor kontroll és a normális szövetkárosodás valószínűségének összefüggését jelzi. A jobb terápiás arány, kedvezőbb viszonyt jelent a tumor kontroll és a toxicitás között (Zindler és *mtsai*, 2015). A terápiás index növelésének számos módja ismert, a tumorelles terápia hatás szelektív fokozása, illetve az egészséges szövet károsodásának csökkentése: a kezelés időtartamának meghosszabbítása, a frakcionálás, a hiperfrakcionálás vagy sugármódosító anyagok használata, amelyek kifejezetten növelik a tumor sejtek érzékenységét (Prasanna és *mtsai*, 2012). A daganatellenes terápia esetében, mind a szelektív tumor sejt érzékenyítő, mind az ép szöveti sugárvédő anyag növelheti a radioterápia hatékonyságát. A sugárterápia során az ép szövetek védelme elengedhetetlen a terápiás arány javítása érdekében.

1.3. Sugármódosító anyagok

A sugármódosító anyagok alkalmazása lehetővé teszi a terápiás index javítását, ami azonban rendkívül fontos a biológiai rendszer érzékenységének vizsgálatára, a sugárzási hatás különbségeinek kimutatására. Nagy érdeklődés mutatkozik a sugárvédő anyagok fejlesztésében, az ép sejtek sérülésének megakadályozása érdekében, mind a kemo-radioterápiás és/vagy sugárterápiás kezelések, illetve nukleáris balesetek során.

1.3.1. A foszfatidilkolin lehetséges terápiás hatásai

A foszfolipidek, köztük a membránalkotó foszfatidilkolin jótékony hatását már több klinikai tanulmány ismertette a különböző betegségekkel és tünetekkel kapcsolatban, köztük a gyulladás vonatkozásában is. A foszfatidilkolin egy kulcsfontosságú sejtmembrán komponens (Volinsky és Kinunen, 2013). A GPC egy vízben oldódó molekula, a foszfatidilkolin deacilált származéka, amely kolinra hidrolizálható, erős gyulladáscsökkentő és neuroprotektív hatását mutatták ki (Gallazzini és Burg, 2009). A GPC bizonyítottan védi a membránokat az oxidációtól, és képes a membrán működésének javítására a traumás károsodást követően (Onishchenko és *mtsai*, 2008). A GPC különböző kísérleti modelleken védőhatást mutatott a gyulladásos reakciókkal szemben és csökkentette az oxido-reduktív stressz által okozott reaktív oxigén gyökök képzését (Tökés és *mtsai*, 2015).

1.4. Különböző sugárminőségek

1.4.1. Neutron sugárzás

A neutronsugárzás a nagy LET értékű sugárzások közé tartozik és ezért nagyobb biológiai hatást képes kifejteni, ami a szövetek nagyobb károsodását idézi elő, mint a foton/gamma-sugárzás azonos elnyelt dózisa.

1.4.2. Proton sugárzás

A proton terápia a hadronterápia leggyorsabban fejlődő ága, amely a XX. század végétől szélesebb körben alkalmazhatóvá vált. A dóziselnyelés szelektivitása lényegesen kedvezőbb a hagyományos foton radioterápiás sugárkezeléssel szemben. Ezek a pozitív töltött részecskék bizonyítottan, nagy hatással vannak a daganatterápiás kezelés kimenetelének javításában, főként a pontos dózis leadás miatt (Levin és *mtsai*, 2005). Előnyös tulajdonságának köszönhetően, a tumor térfogata nagy precizitással sugározható, a proton útvonal végén, a Bragg-csúcs-ban lévő nagy dózis leadás eredményeként, ami azt jelenti, hogy a protonterápia lehetőséget biztosít a daganatok szelektív kezelésére, az egészséges szövet maximális védelmével, mely jelentős mértékben csökkenti a tumor körüli sugár érzékeny szövetek károsodását, valamint a lényegesen kisebb integrált dóziselnyelés a másodlagos rosszindulatú daganatok kialakulási valószínűségét redukálja (Hall és Giaccia, 2006).

1.5. Zebradánió, mint modellrendszer

A zebradánió (*Danio rerio*) halembrió népszerű gerinces modellé vált a preklinikai kutatásokban, mivel számos előnnyel rendelkezik a hagyományos állatmodellekkel szemben (Geiger és *mtsai*, 2006). Laboratóriumi körülmények között alacsony költség mellett könnyen szaporítható, fenntartható, valamint nagy reprodukciós képesség jellemzi őket. A 0,5-1 mm-es embriók átlátszóságuk, és könnyű kezelhetőségük miatt kiválóan alkalmasak nagyszámú egyeddel történő vizsgálatok kivitelezésére. A kis méret nagy térbeli felbontást nyújt, így a teljes organizmus nagyszámú egyed besugárzása megbízható letalitási adatokat eredményez. A zebradánió számos kulcsfontosságú génnel rendelkezik, amelyek fontos szerepet töltenek be a fejlődés folyamataiban, a sejtciklus, a proliferáció, valamint a differenciálódás során, és ezek a gének megfelelnek a humán DNS szakaszoknak (70%) valamint jól konzerváltak a két faj között. A legtöbb szerv, mint például a szem, agy, szív, máj, izmok, csontok valamint a gyomor-bél rendszer gyors embrionális fejlődésen mennek keresztül, közel 48 óra alatt teljes fejlődésük végbemegy (Bailey és *mtsai*, 2009). Ezen túlmenően, a zebradánió embriók és a fiatal felnőtt egyedek optikailag áttetszőek, ez a jellegzetességük megkönnyíti az ionizáló sugárzás belső szervekre kifejtett hatásának közvetlen megfigyelését.

Ezek a jellemzők, kombinálva a könnyű kezelhetőséggel a kísérleti körülmények között lehetővé tették, hogy jelen tanulmányban, a zebradánió embrió modellt alkalmazzuk, mely a tradicionális sugárbiológiai rendszerek mellett köztes lépést biztosít az *in vitro* sejtenyészet-alapú, és kisemlős állatvizsgálatok között, valamint alkalmas különböző LET értékű sugárzás okozta károsodások vizsgálatára, illetve Relatív Biológiai Effektivitás (RBE) meghatározásra élő szervezetet alkalmazva, szerv és a szöveti szinten.

II. CÉLKITŰZÉS

Tanulmányaink céljai:

- a) zebradánió halembrió modell bevezetése, alkalmazása és különböző vizsgálati végpontok kidolgozása az ionizáló sugárzás hatásának vizsgálatára, későbbiekben lézer indukált ionizáló sugárzás RBE meghatározására;
- b) besugárzási geometria optimalizálása, a halembriók megfelelő elhelyezésére szolgáló mintatartók fejlesztése, a besugárzási paraméterek kidolgozása;
- c) dózis-hatás görbék meghatározása, a legmegfelelőbb dózis megállapítása a sugármódosító anyagok vizsgálatához;
- d) az L-alfa glicerilfoszforilkolin (GPC) sugárkárosodás hatásának vizsgálata;
- e) különböző nagy LET értékű neutron források Relatív Biológiai Effektivitásának meghatározása;
- f) a protonsugárzás biológiai hatásainak vizsgálata a mély dózis görbe különböző pontjain (plató, a Bragg-csúcs kiszélesítés közepén (mid-SOBP)) referencia foton sugárzás hatásával összevetve.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Zebradánió tartásának körülményei és embriókezelés

A kifejlett egyedeket nemük szerint szeparáltan tartottuk, megfelelő tartási körülmények mellett, recirkulációs rendszerben. A halak etetése napi három alkalommal, teljes értékű száraz lemezes táppal valamint frissen keltetett sőrakkal (*Artemia nauplii*) történt, a szabványoknak, működési elveknek megfelelően (Westerfield M, 2000).

A kísérleteinkhez zebradánió AB vad típusú vonalat használtunk. A kifejlett egyedeket (2 ikrás, 3 tejes) speciális szaporító tálakban ívattuk, és az embriók a szaporítást követő reggelen lettek megtermékenyítve. Ezt követően az embriókat összegyűjtöttük, majd sztereo mikroszkóp (Stemi 508, Stand K LAB, Carl Zeiss) alatt szétválogattuk. Az életképes és egészséges fejlődést mutató embriókat 5 ml E3 médiumot tartalmazó 10 cm-es Petri-csészékbe helyeztük és normál körülmények között 27,5 °C-on tartottuk.

Az elvégzett kísérleteket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (XXXII./1838.2015) hagyta jóvá, valamint a kísérleteink során figyelembe vettük a laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó irányelveket.

III.2. Zebradánió halembrió modell, az ionizáló sugárzások biológiai hatásainak vizsgálatára

A kísérleteinkhez különböző poszt-fertilizációs (hpf), 3-, 6-, és 24 hpf életkorban lévő életképes embriókat γ -sugárzásnak tettünk ki, 0 Gy és 20 Gy közötti dózis tartományban, a dózis leadás 5 Gy-es növekedéssel történt. A besugárzás egy Teragam K-01 (SKODA UJP, Prague, Czech Republic) kobalt egységgel történt melynek átlag energiája 1.25 MV. Az embriókat 96 lyukú (1 embrió/lyuk) lemezekbe pipettáztunk, melyeket majd két (2 cm vastagságú) polimetil-metakrilát (PMMA) lap közé helyeztünk a kiegyenlítő hatás kompenzálása érdekében, a homogén besugárzás biztosításának céljából. Az izocentrum a lemezek geometriai központjában volt. A tervezett dózisok felezve lettek leadva, egyik fele fentről (gantry szög 0°), a másik fele alulról (gantry szög 180°), ezáltal is maximalizálva a 20x20 cm-es sugármező homogenitását. Sugárzási időkorrekciós tényezőket alkalmaztunk a kobalt-60 forrás bomlásának kompenzálása miatt. Sugárkezelést követően az embriókat optimális körülmények között tartottuk, a hét napos mikroszkópos megfigyelési periódus ideje alatt.

III.3. Sugármódosító anyag hatásának vizsgálata - GPC előkezelés

A GPC-t, 194 $\mu\text{M/L}$ koncentrációban alkalmaztuk. Az embriókat sugárzást megelőzően 3 órára inkubáltuk, majd az inkubálási idő leteltével a 24 hpf embriókat 20 Gy dózis szinten besugároztuk. Hasonló fejlődési szakaszban lévő embriókat 10 Gy-el irradiáltuk a molekuláris vizsgálatok kivitelezése érdekében, négy csoportba sorolva: kontroll, GPC-vel kezelt, besugárzott, GPC-kezelt majd besugárzott.

A besugárzást a korábban ismertetett módon, 96 lyukú lemezeken (1 embrió/lyuk) kobalt-60 sugárforrással végeztük.

III.4. A különböző nagy LET források RBE meghatározásának módszere

A pharyngula periódusban (24 hpf) lévő megtermékenyült embriókat, egyedileg elhelyeztük 96 lyukú lemezbe mely 250 μl embrió médiumot tartalmazott, a konvencionális foton besugárzáshoz. A különböző sugárminőségek biológiai hatékonyságának összehasonlítására ugyanabban a fejlődési periódusban lévő embriókat alkalmaztunk, ellenben a neutron források esetén az embriók eppendorf csövekbe lettek helyezve a besugárzás időtartamára.

Az RBE meghatározásához, referencia sugárforrásként lineáris gyorsító által létrehozott 6 MV fotont használtunk (Primus2 Siemens), 0 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy és 20 Gy dózis szinteken.

A neutron besugárzást a Budapesti Műszaki Egyetem (BME) Oktató reaktorában a „pneumatikus csőposta” rendszerrel végeztük. Az embrió besugárzások a termikus csatornában történtek, 0 Gy, 1,25 Gy, 1,875 Gy, 2 Gy, és 2,5 Gy dózisokkal. A reaktor teljesítménye a kísérlet során 200 W volt.

A ciklotronnal előállított neutron besugárzásokat a Magyar Tudományos Akadémia Atommagkutató Intézetben (Atomki) hajtottuk végre. A zebradánió embriók, vegyes neutron-gamma $p(18 \text{ MeV})+\text{Be}$ forrással lettek besugározva, mely esetben a gyors neutron besugárzó berendezés az MGC-20E ciklotronon alapul. Az alkalmazott dózisok a következők voltak: 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6,8 Gy, 8,12 Gy és 10,28 Gy.

III.5. A proton sugárzás biológiai hatásainak vizsgálata a mélydózis görbe különböző pontjain

A proton sugárzás vizsgálatát a drezdai OncoRay Intézettel és a Helmholtz Kutató Központtal együttműködve végeztük. A német országos, és tartományi állatetikai szabályok szerint a zebrahal embriókkal a megtermékenyülés utáni 5 napig végezhető kísérletek. Ezért a tervezési szakaszban számos előkísérletet végeztünk, hogy e korlátozás mellett is releváns eredményeket nyerhessünk. Végül a dózisszintek emelése 30 Gy -ig, és az $\text{LD}_{50}/4$. nap=30 Gy alkalmazása bizonyult a leghatékonyabbnak. Az Egyetemi Protonterápiás Központ kísérleti csarnokában, rögzített vízszintes monoenergetikus ceruza nyaláb típusú proton sugárnyalábot alkalmaztunk 70-230 MeV energiatarományban.

A 24 hpf fejlődési periódusban lévő embriókat a proton mélydózis görbéjének különböző pontjain, a plató és a Bragg-csúcs kiszélesítésének közepén (mid-SOBP) sugároztuk be. Három független kísérlet ismétlést hajtottunk végre minden egyes dóziscsoport esetében, amelyet a plató és mid-SOBP protonokkal végeztük, valamint referenciaként a klinikai Linac típusú Artiste (Siemens AG, Erlangen, Németország), 6 MV foton sugárforrást alkalmaztuk a két sugárminőség összehasonlításának érdekében. Az ismétlések esetében 0 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy és 30 Gy dózis szinteken, 96-96 db embriót használtunk.

III.6. Mérések

Túlélési és morfológiai elemzés

A korfüggő dózis-hatásgörbe meghatározása céljából, valamint a GPC toxikus és sugárzás-módosító hatásainak elemzésére, a besugárzást követően az embriók fejlődési státuszát, az életképességet és a különböző morfológiai rendellenességeket rendszeresen detektáltuk, 24 óránként 7 napig. A vizsgálatokat, Zeiss Axio Imager Z1 fényáteresztő inverz mikroszkóppal végeztük 10x és 20x nagyításon, valamint reprezentatív képeket rögzítettünk AxioCam MR5 kamera segítségével a deformált egyedek esetében. A megfigyelést követően az elpusztult embriókat eltávolítottuk, az életképes és a rendellenességet mutató embriók számát regisztráltuk. Az embrionális túlélésre vonatkozó kritérium a

szív összehúzódások jelenléte valamint a sejtáramlás és vérkeringés volt. A túlélést és a morfológiai rendellenességeket a 7 napos megfigyelés alatt naponta, az élő egyedek arányában értékeltük. Számos súlyosabb morfológiai rendellenességet vizsgáltunk, mint a szívburok ödéma és a gerinc görbület, amelyeket feljegyeztünk és értékeltünk a túlélés mellett, RBE meghatározás vizsgálati végpontjaként. A kísérlet a kontroll és besugárzott egyedek megfigyelési periódusa 4 napos volt, a németországi állatetikai szabályozások korlátozása miatt. Az RBE meghatározás a következőképp történt: 7. napon - LD₅₀ foton/LD₅₀ neutron, illetve a 4. napon - túlélők száma adott foton dózis szinten/túlélők száma ugyanazon proton dózis mellett.

Hisztopatológiai és szövetszövetmorfológiai értékelés

A szövetszöveti vizsgálatok kivitelezéséhez, a kontroll és a kezelt embriók csoportjainak egyedei 7 napos mikroszkópos megfigyelés végén, 4 mg/ml trikain-metánszulfonát (Sigma-Aldrich™) 1:100 hígításban bódítva lettek, ezt követően 3 napig fixálva 4%-os formalinba. A fixálás megtörténte után az embriók paraffinba lettek ágyazva, majd 4 µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket hematoxilín-eozinnal festettünk. A szövetszöveti metszetek a Panoramic MIDI (3D-HISTECH Kft., Budapest) digitális dia-szkennellett lettek beolvasva. Reprezentatív képeket elemeztünk a Panoramic Viewer 1.14.50 RTM 3DHISTECH alkalmazásával, minden kezelési csoportból legalább 15 egyed vizsgálata történt meg.

Kvantitatív polimeráz-lánreakció (qPCR)

A besugárzást követően 1 és 2 órával a gyulladáscsökkentő citokin szintet vizsgáltuk. A méréshez szükséges megfelelő biológiai anyag biztosítása érdekében minden kísérleti csoportból három ismétlést mértünk, csoportonkénti 20 embrió összevonásával. A teljes RNS-extrakciót Trizol segítségével izoláltuk homogenizáló használatával. Ezután kloroformot adtunk a homogenizált embrió szövetéhez. Az RNS kicsapása izopropanol hozzáadásával történt, majd a csöveket óvatosan forgattuk és inkubáltuk. Ezt követően centrifugálás következett, mely után a felülúszót összegyűjtöttük. Az RNS koncentrációt spektrofotométerrel mértük meg. cDNS-t szintetizáltuk és valós idejű PCR-t hajtottunk végre.

Az IL-1β és az NF-κB szinteket szekvencia-specifikus TaqMan gén expressziós próbák alkalmazásával határoztuk meg 18S rRNS-sel, amely egy előre optimalizált primer és próbateszt belső kontrollként használva. Mindegyik PCR-reakciót megismételtük, és a relatív mRNS-szintet a 2^{-ΔΔCT} módszerrel számoltuk.

Pontozási rendszer az embrió morfológiai rendellenességeinek mennyiségi elemzéséhez

A szívburok ödéma és a gerinc görbület pontosabb meghatározása érdekében egy szemi-kvantitatív morfológiai pontozási rendszert alkalmaztunk (Brannen és mtsai, 2010). A morfológiai rendellenességeket a besugárzást követő 4. és 5. napon készített felvételeken értékeltük a kialakított pontozási rendszer szerint. Az 1-es pontszám az embriók egészséges állapotát jelölte. A szívburok ödéma

esetén a 2-es pontszám a normál tartományon belül egy nagyon kicsi ödéma megjelenését jelentette, a 3-as pontszám szignifikáns rendellenességet mutatott, ahol még a szívburok ödéma mérete kisebb volt, mint a fej mérete és a 4-es pontszám súlyos rendellenességet jelentett, mely esetben a szívburok ödéma mérete azonos vagy nagyobb volt, mint a fej mérete.

A gerinc görbület esetében az 1-es pontszám normál gerincet, a 2-es pontszámot a farok ívelt végén megjelenő görbületet, 3-as pontszám pedig a test felétől enyhe görbülést illetve a 4-es pont a nagyon súlyos görbületet jelentette.

III.7. Statisztikai analízis

A túlélés és a különböző sugárzás okozta morfológiai rendellenességek dózis-hatás görbéinek statisztikai elemzéséhez a Log-rank valamint Chi-négyzet próbát alkalmaztuk Bonferroni korrekcióval, az ábrázolást a GraphPad Prism Version 7.03 Windows rendszerrel végeztük.

A GPC sugárvédő hatásainak értékelését a Cox regresszióval végeztük el R statisztikai programnyelvben (R 3.2.2 for Windows). A statisztikai szignifikancia szint $p < 0,05$ értéknek vettük.

A gyulladáshoz citokin szintek mértékének meghatározására a SigmaStat statisztikai szoftvercsomagot alkalmaztuk. A statisztikai értékeléshez nem paraméteres Kruskal-Wallis próbát alkalmaztunk, a csoportok közötti különbségek kimutatására, ezt követte a Dunn-teszt páronkénti többszörös összehasonlításra.

A proton besugárzás átlagos túlélések és morfológiai rendellenességek grafikus ábrázolására a három kísérlet átlagértékét határoztuk meg, és ábrázoltuk a 2017-es Origin Lab szoftverrel.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. Életkorral összefüggő dózis-hatásgörbék

Az embriók túlélése szoros összefüggést mutatott az embriók korával, valamint a dózis szintekkel. A hétnapos megfigyelési periódus alatt, a megtermékenyítést követő 6 órában besugárzott embriók esetében nem volt releváns halálozás az 5 Gy-s csoportokban, míg 20 Gy esetében több mint 80% már a megfigyelést követő 4. napon elpusztult.

A 7. napon 50%-os túlélést lehetett meghatározni a 15 Gy-vel besugárzott csoportok esetében. Ezért a 6 hpf embriók esetében a 15 Gy dózis szint bizonyult az LD₅₀ értéknek. Az ionizáló sugárzásra a 24 órás embriók kevésbé voltak érzékenyek, esetükben az LD₅₀ érték 20 Gy-nek felelt meg a hetedik napon.

A túléléshez hasonlóan a morfológiai elváltozások megjelenése és mértéke az embriók korától illetve a leadott dózistól függő volt, súlyosabb, korábban jelentkező embrionális fejlődési rendellenességek a 6 hpf-es korban besugárzott egyedek esetében voltak megfigyelhetők.

Szövetteni vizsgálat

A mikroszkópos morfológiai elváltozásokat kvalitatíve értékeltük. A besugárzott, megfigyelt egyedek esetében a kopoltyúk többrétegű hámjában a kehelysejtek fogyatkozása, valamint a nyálkahártya eltűnése és a bőr alatti ödéma kialakulása volt megfigyelhető. A szövetteni analízis dóziszfüggő perikardiális károsodást mutatott, súlyos hydropericardium, szöveti vizenyő volt észlelhető már a legalacsonyabb dózis szintekkel besugárzott egyedek esetében is. A máj szövetteni feldolgozása során a hepatocyták hydropikus és egyszerű patológiás jeleit figyeltük meg a sugárkezelt egyedekben, illetve a hepatocyták magvában bekövetkező pycnotikus változásokat is észleltünk a 24 hpf, 20 Gy-vel besugárzott csoportban. Ezenkívül látható volt, hogy a szikanyag állományában vakuólumok jelentek meg a 6 hpf 5 Gy hatásának kitett csoportban. Végül meghatároztuk a sugárzás kórszövetteni hatását a fejlődő gasztrointesztinális rendszerre. Mindegyik besugárzott csoportban nagy mennyiségű nyálka volt jelen a bélrendszerben és a 20 Gy-el besugárzott csoportban, a bélnyálkahártyában számos kehelysejt volt megtalálható. A 20 Gy-el kezelt csoportban szabálytalan alakú sejtek és hiperkróm magok voltak megfigyelhetőek a kehelysejtek számának lényeges csökkenése mellett.

IV.2. GPC hatása a túlélésre és a morfológiai elváltozásokra

A GPC 194 $\mu\text{M}/\text{L}$ koncentrációban való alkalmazása jelentős védőhatásokat mutatott korábbi gyulladáscsökkentő modellekben. Ezért a 7. napon a 194 $\mu\text{M}/\text{L}$ koncentrációjú GPC-vel előkezelt és besugárzott csoport, és a 20 Gy-el besugárzott csoport között a túlélési különbség 20% volt a kezelt csoport javára. Tehát a túlélésben, és ezzel párhuzamosan a morfológiai rendellenességek megjelenésében is szignifikáns különbséget figyelhettünk meg: a legsúlyosabb szervi elváltozások a magasabb dózisszinteken történtek, melyek kivédésében a GPC erőteljes szerepet játszott.

A fejlődő bélrendszer ionizáló sugárzás által okozott szövetteni elváltozásait csökkentette és részben helyreállította a GPC előkezelés. A GPC-kezelés csökkentette a radiogén makro- és mikromorfológiai károsodásokat, valamint a letalitást, így sugárvédő hatása a jövőben potenciálisan felhasználható lehet a rosszindulatú daganatok sugárkezelése során radioprotektorként, javítva a terápiás indexet.

Gyulladáscsökkentő citokinszint mérés

Az észlelt sugárvédő hatás patomechanizmusát kutatva, gyulladáscsökkentő aktivációs jelátviteli útvonal korai fázisának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a GPC előkezelt csoportban az IL-1 β expressziója a kontroll szintre csökkent, ezáltal az NF- κ B útvonal aktiválás indukcióját megakadályozta. A 10 Gy-s besugárzást követően, különböző mintavételi időpontokban elemzett eredmények azt mutatták, hogy az IL-1 β és az NF- κ B aktiválódása különböző időpontokban történik. Ezt az aktiválódási szintet jelentősen csökkentette a GPC. Az eredmények alapján a GPC sugárvédő, illetve gyulladáscsökkentő

hatásokat mutatott a zebra-dánió embrió modellben, jelentősen csökkentve a sugárzás okozta pro-inflammatorikus aktivációt, az ionizáló sugárzás által kiváltott morfológiai károsodásokat és a letalitást.

IV.3. Túlélés a nagy LET-RBE meghatározáshoz

A túlélési görbék összehasonlítása során azt találtuk, hogy az $LD_{50/7}$ érték a hasadási neutronok esetében 2 Gy, ciklotron neutronok esetében 8,12 Gy valamint a γ -sugárzás esetében 20 Gy volt. Az eredmények függvényében a biológiai hatékonyság (RBE) 10-szer magasabb a nagy lineáris energia-átadású termikus, hasadási neutronoknál és 2,5-ször magasabb a ciklotron által generált gyors neutron sugárzásnál.

RBE meghatározás morfológiai elváltozásokkal

Az embriók fejlődésbeli rendellenességeit és morfológiai elváltozásait (testhossz megrövidülése, gerinc görbülete, fej és szem méretének csökkenése, szívburok ödéma, szikhólyag megnagyobbodása) egyszerűsített módszerrel határoztuk meg. Dózis és LET függő szervi rendellenességek voltak megfigyelhetők mikroszkópiusan. A 4. és 5. besugárzást követő napon megfigyelt elváltozások egyezően a túlélési eredményekkel, értékelhető adatokat nyújtottak a különböző sugárminőségek összehasonlítására.

A különböző szervek szövettani értékelése

A különböző sugárminőségekkel kezelt embriók szövettani vizsgálatai LET- és dóziszfüggő szöveti elváltozásokat mutattak a szem, az agy, a gyomor-bélrendszer, a máj és az izom elemzése során.

A hasadási neutronnal és a ciklotron alapú neutronforrással besugárzott embriók esetében, a sugárzás a szemlencse elhomályosodását, a szem átmérőjének jelentős csökkenését, valamint rétegszerkezetének elváltozását okozta a kontrollhoz képest. A különböző LET értékű ionizáló sugárkezelések a retina jól strukturált sejtrétegeinek jelentős dezorganizációját okozták. A kontroll embriók agyában a neuropil intakt, a 20 Gy fotonnal, a 2 Gy hasadási neutronnal és a 8,12 Gy ciklotron alapú neutronforrással kezelt csoportok esetében, a neuropil szöveti fellazulása volt megfigyelhető. 7 nappal a kezelést követően, a középagy és a csontvelő, sejteiben is dezorganizáció volt látható, a 20 Gy foton és 8,12 Gy ciklotron alapú neutronforrásokkal besugárzott egyedek esetében. A kehelysejtek száma részleges csökkenést mutatott a 20 Gy-s foton és 2 Gy hasadási neutronnal besugárzott csoportokban, valamint a ciklotron-alapú neutron esetén 8,12 Gy dózisszinten azok szinte teljes eltűnését láthattuk. A kehelysejtek a sugárzás hatásainak korai jeleit mutatták, és számuk jól viszonyult a leadott dózishoz.

IV.4. Protonsugárzás - RBE meghatározás

Túlélési végpont az RBE meghatározásához

A besugárzást követő első két napban a 15 Gy-nél alacsonyabb dózisokkal kezelt csoportokban, az embrionális túlélésre a besugárzás nem volt szignifikáns hatással. A 10 Gy-nél nagyobb dózis szintek esetében az SOBP és a 15 Gy csoportoknál a plató régióban a besugárzás szignifikánsan csökkentette a túlélési szintet a kezelést követő 4. napon, a foton referenciához viszonyítva. Ezt tükrözi az LD₅₀ érték is, mely körülbelül 30 Gy-nek felel meg a proton mélydózis görbéjének SOBP pozíciójában és valamivel magasabb a plató régióban a besugárzást követő 4. napon.

Az embriók túlélésének tekintetében 20 Gy dózisszinten $1,13 \pm 0,08$ és $1,20 \pm 0,04$ RBE értékeket határoztunk meg a plató illetve az SOBP pozícióban. 30 Gy esetén a mid-SOBP pozícióban $1,60 \pm 0,32$ -nek, illetve a platóban $1,41 \pm 0,08$ -nak bizonyult a konvencionális 6 MV fotonhoz viszonyítva.

RBE meghatározás morfológiai rendellenességekkel

A szívburok ödémát mutató egyedek száma lényegesen gyorsabban emelkedik, mint a gerinc görbületet mutatóké. Ennek oka a két rendellenesség eltérő patomechanizmusa, ugyanis az ödéma képződés, aktív folyamat, inflammatorikus folyamatok indukálta akut gyulladásos reakció, míg a gerincgörbület a fejlődő csontsejtek károsodása miatt lassabban alakul ki.

A 2. és a 3. megfigyelési napokon, a 15 Gy és 20 Gy-s csoportok esetében a proton és a foton kezelés között szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők a szívburok ödéma arányai között.

A 15 Gy-nél nagyobb dózisok alkalmazása során, az embriók szinte 100%-ának esetében szívburok ödémát tapasztalhattunk. A szívburok ödéma indukálására proton esetében 12,9 Gy és 16,0 Gy foton kezelésre volt szükség. A 4. megfigyelési napon a gerinc görbület arányának alapján 20 Gy proton $1,25 \pm 0,16$ és $1,10 \pm 0,14$ RBE értékek voltak meghatározhatók a mid-SOBP és plató régióban konvencionális MV fotonokhoz viszonyítva. A szívburok ödéma, mint akut sugárzás okozta károsodása nyilvánvaló dózis-hatást mutatott a megfigyelési periódus ideje alatt. A gerinc görbület megjelenésének esetében, lineáris dóziszfüggő növekedés volt megfigyelhető a 30 Gy dózis szintig a sugárzást követő 4. napon, ami valószínűleg a 10 Gy feletti dózisok miatt a gerincben bekövetkező kiterjedt sejt pusztulásnak magyarázható.

V. MEGBESZÉLÉS

V.1. Életkor és dóziszfüggő túlélési görbék

Kevés eredmény került közlésre halembrió modell (medaka és zebradánió) alkalmazásával, melyeket elsősorban a sugárvédelmi vonatkozásokkal kapcsolatos vizsgálatokra használtak (Shimada és *mtsai*,

1991). A kutatás során meghatároztuk, a besugárzás pontos technikáját, megfelelő mintatartókat fejlesztettünk ki valamint a besugárzás geometriájának optimalizálását végeztük el.

Ezt követően a zebradánió embriók biológiai megfigyelési végpontjait határoztuk meg kifejezetten sugárbiológiai kutatásokra. Ebből a célból, különböző poszt-fertilizációs korban lévő embriók különböző dózisszinteken lettek homogénean besugározva foton forrással. Az embriókat megtermékenyítést követően különböző időpontokban (3 hpf, 6 hpf, 24 hpf) irradiáltuk, és több végpontot értékeltünk, mint a túlélés, a makro- és a mikromorfológiai elváltozások a fejlődő embriókban. A modell rendszerünk esetében a túlélés, a morfológiai károsodások és a szövettani elváltozások életkor és dózisfüggőnek bizonyultak. A poszt-fertilizáció korai szakaszaiban, különösen a midblastula átmeneti állapot előtt, vagyis a 24 hpf előtti periódusban nem volt megfigyelhető a teljes mértékben kifejlett sugárkárosodást javító fehérjék jelenléte (McAleer és *mtsai*, 2005), ami a sugárzás érzékenységét eredményezte, melyet az általunk végzett kísérletek is megerősítettek. A 6 hpf korban besugárzott embriók esetében az LD₅₀ érték 15 Gy valamint a 24 hpf korú embriók esetében 20 Gy-nek bizonyult a konvencionális foton forrással való irradiáció során a 7. megfigyelési napon.

A 24 hpf embriókkal végzett kísérletek nagyon stabilnak, jól reprodukálhatónak bizonyultak, és megállapítható, hogy ezen életkor alkalmas volt az ionizáló sugárzás, illetve a potenciális sugárvédő anyagok hatásainak vizsgálatára

V.2. Potenciális sugár-módosító anyagok vizsgálata

A foszfolipidek nagy szerepet játszanak a sejtmembrán károsító anyagokkal szembeni védelemben, de a nagy koncentrációban alkalmazott foszfolipidek közvetlen toxicitása nem teljesen ismert.

GPC, egy foszfolipid származék, amely stabilizálja a sejtmembrán funkcióját a károsodást követően, ezen állítások igaznak bizonyultak a vizsgálataink esetében. A GPC sugárkezelés előtti alkalmazása csökkentette az embriók pusztulását, enyhítette a morfológiai rendellenességek számát és súlyosságát. A szövettani vizsgálatok bizonyították, hogy különösen a béltraktusban észlelt sugárzás okozta károsodásokat nagymértékben csökkentette, és részben helyreállította a GPC előkezelés.

Az IL-1 β túl expressziója az ionizáló sugárzást követő gyulladáshoz vezető aktiváció első jele, amely az NF- κ B útvonal aktiválódását idézi elő (Ogryzko és *mtsai*, 2014). Bizonyított, hogy az NF- κ B útvonal aktiválása jelentős szerepet játszik az ionizáló sugárzás ép szövetekben kiváltott gyulladáshoz vezető változásokban. Ezért az NF- κ B és az IL-1 β overexpresszióját tanulmányoztuk, feltételezve, hogy a GPC korábban megfigyelt védőhatása ennek az útvonalnak gátlásából következhet be.

A GPC előkezelés IL-1 β expresszióját a kontroll szintre csökkentette, és megakadályozta az NF- κ B útvonal aktiválódását. Az eredmények alapján a GPC sugárvédő, illetve gyulladáscsökkentő hatásokat

mutatott a zebradánió embrió modellben, jelentősen csökkentve a sugárzás okozta pro-inflammatórikus aktivációt, az ionizáló sugárzás által kiváltott morfológiai károsodásokat és a letalitást.

V.3. Különböző nagy LET neutron források RBE meghatározása

Annak tudatában, hogy a korai életszakaszokban lévő embriók érzékenyebbek, ezért a különböző sugárminőségek relatív biológiai hatékonyságának vizsgálatára 24 hpf embriókat választottunk.

Az RBE meghatározást különböző tényezők befolyásolják, mint például a szövettípus, biológiai végpont, kezelési mód továbbá iontípus (Lühr és *mtsai*, 2017). Jelentős mennyiségű kutatást végeztek világszerte annak érdekében, hogy az RBE-t vizsgálják különböző nagy LET-ű források esetében, *in vitro* sejtkultúrákkal, a sugárbiológia standard modelljét alkalmazva (Beyreuther és *mtsai*, 2009). *In vivo* gerinces modellünket vezettük be különböző sugárminőségek sugárbiológiai vizsgálatára, amely fontos adatokat szolgáltat egy komplex szervezet dóziszfüggő válaszairól. Ebből a célból az embriókat, reaktor típusú hasadási neutronok, valamint ciklotron alapú gyors neutronok, és hagyományos foton referencia sugarak (LINAC 6 MV foton) hatásainak vizsgálatára, RBE meghatározására használtuk. A nagy LET sugárzások esetében az RBE meghatározás során, két kvantitatív vizsgálati végpont (túlélés és morfológiai rendellenességek) és a részletes szövetkárosodás elemzésével hasonló eredményeket nyertünk, mint amelyet egy másik halfaj alkalmazásával találtak, más végpontot vizsgálva (Shimada és *mtsai*, 1991).

A túlélési görbék összehasonlítása során azt találtuk, hogy az RBE 10-szer magasabb a nagy lineáris energia átadású hasadási neutronoknál, és 2,5-ször magasabb a ciklotron által generált gyors neutron sugárzásnál. Az általunk meghatározott RBE értékeket, jól alátámasztották a széles energiaspektrumokkal, vegyes neutron-fotonnal és monoenergetikus neutronokkal végzett kísérletek eredményei is (Juerß és *mtsai*, 2017).

Az *in vivo* mikroszkópos vizsgálatok, valamint a szövettani megfigyelések dózis és LET függő szervi elváltozásokat (testhossz megrövidülése, gerinc görbülete, fej és a szem méretének csökkenése, szívburok ödéma és a szikhólyag megnagyobbodása) mutattak, valamint a szem, agy, máj, izom és a gyomor-bélrendszer esetében hasonló arányban dózis függő szövettani elváltozások voltak meghatározhatók. A szakirodalomban szereplő összes vizsgált szövet, a fark izom, a bélrendszer, a központi idegrendszer és a szem egyértelműen azonosítható sugárkezeléssel kapcsolatos változásokat mutatott, azaz a sejtrétegek hipocellularitását és dezorganizációját, összhangban az általunk megállapítottakkal.

V.4. A protonsugárzás biológiai hatásai

A proton sugárterápia terjedő alkalmazása és a hosszú távú túlélők számának növekedése újra fölvetette és jelentős vitát váltott ki a proton nyaláb elnyelődési útján átlagolt hatásának differenciálásáról. Az RBE 1.1-értéket praktikus szempontok miatt alkalmazzák a klinikumban, nagyszámú *in vitro* kísérlet alapján, míg *in vivo* kutatásokat korlátozottabb mértékben végeztek. Törekvéseink fő célja a zebradánió halembrió rendszerben kiváltott hatások jellemzése, illetve a plató és a mid-SOBP pozícióban a proton nyaláb hatásának meghatározása volt klinikai MV foton referenciával.

A túlélő embriók száma jelentősen csökkent a proton kezelés esetében, valamint a magasabb dózis szinteken, a 30 Gy dózis 50%-os túlélési arányt (LD₅₀) eredményezett a sugárzást követő 4. napon.

A sugárzást követő 4. napon megfigyelt embrionális mortalitásra vonatkozó 15 Gy küszöb dózist mások is megfigyelték (McAleer és *mtsai*, 2005), ellenben a 8 MeV alacsonyabb energiájú proton besugárzás esetében nagyobb pusztulás volt észlelhető a 4. napon, 24 hpf vad típusú embriók 6 Gy dózissal való irradiációját követően (Li és *mtsai*, 2018).

A túlélés és a morfológiai rendellenességek analízise azt mutatta, hogy a 10 Gy-nél nagyobb dózisok leadása szükséges a szívburok ödéma és a gerinc görbület megjelenésének kiváltásához, a négy napos megfigyelési időintervallumon belül. A szívburok ödéma meggyőző és gyors megjelenése korrelál az akut citokinek által kiváltott gyulladási reakció megjelenésével a besugárzást követően (Schaue és *mtsai*, 2012). Ezzel ellentétben a gerinc deformációt valószínűleg a fejlődő gerincvelőben lévő idegsejtek (Sayed és Mitani, 2016) apoptózisa okozza, ami hosszabb időt igényel, hogy megfigyelhető rendellenességeket okozzon a besugárzást követően.

Az embriók túlélésének adatai alapján meghatározott RBE értékek négy nappal a 20 Gy és 30 Gy plató illetve mid-SOBP proton besugárzása után a 6 MV foton forrással való besugárzáshoz viszonyítva jó egyezést mutat a korábban közölt *in vivo* RBE értékekkel (Urano és *mtsai*, 1984, Uzawa és *mtsai*, 2007, Saager és *mtsai*, 2018). Ezeket az RBE értékeket igazolták az embriók morfológiai rendellenességeinek megjelenési arányai is, a megfelelő sugárminőségek és dózisok tekintetében.

Összefoglalva, adataink azt mutatták, hogy a zebradánió halembrió rendszer megbízható *in vivo* modellnek bizonyult, mely egy robusztus és egyszerű alternatív modellként alkalmazható különböző ionizáló sugárzások biológiai hatásainak vizsgálatára, valamint RBE meghatározásra. A kvalitatív végpontok, mint például a túlélés és a különböző morfológiai rendellenességek alkalmazhatóak az ionizáló sugárzás egész szervezetre gyakorolt hatásának leírására. A zebradánió halembrió alkalmasnak bizonyult a protonsugárzás kismértékű biológiai hatás-különbségeinek kimutatására a proton nyaláb mélydózis görbéjének különböző pontjain.

VI. EREDETI MEGÁLLAPÍTÁSOK, ÚJSZERŰ FELISMERÉSEK

- a) Megalapítottuk az első zebra-dánió hal-laboratóriumot Szegeden, és kísérleteink eredményeivel jelentősen hozzájárultunk egy új, jól reprodukálható, nagy szenzitivitású gerinces modell sugárbiológiai kutatásokban való bevezetéséhez. A halembrió modell alkalmasnak bizonyult a különböző típusú ionizáló sugárzások hatásainak vizsgálatára és a potenciális sugárvédő anyagok preklinikai tesztelésére.
- b) A kutatásaink során pontos és ellenőrzött besugárzási technikákat, a besugárzás geometriájának optimalizálását és az embriók megfelelő elhelyezésére szolgáló eszközök fejlesztését, valamint a besugárzási paraméterek meghatározását dolgoztuk ki.
- c) Meghatároztuk a sugárbiológiai vizsgálatokhoz legmegfelelőbb embrió életkort, megfigyelési időpontokat, a különböző biológiai végpontok értékeléséhez, mint például a túlélés, a kvantitatív morfológiai elemzés, a szövettani, és a komplex molekuláris változásokat az átfogó értékelés érdekében. Jól reprodukálható dózis-hatás görbéket és LD₅₀ értéket határoztunk meg a különböző sugárminőségek (foton, neutron, proton) esetében.
- d) Kísérleteink során a GPC védő hatását mutattuk ki, az ionizáló sugárzás okozta letalitás, és a különböző szervek morfológiai és szövettani károsító hatása ellen. Eredményeink azt mutatják, hogy a sugárzás által aktivált pro-inflammatórikus útvonal aktivációjának gátlása lehet a GPC potenciális hatásmechanizmusa.
- e) Az életképesség és a morfológiai rendellenességek tanulmányozása érzékeny vizsgálati végpontnak bizonyult a különböző sugárminőségek hatásainak meghatározása során. Meghatároztuk az RBE értékeket a hasadási és ciklotron alapú neutronokra, valamint a protonforrásra a mélydózis görbe 2 különböző pontján.
- f) A zebra-dánió embrió rendszer szenzitivitása a proton nyaláb mélydózis görbéjének különböző pontjain (plató, a Bragg-csúcs kiszélesítés közepén (mid-SOBP)) kismélységben eltérő RBE meghatározására is alkalmasnak bizonyult.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt, őszinte hálámat szeretném kifejezni a témavezetőmnek, Dr. Hideghéty Katalinnak, a Szegedi Tudományegyetem Onkoterápiás Klinika docensének és az ELI-ALPS Orvos-biológiai munkacsoport vezetőjének, hogy lehetőséget adott arra, hogy kutatóként dolgozzam. Szeretném továbbá megköszönni neki, a kutatói munkám során nyújtott folyamatos támogatását, hogy ellátott tanácsaival, biztatott és bízott bennem. Türelme, oktatói kritikái, valamint kedvessége és pozitív hozzáállása szintén

nélkülözhetetlenek voltak a kutatásaim sikerében. Folyamatos támogatása és a tudományos problémákhoz való optimista hozzáállása nélkül ez a doktori disszertáció nehezen készült volna el.

Köszönettel tartozom kollégáimnak és barátaimnak Dr. Plangár Imolának és Dr. Tökés Tündének, a karrierem kezdetétől fogva, a sok éves munkám során nyújtott támogatásukért és segítségükért, hogy mellettem voltak és támogattak, jó és rossz időkben egyaránt.

Külön köszönettel tartozom Dr. rer.nat. Jörg Pawelke-nek, aki lehetőséget biztosított arra, hogy az OncoOptics csoporthoz csatlakozva több kísérleti kampányban is részt vegyek. Nagyon hálás vagyok, hogy engedélyezte a zebradánió embriók konvencionális és lézer indukált proton forrásokkal történő besugárzási kísérleteket. Köszönöm, hogy ellátott tanácsokkal és segítséget nyújtott a kísérleteket előkészítő munkák és a dozimetriai mérések során. Nagy öröm számomra, hogy együtt dolgozhattam vele.

Szeretném megköszönni Dr. Elke Beyreuther-nek, a közös kísérlet előkészítésében és kivitelezésében nyújtott rengeteg munkáját, erőfeszítését. Nagyon hálás vagyok útmutatásaiért és tanácsaiért, valamint a közlemény megírásában nyújtott önzetlen segítségéért, és végül, de nem utolsó sorban a barátságáért.

A Szegedi Tudományegyetemről szeretném megköszönni Prof. Dr. Bari Ferencnek a támogatását és, hogy lehetőséget adott a zebradánió hal-laboratórium kialakítására az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézetben.

Köszönöm dr. Kaszaki Józsefnek, hogy meghívott előadóként részt vehettem a FELASA oktatásban, melyekből nagyon sokat tanultam.

Köszönöm a Szent István Egyetem Akvakultúra Tanszék munkatársainak támogatásukat, a rengetek tanácsot, és hálás vagyok, hogy rendelkezésünkre bocsátották a felnőtt zebrahal állományunkat.

Szeretnék köszönetet mondani volt szakdolgozóimnak, Diósdí Ákosnak, Dr. Kalinger Marianak és Polanek Evelinnek a segítségükért és barátságukért.

Köszönet illeti az ELI-HU Nonprofit Kft. vezetőit, itt kiemelném Osvay Károlyt és a Tudományos Alkalmazások Osztályvezetőjét, Dombi Pétert, akik támogatták a kutatásaimat és lehetővé tették doktori tanulmányaim elvégzését. Kutatói munka mellett keletkező ügyintézással kapcsolatban mindig sok segítséget és támogatást kaptam Zimányiné Horváth Verától, Váradi Zitától és Ékesné Balogh Renátától.

Külön köszönetet szeretnék mondani családtagjaimnak és barátaimnak a végtelen támogatásukért, a szeretetért, biztatásért, valamint, hogy a munkám során végig hittek bennem.

Végül, de nem utolsó sorban, nagyon hálás vagyok a vőlegényemnek, Ruzsa Szabolcsnak, aki nagyon sokszor bátorított és odaadóan támogatott munkám során.

A tudományos munkát támogatta: Az *ELI-ALPS projekt (GINOP-2.3.6-15-2015-00001)* az *Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósul meg.*