

Received: 2009.05.26
Accepted: 2009.07.24
Published: 2009.08.18

Popromienny efekt sąsiedztwa, ważny element odpowiedzi na promieniowanie jonizujące – potencjalne implikacje kliniczne*

Radiation-induced bystander effect: The important part of ionizing radiation response. Potential clinical implications

Maria Wideł^{1,2}, Waldemar Przybyszewski¹, Joanna Rzeszowska-Wolny^{1,2}

¹ Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej, Centrum Onkologii, Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach

² Zakład Inżynierii Systemów, Instytut Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Politechnika Śląska w Gliwicach

Streszczenie

Przez kilkadziesiąt lat obowiązywał w radiobiologii pogląd, że uszkodzenia komórki wywołane działaniem promieniowania jonizującego, takie jak: śmierć komórki, zmiany cytogenetyczne, apoptoza, mutagenesa i kancerogeneza są wynikiem bezpośredniej jonizacji ważnych dla życia komórki makrocząsteczek (głównie DNA) lub reakcji tych makrocząsteczek z produktami radiolizy wody. Kilkanaście lat temu jednak zwrócono uwagę na trzeci mechanizm oddziaływania promieniowania zwany „efektem widza” lub „efektem sąsiedztwa” (bystander effect, lub radiation induced bystander effect – RIBE). Efekt ten indukowany przez czynniki i sygnały emitowane przez komórki bezpośrednio napromieniowane ujawnia się w postaci obniżenia przeżycia, uszkodzeń cytogenetycznych, wzrostu odsetka apoptozy i zmian biochemicznych w sąsiadujących komórkach nieeksponowanych na promieniowanie. Popromienny efekt sąsiedztwa występuje zwłaszcza w przypadku bardzo niskich dawek promieniowania alfa (rzędu mGy i cGy), ale także po napromieniowaniu komórek promieniowaniem o niskim współczynniku liniowego przekazywania energii (promieniowanie X, gamma) nawet w wyższych, konwencjonalnie stosowanych dawkach. Mechanizmy odpowiedzialne za efekt sąsiedztwa są złożone i nie do końca poznane. Uważa się, że molekularne czynniki sygnalizacyjne uwalniane przez komórki napromieniowane i wysyłane do medium lub poprzez międzykomórkowe połączenia szczelinowe indukują różne ścieżki sygnałowe w komórkach sąsiadujących, prowadząc do obserwowanych efektów. Natura tych czynników może być różna, jakkolwiek nie została ostatecznie zdefiniowana. Potencjalnie zjawisko sąsiedztwa może mieć istotne znaczenie w powstawaniu działań niepożądanych radioterapii, ogólnoustrojowych lub zlokalizowanych w tkankach nieobjętych polem napromieniania, a także w przypadku używanych w diagnostyce radiologicznej i radioizotopowej niskich dawek promieniowania. Czynniki emitowane przez napromieniowane komórki stanowią element ryzyka indukcji niestabilności genetycznej, mutacji oraz nowotworzenia drugiego rzutu (second primary cancers). Mogą one prawdopodobnie mieć swój udział w powstawaniu i nasileniu odczynów popromiennych w tkankach zdrowych. Efekt sąsiedztwa może mieć zarówno pozytywne, jak i negatywne skutki w przypadku radioterapii. Jeżeli komórki nowotworowe bezpośrednio pochłaniające energię promieniowania jonizującego będą – poprzez swoje sygnały (sekrecyjne lub przekazywane poprzez połączenia międzykomórkowe) – uszkadzały sąsiadujące komórki nowotworowe lub będą inicjowały różnicowanie tych komórek będzie to działanie pożądane. Jeżeli natomiast uszkodzeniu ulegną komórki prawidłowe (komórki nabłonkowe, śródbłonkowe, fibro-

* Praca sponsorowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, grant nr N406101 31/3870.

blasty, leukocyty), wówczas może to być niekorzystne, zwiększające działania niepożądane radioterapii w postaci późnych powikłań popromiennych i nowotworów wtórnych. Popromienny efekt sąsiedztwa może mieć szczególne znaczenie w przypadku stosowania nowoczesnych technik napromieniania, takich jak trójwymiarowa konformalna radioterapia (3D-CRT) i radioterapia intensywnie modulowana dawką (IMRT), których celem jest obniżenie dawki promieniowania w tkankach zdrowych. Badania efektu sąsiedztwa w warunkach *in vivo* na modelach zwierzęcych wykazują, że uszkodzenia popromienne mogą się pojawiać w tkankach odległych od miejsca napromienienia, a ich obraz może się różnić w zależności od typu tkanki. Jednak najnowsze wyniki doświadczalne wykazują, że komórki nienapromieniowane, będące w sąsiedztwie komórek napromieniowanych mogą obniżać efekty wywołane w nich przez promieniowanie. Mniej znane są następstwa efektu sąsiedztwa w przypadku frakcjonowania dawki. Popromienny efekt sąsiedztwa, jego praktyczne skutki i możliwości modulowania dla celów radioterapeutycznych są zatem ciągle niepewne i pozostają przedmiotem intensywnych badań.

Słowa kluczowe: popromienny efekt sąsiedztwa • promieniowanie jonizujące • sygnalizacja międzykomórkowa • niestabilność genetyczna • apoptoza • uszkodzenia cytoogenetyczne • badania *in vitro* i *in vivo* • potencjalne znaczenie kliniczne

Summary

It has long been a central radiobiological dogma that the damaging effects of ionizing radiation, such as cell death, cytogenetic changes, apoptosis, mutagenesis, and carcinogenesis, are the results of the direct ionization of cell structures, particularly DNA, or indirect damage via water radiolysis products. However, several years ago attention turned to a third mechanism of radiation, termed the “bystander effect” or “radiation-induced bystander effect” (RIBE). This is induced by agents and signals emitted by directly irradiated cells and manifests as a lowering of survival, cytogenetic damage, apoptosis enhancement, and biochemical changes in neighboring non-irradiated cells. The bystander effect is mainly observed in *in vitro* experiments using very low doses of alpha particles (range; mGy, cGy), but also after conventional irradiation (X-rays, gamma rays) at low as well as conventional doses. The mechanisms responsible for the bystander effect are complex and still poorly understood. It is believed that molecular signals released from irradiated cells induce different signaling ways in non-irradiated neighboring cells, leading to the observed events. The molecular signals may be transmitted through gap junction intercellular communication and through a medium transfer mechanism. The nature of these transmitted factors are diverse, and still not definitely established. It seems that RIBE may have important clinical implications for health risk associated with radiation exposure. Potentially, this effect may have important implications in the creation of whole-body or localized side effects in tissues beyond the irradiation field and also in low-dose radiological and radioisotope diagnostics. Factors emitted by irradiated cells may result in the risk of genetic instability, mutations, and second primary cancer induction. They might also have their own part in inducing and extending post-radiation side effects in normal tissue. The bystander effect may be a potentially harmful or a useful event in radiotherapy. The elevation of damage to tumor cells not directly hit by radiation or the initiation of tumor cell differentiation may increase the therapeutic ratio. If, however, molecular species secreted by irradiated tumor cells *in vivo* damage neighboring normal cells (epithelial and endothelial cells, fibroblasts, or lymphocytes), the bystander effect would be harmful and could lead to increased side effects in normal tissue. This is especially important in modern radiotherapy, as 3D conformal radiation therapy (3D-CRT) and intensity-modulated radiation therapy (IMRT) are aimed at diminishing the radiation dose in normal tissues. Recent *in vivo* studies on animals indicate that bystander effects may appear in organs and tissues remote from the irradiated field and the extension of tissue damage seems to be tissue-type dependent. However, recent experimental results indicate that non-irradiated cells that are neighbors of irradiated cells may diminish radiation damage in the radiation-focused cells. Less is known about the bystander effect during fractionated irradiation. Thus the clinical implications of the bystander effect and its possible modification for radiotherapeutic usefulness is still under debate.

Key words: radiation-induced bystander effect • ionizing radiation • intercellular signaling • genomic instability • apoptosis • cytogenetic damage • *in vitro* and *in vivo* studies • potential clinical effect

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=892869
Word count:	5390
Tables:	–
Figures:	–
References:	113

Adres autorki: dr hab. Maria Widel, Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział Gliwice, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice; e-mail: widel@io.gliwice.pl

Istotą radiobiologicznego efektu „sąsiedztwa” (taka nazwa naszym zdaniem lepiej określa istotę problemu niż efekt „widza” będący dosłownym tłumaczeniem terminu angielskiego „bystander effect”) wydaje się wolnorodnikowy charakter oddziaływania energii promieniowania na żywą komórkę, którego konsekwencją jest indukowanie w komórce czynników i sygnałów, które nie tylko uszkadzają komórkę napromieniowaną, ale emitowane do środowiska powodują zmiany w komórkach nienapromieniowanych. Zmiany te *in vitro* przypominają zmiany obserwowane w komórkach bezpośrednio napromieniowanych i ujawniają się jako: obniżony poziom przeżycia, uszkodzenia cyto-genetyczne (aberracje chromosomowe i mikrojądra), wzrost poziomu apoptozy, zmiany ekspresji genów i inne. Coraz więcej danych wskazuje, że popromienny efekt sąsiedztwa występuje także w warunkach *in vivo*. Drogi sygnalizacyjne uruchamiane w tym procesie są prawdopodobnie różnorodne, ponieważ różnorodny charakter mają czynniki molekularne, które mogą indukować zmiany w komórkach niepoddanych bezpośrednio działaniu promieniowania. Oprócz krótko żyjących wolnych rodników tlenowych i tlenu azotu wymienia się tu rodniki długo żyjące, interleukinę 8, TGF- β i inne. Jest możliwe, że oddziaływania tych czynników z komórkami nienapromieniowanymi mają znacznie większy udział w odpowiedzi tkanek zdrowych, a także nowotworowych na promieniowanie i są bardziej istotne dla przebiegu i następstw terapii przeciwnowotworowej niż to się sądzi obecnie. W pracy przedstawiono obszerny przegląd różnorodnych aspektów dotyczących efektu sąsiedztwa opartych na dotychczasowej wiedzy literaturowej i wynikach badań własnych.

HISTORIA ZJAWISKA

Pierwsze spostrzeżenia dotyczące zjawiska popromiennego efektu sąsiedztwa pochodzą z początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku. Nagasawa i Little [77] napromieniając niską dawką promieniowania alfa zaledwie 1% komórek jajnikowych chomika chińskiego (CHO) w hodowli zaobserwowali, że uszkodzenia w postaci wymiany chromatyd siostrzanych wystąpiły w około 30% komórek. Poziom tych uszkodzeń wzrastał z dawką 0,3–2,5 mGy, po czym nie zwiększał się. Kolejne eksperymenty wykazywały wzrost liczby komórek z nadekspresją genu *TP53* po dawce 6 mGy promieniowania alfa, lecz nie po ekspozycji na taką samą dawkę promieniowania X [35]. Wkrótce okazało się, że efekt ten występuje także po napromieniowaniu komórek promieniowaniem o niskim współczynniku liniowego przekazywania energii (LET). Zaobserwowano, że czynniki indukujące obserwowane efekty w komórkach nienapromieniowanych mają charakter rozpuszczalny i mogą być przekazywane poprzez podłoże wzrostowe [25,72], lub poprzez międzykomórkowe połą-

czenia szczelinowe (gap junction intercellular communication – GJIC), [1]. Morthersil i Seymour [72] wykazała, że czynniki zawarte w podłożu hodowlanym zebranych z komórek nabłonkowych ekspozowanych na promieniowanie gamma obniżało przeżywalność komórek klonogennych w hodowli komórek nienapromieniowanych, nowotworowych i nabłonkowych, a zatem kontakt komórek napromieniowanych z nienapromieniowanymi nie był konieczny. Autorzy ci zaobserwowali natomiast, że efekt obniżenia przeżywalności komórek nie występował gdy używano podłoża zebranego z napromieniowanych fibroblastów. Takie cytotoksyczne działanie kondycjonowanego podłoża z napromieniowanych komórek (irradiation conditioned medium – ICM) obserwowano w wielu układach doświadczalnych zarówno po zastosowaniu promieniowania cząsteczek α [25,59], jak i promieniowania fotonowego [23,70]. Zaobserwowano też, że czynnikami sygnalizacyjnymi mogą być TNF- α i interleukina 8 [78], a efekt sąsiedztwa występuje w nienapromieniowanych fibroblastach poprzez sygnały przekazywane przez napromieniowane komórki drogą połączeń szczelinowych [1]. Zamknięcie połączeń szczelinowych przez *lindan* prowadziło do zahamowania efektu sąsiedztwa wyrażającego się obniżoną ekspresją *TP53*, *CDKN1A(p21)* i *CDC2* [1] lub zwiększenia przeżycia [11]. W kolejnych latach zgromadzono wiele eksperymentalnych dowodów na potwierdzenie, że popromienny efekt sąsiedztwa może się wyrażać w postaci wzrostu odsetka mikrojąder, apoptozy [57,74,85,86,87], dwuniciowych pęknięć DNA mierzonych ekspresją ufosforylowanego histonu H2A (γ H2AX) [94], akumulacją białka p53 [98] i białek ATM i ATR [15,16], zmianami epigenetycznymi, takimi jak hipometylacja, a także zmianami ekspresji genów [21,41,88,95]. W wielu tych eksperymentach wykazano, że wyższe dawki promieniowania, a także te stosowane w konwencjonalnej radioterapii również indukują efekty sąsiedztwa, co potwierdza wnioski wynikające z ilościowego modelu biofizycznego Nikjoo i Kvostunov [79,80], iż efekt sąsiedztwa może być składnikiem odpowiedzi na promieniowanie zarówno przy niskich jak i wysokich dawkach.

Zastosowanie systemów hodowli wycinków tkanek (eksplantów) [7,8,75] i trójwymiarowej hodowli *in vitro* przypominających modele *in vivo* [9,10,104], a także badania na zwierzętach [50,51,52] zwracają uwagę, iż zjawisko popromiennego efektu sąsiedztwa może mieć znaczenie kliniczne. Nie można zatem wykluczyć, że nasilenie oddziaływań popromiennych w tkankach zdrowych podczas frakcjonowanej radioterapii może być częściowo związane z efektem sąsiedztwa. Podejrzewa się, że efekt ten może także prowadzić do niestabilności genetycznej w warunkach *in vivo*, którego konsekwencją może być wzrost odczynów popromiennych w tkankach zdrowych, a także

rozwój nowotworów drugiego rzutu [34]. Nie zawsze jednak efekt sąsiedztwa ma wyłącznie działanie uszkadzające. Sygnały wysyłane przez komórki napromieniowane do mikrośrodowiska wydają się indukować bardziej złożone efekty w komórkach nieeksponowanych na promieniowanie, m.in. różnicowanie się tych komórek, prawdopodobnie jako kompleksową odpowiedź w celu zachowania integralności tkanek, wskazują na to najnowsze badania na eksplantach inkubowanych *in vitro* [8,104].

POPROMIENNY EFEKT SĄSIĘDZTWA, NIESTABILNOŚĆ GENETYCZNA I RADIOOPORNOŚĆ ADAPTACYJNA

Popromienny efekt sąsiedztwa i niestabilność genetyczna wydają się powiązane. Mianem niestabilności genetycznej określa się opóźniony efekt obserwowany w postaci letalnych mutacji, niestabilnych aberracji chromosomowych, przekazywanych następnym pokoleniom komórek i opóźnionej śmierci reprodukcyjnej (delayed reproductive death – DRD) w odległych pokoleniach komórek uprzednio eksponowanych na promieniowanie [30,71], czy też powstających *de novo* aberracji chromosomowych [44,65,105] i mutacji genów [58]. Opóźniona śmierć reprodukcyjna wyraża się obniżeniem wydajności klonowania, która prawdopodobnie nie jest spowodowana procesem apoptozy, czy nekrozy, aczkolwiek wzrost odsetka apoptozy jest również jednym z markerów popromiennego efektu sąsiedztwa. DRD bywa głównie obserwowana w komórkach o niezakłóconych mechanizmach naprawy dwuniciowych pęknięć DNA [55,56], natomiast nie występuje w komórkach z upośledzeniem tych mechanizmów [19]. Wykazano że klony komórek charakteryzujące się popromienną niestabilnością genetyczną wydzielają czynniki cytotoksyczne przez wiele generacji uszkadzając nienapromieniowane komórki potomne [44] i efekt ten jest niezależny od międzykomórkowych połączeń szczelinowych [76]. Badania niestabilności genetycznej indukowanej w nielicznych komórkach macierzystych szpiku myszy cząstkami alfa *in vitro* wykazały znacznie większą liczbę komórek z aberracjami chromosomowymi niż liczba komórek napromieniowanych. Uszkodzenia te były przenoszone na komórki potomne tworzące kolonie komórek klonogennych [59]. Ponadto, frakcja przeżywiająca komórek klonogennych obniżała się wraz z dawką znacznie bardziej niż wynikałoby to z zabsorbowanej dawki, świadcząc, iż uszkodzenia letalne komórek były wynikiem oddziaływania tych napromieniowanych z nienapromieniowanymi. Obserwowano również zwiększoną częstość mutacji w *locus* dla genu hipoksantyno-guanino-fosforybozylu transferazy (*hprt*) w odległych pokoleniach macierzystych komórek hematopoetycznych myszy napromieniowanych *in vitro* zarówno promieniowaniem X jak i neutronowym [33]. Również ludzkie limfocyty T prezentowały aberracje chromosomowe utrzymujące się w kolejnych pokoleniach komórek, które zostały uprzednio napromieniowane dawką 3Gy promieniowania X [37]. Czynniki indukujące efekty „sąsiedztwa” mogą być przekazywane poprzez połączenia międzykomórkowe (gap junction intercellular communications) [4,113], lub w postaci molekuli sygnalizacyjnych wydzielanych do otoczenia [62,73]. Niektóre z tych czynników mają właściwości klastogenne, wywołując uszkodzenia chromosomów w komórkach nienapromieniowanych, analogiczne jak bezpośrednie działanie promieniowania jonizującego.

Innym zjawiskiem, które towarzyszy działaniu niskich dawek promieniowania jest zjawisko radiooporności adaptacyjnej, która indukowana niskimi dawkami promieniowania (rzędu mGy lub cGy) ujawnia się wzrostem oporności na następne dawki rzędu kilku Gy [67,108]. Mechanizm tego zjawiska nie jest dostatecznie poznany. Napromienianie prowadzi do zakłócenia równowagi między stanem sygnalizacyjnych cząsteczek działających prooksydacyjnie i antyoksydacyjnie [96]. Jedną z takich cząsteczek może być tlenek azotu (NO). Obserwowano wzrost radiooporności komórek ludzkiego glejaka A-172 zawierającego funkcjonalny gen TP53 gdy koinkubowano je z napromieniowanymi (1-10 Gy promieni X) komórkami tej samej linii transfekowanej zmutowanym genem p53 (A-172/mp53), lub kiedy inkubowano je w medium pozyskanym z hodowli komórek napromieniowanych [70]. Wyrazem radiooporności była akumulacja białek p53 i HSP72, która ulegała obniżeniu po zastosowaniu „zmiatacza” tlenku azotu lub inhibitora indukowalnej syntazy tlenku azotu.

Jak wspomniano wcześniej, efekt sąsiedztwa występuje zwłaszcza po zastosowaniu niewielkich dawek promieniowania cząsteczkowego alfa, zaś radiooporność adaptacyjna jest indukowana niskimi dawkami promieniowania gamma lub X. Sawant i wsp. [89] obserwowali, iż ekspozycja komórek C3H 10T91/2) na pojedyncze cząstki promieniowania alfa, które trafiały jedynie w jądra 10% komórek powodowała śmierć znacznie większej liczby komórek. Jednakże zastosowanie 2 cGy promieniowania gamma 6 godzin przed ekspozycją na cząstki alfa zmniejszało efekt sąsiedztwa o połowę, czego wyrazem był wzrost frakcji komórek przeżywiających. W komórkach tej samej linii obserwowano również wzrost oporności na indukowaną dużą dawką promieniowania gamma transformację nowotworową jeżeli wcześniej eksponowano komórki na dawki rzędu cGy promieniowania gamma ⁶⁰Co [3], a także obniżenie odsetka mikrojąder – procesy, którym towarzyszył wzrost wydajności naprawy dwuniciowych pęknięć DNA [5].

Bardzo niskie dawki promieniowania fotonowego (~30 keV) emitowanego przez radioizotop jodu -125, poczynając od mocy dawki 4 mGy/dzień, a kończąc na 1,4 mGy/dzień podczas 88 dni ekspozycji hodowli komórek hybrydowych HeLa z fibroblastami ludzkimi również powodowały wzrost oporności tych komórek na indukcję transformacji nowotworowej po napromienieniu dawką 3 Gy promieniowania gamma ¹³⁷Cs [26]. Zmniejszenie mocy dawki poniżej 1 mGy/dzień niwelowało odpowiedź adaptacyjną, co sugeruje, że raczej niska moc dawki, ale powyżej pewnego progu jest odpowiedzialna za tego typu radioadaptację.

MECHANIZMY EFEKTU SĄSIĘDZTWA

W komórkach napromieniowanych, poza bezpośrednią jonizacją makrocząsteczek, działają uszkadzająco reaktywne formy tlenu (RFT), głównie rodnik hydroksylowy (OH•), H₂O₂ i rodnik ponadtlenkowy (O₂•⁻), których efektem są przede wszystkim oksydacyjne uszkodzenia DNA [66,69]. Czas półtrwania RFT jest niezmiernie krótki, a odległość penetracji wyraża się w ułamkach mikrometra z tego też względu czynniki te nie mogą dotrzeć do komórek nienapromieniowanych. Wykazano jednak, na podstawie elektronowego rezonansu spinowego, że po napromienowaniu mogą się pojawiać w komórce długo żyjące rodniki

o okresie półtrwania ~20 godzin nawet w temperaturze pokojowej [53], które wysyłane do środowiska mogą być czynnikami indukującymi uszkodzenia DNA w komórkach nienapromieniowanych. Długo żyjące (wtórne) rodniki mają prawdopodobnie mniejszą aktywność w uszkodzaniu DNA niż niezwykle aktywne rodniki powstające w chwili napromienienia. Dlatego też uszkodzenia DNA wywołane przez rodniki wtórne mogą nie być wystarczającą przeszkodą do zatrzymania replikacji DNA i mogą prowadzić do powielania zmienionego DNA w kolejnych generacjach komórek, a w końcu do mutacji i transformacji nowotworowej [2,23,42,54]. Zastosowanie w wielu eksperymentach zmiatacza rodników – DMSO, zmniejszające poziom uszkodzeń DNA w komórkach napromieniowanych i hamujące zjawisko sąsiedztwa, zdaje się potwierdzać rolę reaktywnych form tlenu jako inicjatorowych cząsteczek sygnalizacyjnych [32,39,46]. Również zastosowanie witaminy C, jako zmiatacza długo żyjących rodników obniżało poziom mikrojąder w ludzkich fibroblastach koinkubowanych z napromieniowanymi komórkami [32], a także w komórkach białaczki K562 traktowanych kondycjonowaną pożywką zebraną z komórek tej samej linii po napromienowaniu [49].

Jednak nie tylko DNA jest miejscem ataku reaktywnych form tlenu, nie mniej ważnymi są cząsteczki kwasów tłuszczowych, w których łańcuchowa reakcja peroksydacji prowadzi, poprzez krótko żyjące rodniki lipidowe, do wytworzenia stabilnych końcowych produktów, takich jak dialdehyd malonowy (MDA), 4-hydroksynonenal (4HNE) i inne o właściwościach mutagennych i kancerogennych, mogą one bowiem tworzyć masywne addukty z DNA [66,112]. Produkty końcowe peroksydacji lipidów mają właściwości wtórnych przekaźników, które mogą aktywować zarówno kaskadę sygnałów prowadzących do naprawy uszkodzeń DNA, jak i do ich utrwalenia lub też do apoptozy [38]. W badaniach własnych obserwowaliśmy wzrost stężenia MDA zarówno w napromieniowanych komórkach czerniaka ludzkiego Me45 rosnących w postaci megakolonii, jak i w komórkach z megakolonii rosnących w tym samym naczyniu hodowlanym chronionych przed promieniowaniem odpowiednią przesłoną ołowianą [87]. Jednocześnie obserwowaliśmy w obu grupach, napromienionych i sąsiadujących megakolonii, spadek aktywności peroksydazy glutationowej (GSH-Pox) i mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD), a także wzrost pęknięć DNA (jednociowych – SSB i dwunociowych – DSB) ocenianych techniką elektroforezy pojedynczych komórek na żelu agarozowym, a wyrażonych wielością momentu ogonowego lub długością ogona komety. Poziom pęknięć nici DNA był niższy w komórkach nienapromieniowanych i pojawiał się z kilkunastogodzinnym opóźnieniem w stosunku do obserwowanego w komórkach napromieniowanych, co może sugerować udział długo żyjących rodników w indukcji obserwowanego efektu sąsiedztwa. Przesunięte w czasie pojawianie się dwunociowych pęknięć DNA w komórkach sąsiadujących wykazywano na podstawie ekspresji ufosforylowanego histonu H2AX (γ H2AX), jako tzw. *foci* w warunkach *in vitro* [38,94] i *ex vivo* [90]. Podczas gdy fosforylacja histonu H2AX przy serynie 139 jest bardzo wczesnym procesem ujawniającym się w komórkach napromieniowanych w miejscu dwunociowych pęknięć DNA, gdzie formuje on dyskretne ogniska złożone z wielu tysięcy cząsteczek wykrywalnych immunocy-

tochemicznie, pojawianie się ognisk γ H2AX w komórkach koinkubowanych z napromieniowanymi lub inkubowanych z ICM trwa nawet kilkanaście godzin. Ogniska γ H2AX kolokalizują z innymi białkami uczestniczącymi w kontroli cyklu i naprawie uszkodzeń DNA (ATM, MRE11, NBS1, Rad50 i 53BP1), co świadczy o obecności dwunociowych pęknięć DNA w komórkach eksponowanych na sygnały transmitowane przez komórki napromieniowane [94]. Zastosowanie związków obniżających poziom tlenu azotu niwelowało efekt sąsiedztwa ujawniający się ekspresją γ H2AX.

Tlenek azotu wydaje się ważną cząsteczką sygnalizacyjną, transmitowaną przez komórki napromieniowane, która inicjuje zmiany w komórkach nieeksponowanych na promieniowanie [69,70,91,93]. Ta mała cząsteczka jest również wolnym rodnikiem i jest syntetyzowana z L-argininy z udziałem enzymu syntazy tlenu azotu (NOS). Pełni ona ważną rolę w wielu procesach biologicznych, często przeciwstawną, np. pobudzanie proliferacji lub apoptozy przede wszystkim zależnie od stężenia [93]. Tlenek azotu niezbędny w organizmie jako wazodylator, neuroprzekaźnik i immunomodulator, może uszkadzać DNA przez generowanie peroksynitrytu (ONOO⁻), który może powodować oksydację lub nitrację DNA [109]. Shao i wsp. [91,93] wykazali, że generowany przez promieniowanie NO indukował w napromieniowanych komórkach glejaka TGF- β 1, czynnik transkrypcyjny o wielorakiej funkcji, zaangażowany w transkrypcję białek biorących udział w proliferacji i różnicowaniu komórek, immunomodulacji, kontroli cyklu komórkowego i apoptozy [68]. Zastosowanie inhibitora indukowalnej syntazy tlenu azotu lub przeciwciała anty-TGF- β obniżało odsetek mikrojąder zarówno w komórkach bezpośrednio napromieniowanych cząstkami alfa, jak i w sąsiadujących z nimi komórkach nienapromieniowanych wskazując na dodatnie sprzężenie zwrotne. Jednakże rola NO jako mediatora efektu sąsiedztwa nie była obserwowana we wszystkich badanych liniach komórek glejaka [70]. W kilku typach nowotworów (rak okrężnicy, rak płuca i gardła) ekspresja indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS) była jednocześnie związana z mutacją p53 [54] wskazując iż prawidłowe białko TP53 może negatywnie regulować akumulację iNOS.

Wiele innych czynników proponowano również jako mediatory efektu „bystander”, wśród nich interleukinę 8 [78], TNF- α i rozpuszczalne ligandy śmierci Fas i TRAIL [60]. Również wiele ścieżek sygnałowych jest uruchamianych w przekazywaniu efektu sąsiedztwa. Sygnały indukowane w komórkach fibroblastów ludzkich przez promieniowanie alfa (0,3–3 cGy) i transmitowane drogą połączeń szczelinowych lub wydzielane do otaczającego środowiska aktywują w komórkach sąsiednich kinazy MAP, białka NF- κ B, Raf-1, ERK1/2, JNK, AP-1 i inne [4,61]. Ponieważ zastosowanie dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, enzymów neutralizujących powstające rodniki tlenowe i nadtlenek wodoru powodowały hamowanie efektu sąsiedztwa w postaci m.in. obniżenia poziomu mikrojąder, zahamowania aktywacji jądrowego czynnika NF- κ B i MAPK p38, mediatorem tych procesów wydają się reaktywne formy tlenu i azotu [4].

Napromieniając pojedynczymi jonami helu wyłącznie samo jądro, albo tylko cytoplazmę indukowano w komórkach HeLa efekt sąsiedztwa obserwowany jako ekspresja

53BP1, białka wiążącego p53 tworzącego ogniska w miejscach dwuniciowych przerw DNA [98]. Zastosowanie inhibitora indukowanej syntazy NO, aminoguanidyny lub zmiatacza rodników DMSO powodowało zahamowanie ekspresji 53BP1 zarówno w komórkach napromieniowanych, jak i koinkubowanych z nimi komórkach nienapromieniowanych wskazując na NO i RFT jako mediatorów tych uszkodzeń. Jednocześnie obserwowano, że pod wpływem działania antybiotyku *filipin*, który uszkadza mikrodomeny glikosfingolipidowe w błonie komórkowej następowo zahamowanie przekazywania sygnałów z komórek napromieniowanych do sąsiadujących i drastyczne obniżenie skupisk 53BP1, co ujawnia iż przekazywanie sygnałów sąsiedztwa jest zależne od integralności błony komórkowej. Natomiast integralność błony nie była niezbędna do generowania uszkodzeń w komórkach napromieniowanych. Także obecność mitochondriów była niezbędna do generowania sygnałów sąsiedztwa przez komórki napromieniowane, natomiast nie była ona konieczna do ich odbioru [98].

Pewną rolę w przekazywaniu sygnałów sąsiedztwa zdają się odgrywać wapniowe kanały jonowe. Zaobserwowano, że aminy biogenne, takie jak serotonina (5-hydroksytryptamina, 5-HT) i dopamina mogą być przekaźnikami sygnałów emitowanych przez komórki napromieniowane. Poziom neuroprzekaźnika 5-HT w medium hodowlanym obniżał się po napromienieniu komórek prawdopodobnie w wyniku wiązania się z receptorami 5-HT, które stanowią kanały wapniowe, a jednocześnie obserwowano wzrost poziomu mikrojąder w tych komórkach [84]. Efekty te były niwelowane po traktowaniu komórek blokerem kanałów wapniowych kalcykludyną (*calcicludein*) lub rezerpiną, która jest naturalnym antagonistą serotoniny [84,92].

Badania poziomu transkryptów z użyciem mikromacierzy mogą wskazać ścieżki sygnalizacyjne i geny, które są zaangażowane w popromienny efekt sąsiedztwa. Gandhi i wsp. [29] badając całkowitą ekspresję genów (*global gene expression*) zaobserwowali, że po napromienieniu ludzkich fibroblastów płucnych cząstkami alfa w dawce 0,5 Gy i 4-godzinnej koinkubacji z nienapromieniowanymi ekspresja ponad 300 genów w obu grupach, napromieniowanej i nienapromieniowanej ulegała zmianie, przy czym 165 genów było wspólnych dla obu grup. Wśród nich znajdowały się geny, które ulegały nadekspresji głównie w komórkach napromieniowanych (*CDKN1*) i takie, które ulegały nadekspresji w równym stopniu w komórkach sąsiadujących, a mianowicie regulowane przez *NF-κB* geny *PTGS2* (*cyklooksygenazy 2*), *IL8* i *BCL2A1*.

Chaudhry [21] natomiast obserwował iż profil ekspresji genów różni się w komórkach fibroblastów ludzkich bezpośrednio napromieniowanych i w nienapromieniowanych komórkach sąsiadujących poddanych tylko działaniu podłoża kondycjonowanego. W tych pierwszych nadregulacji ulegały geny odpowiedzi na promieniowanie, natomiast w komórkach „bystander” nadregulacji ulegały geny zaangażowane w komunikację międzykomórkową.

W badaniach własnych, stosując technikę mikromacierzy ocenialiśmy również efekt sąsiedztwa na poziomie genu. Zaobserwowaliśmy, że podłoże pozyskane z hodowli komórek czerniaka Me45 napromieniowane dawką 4Gy fotonów X (podłoże kondycjonowane) powodowało zmiany

ekspresji ponad 10 tysięcy genów, podobne do tych indukowanych bezpośrednio promieniowaniem X. Nadekspresji ulegało ponad 5700 genów (stosunek sygnału w grupie badanej do sygnału w kontroli, *SR*>1,1), zaś obniżonej ekspresji (*SR*<0,9) ponad 5000 genów mierzonej w komórkach po 36 godzinach od napromieniowania lub tylko po inkubacji z kondycjonowanym podłożem [88]. Prawie 90% tych genów było wspólnych dla obu grup doświadczalnych i obejmowało geny biorące udział w interakcji neuronalnych ligandów-receptorów, interakcji cytokin, sygnalizacji komórkowej zależnej od jonów wapnia, oksydatywnej fosforylacji, metabolizmie puryn i regulacji cyklu komórkowego. Wszystkie te badania wskazują na niezwykle złożony mechanizm odpowiedzi komórek zarówno na promieniowanie jonizujące, jak i na sygnały transmitowane przez nie w celu komunikacji z komórkami sąsiadującymi.

ROLA BIAŁA P53 W ODPOWIEDZI KOMÓREK NA SYGNAŁY EFEKTU SĄSIEDZTWA

Gen *p53* jest genem supresorowym, który bierze udział w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy. Jego zasadnicza rola polega na zapobieganiu przekazywania zaburzeń genetycznych komórkom potomnym przez wydłużanie fazy G1 cyklu komórkowego, co umożliwia naprawę uszkodzeń DNA indukowanych różnymi czynnikami egzogennymi i endogennymi, głównie stresem oksydacyjnym. Jeśli uszkodzenie jest zbyt duże lub naprawa nieskuteczna, gen *p53* uruchamia proces apoptozy poprzez własny produkt, białko *p53*, które jest czynnikiem transkrypcyjnym wielu genów, m.in. biorących udział w naprawie DNA, regulacji cyklu komórkowego i apoptozie [22,64,100].

Udział białka *p53* w efekcie sąsiedztwa jest jednak dyskusyjny. Badania wykonane na liniach ludzkich fibroblastów, których tylko niewielka część była ekspozycja na promieniowanie alfa wykazały znaczny wzrost białka *p53*, a także *p21^{Waf1}* nie tylko w komórkach, których jądra były trafione cząstkami alfa, ale także w komórkach nietrafiionych [1]. Efekt ten zniżył po zastosowaniu inhibitora szczelinowych połączeń międzykomórkowych. Podobnie, obserwowano ekspresję białka *p53* w komórkach nabłonkowych szczurzego płuca, które sąsiadowały z komórkami napromieniowanymi cząstkami alfa [35]. Jednak obserwowano wzrost przeżywalności komórek klonogennych ludzkich fibroblastów po dawce 2 i 4 Gy jeżeli uprzednio ekspozycja na medium przeniesione z hodowli tych samych fibroblastów napromieniowanych dawką zaledwie 1 cGy promieniowania gamma. Temu zjawisku towarzyszyło m.in. obniżenie poziomu białka *p53* oprócz wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowej puli reaktywnych rodników tlenowych i białka naprawy DNA, nukleazy APE [43].

Pojawieniu się dwuniciowych pęknięć DNA towarzyszy wiązanie się białka 53BP1 (*p53-binding protein 1*), którego ogniska mogą być wykrywane immunocytochemicznie z użyciem fluorescencyjnie znakowanych przeciwciał. Wykazano, że napromienianie wyłącznie cytoplazmy komórek pojedynczymi cząstkami alfa indukowało wzrost ognisk 53BP1 nie tylko w jądrach komórek napromieniowanych, ale i sąsiadujących z nimi komórek nienapromieniowanych [98]. Zastosowanie inhibitorów wobec reaktywnych rodników tlenowych i tlenku azotu zapobiegało tworzeniu się pęknięć DNA w komórkach napromieniowanych i sąsiadujących, wskazując jednocześnie, że sygnały efektu sąsiedztwa transmitowane

są nie tylko między komórkami, ale i między przedziałami wewnątrz komórki. Również zastosowanie swoistego antybiotyku (*filipin*) wykazującego powinowactwo do błon powodowało obniżenie liczby skupisk 53BP1 w komórkach koinkubowanych ujawniając, iż sygnalizacja efektu sąsiedztwa wymaga integralności błony komórkowej [98].

Badania na zwierzętach, którym podawano 1 Gy promieniowania X zarówno na całe ciało, jak i jedynie na obszar głowy ujawniły ekspresję białka p53 w śledzionie zwierząt, wskazując na zaangażowanie genu *p53* w efekt sąsiedztwa *in vivo* [52].

Natomiast w badaniach własnych na komórkach raka jelita grubego, linii HCT116 różniących się statusem genu *p53*, stosując układ kokulturywacji komórek napromieniowanych na płytkach 6-dołkowych z nienapromieniowanymi rosnącymi w specjalnych wkładkach (Corning) wykazaliśmy, że gen *p53* nie jest niezbędny do ujawnienia popromiennego efektu sąsiedztwa. Obserwowaliśmy, iż nienapromieniowane komórki linii HCT116 *p53^{-/-}* są nawet bardziej wrażliwe na indukcję apoptozy przez sygnały wysyłane przez napromieniowane (dawką 2 Gy) komórki tej samej linii lub linii *p53^{+/+}*, niż komórki HCTp53^{+/+} (Widel i wsp. w przygotowaniu). W tych samych eksperymentach wykazano, że poziom mikrojąder indukowanych w koinkubowanych z napromieniowanymi komórkami nie różnił się w przypadku obu linii. Zatem różne kryteria oceny mogą ujawniać odmienną rolę genu *p53* w odpowiedzi na sygnały sąsiedztwa.

POPROMIENNY EFEKT SĄSIEDZTWA MOŻE DZIAŁAĆ DWUKIERUNKOWO

Najnowsze badania wykazują, że w układzie, gdy komórki napromieniowane są inkubowane w sąsiedztwie komórek nienapromieniowanych występuje wzajemne oddziaływanie obu tych populacji komórek. Tak więc sygnały wysyłane są nie tylko przez komórki napromieniowane prowadząc do powstania uszkodzeń w komórkach nieeksponowanych na działanie promieniowania, ale komórki nieeksponowane próbują odpowiedzieć na sygnały pochodzące z komórek bezpośrednio napromieniowanych. Eksperymenty wykonane na komórkach czerniaka MM576, których celem było badanie wpływu modulacji pola napromieniania, przypominającego technikę intensywnie modulowanej radioterapii (IMRT), na przeżywalność wykazały, iż wzajemna komunikacja komórek przebiega w trojaki sposób [63]. Pierwszy typ tej komunikacji, to klasyczny „bystander effect”, kiedy komórki napromieniowane w jednej części pola uszkodzają sąsiadujące nienapromieniowane komórki rosnące w drugiej części pola. Drugi typ, to efekt powodujący wzrost przeżywalności komórek nienapromieniowanych koinkubowanych z komórkami napromieniowanymi wysokimi dawkami (6,10,20 Gy) lub nawet dawką letalną. Jednym z czynników odpowiedzialnych za ten proces jest według autorów „wybuch sygnałów śmierci” („death-burst signals”), który pobudza nienapromieniowane komórki do proliferacji, aczkolwiek autorzy nie określają chemicznej natury tych sygnałów. Trzeci typ komunikacji powodował wzrost komórek, które otrzymały wysoką dawkę promieniowania dzięki sygnalizacji pochodzącej od komórek sąsiadujących napromieniowanych w drugiej części pola niską dawką [63].

Napromienianie fibroblastów ludzkich niskimi dawkami promieniowania alfa również powodowało wzrost prolife-

racji, obniżenie poziomu białka p53 i CDKN1 (*p21^{Waf-1}*) i wzrost poziomu kinazy CDC2. Ten promitogeny efekt był związany ze wzrostem poziomu TGFβ1 indukowanego przez reaktywne formy tlenu [42].

Nasze niedawne badania ujawniły podobny do opisanego przez Mackonisa [63] efekt sąsiedztwa typu trzeciego, który nazywamy „bilateralnym efektem sąsiedztwa” [107, Widel i wsp. w przygotowaniu]. Stosując system koinkubacji komórek mysiego raka płuca (LLC) napromieniowanych na płytkach 6-dołkowych z nienapromieniowanymi fibroblastami mysimi NIH3T3 rosnącymi we wkładkach badaliśmy efekty wzajemnego oddziaływania komórek w postaci mikrojąder i apoptozy. Komórkom rosnącym w dołkach przed napromienianiem wymieniano pożywkę i napromieniano dawkami 2 i 4 Gy promieniowania X generowanego przez terapeutyczny akcelerator (Clinac 600). Natychmiast po napromienianiu w dołkach umieszczano wkładki z fibroblastami bez medium hodowlanego. Średnica porów (0,4 μm) umożliwiała przenikanie podłoża z dołków do wkładek, nie pozwalając na mieszanie się komórek. Inna grupa napromienionych komórek LLC była koinkubowana z pustymi insertami. Wyniki wykazały, że napromieniowane komórki nowotworowe indukują mikrojądra i apoptozę w koinkubowanych fibroblastach. Jednocześnie zaobserwowaliśmy, iż odsetek mikrojąder i apoptozy w komórkach LLC koinkubowanych po napromienieniu z fibroblastami NIH3T3 obniżał się w porównaniu z poziomem w komórkach LLC koinkubowanych z pustymi wkładkami. Mechanizm tego zjawiska wymaga wyjaśnienia. Możemy przypuszczać, że ma tu udział TGF-β ponieważ wstępne wyniki uzyskane techniką ELISA wykazują różnicę w poziomie tej cytokiny w medium zebranych z hodowli w obu tych układach (Widel i wsp. w przygotowaniu). Wydaje się, że ten „odwrotny fenomen sąsiedztwa” jest cechą także fibroblastów ludzkich, bowiem podobny efekt obniżenia poziomu mikrojąder i apoptozy obserwujemy w napromieniowanych komórkach czerniaka ludzkiego koinkubowanych z ludzkimi fibroblastami (Widel i wsp. niepublikowane). Opisany efekt prawdopodobnie może się zdarzyć w radioterapii powodując obniżanie poziomu uszkodzeń komórek nowotworowych przez obecne w guzie fibroblasty.

EFEKT SĄSIEDZTWA *IN VIVO*

Zjawisko popromiennego efektu w tkankach odległych od miejsca napromieniania nazwane w języku angielskim „abscopal effect” zaobserwowano ponad 50 lat temu jako zmiany hematologiczne szpiku kostnego u dzieci, które były napromieniane na okolicę śledziony w procesie leczenia białaczki [81]. Podobne doniesienia pojawiały się w latach 60. ub.w., inspirowane tym samym badania *in vitro*, w których wykorzystując surowicę uzyskaną od chorych po radioterapii, indukowano uszkodzenia cytotogenetyczne w limfocytach w hodowli [36]. Obserwacje, iż napromienianie guza umiejscowionego na jednym boku myszy powodowało także zahamowanie wzrostu guza leżącego poza polem napromieniania, były tłumaczone jako efekt aktywacji układu immunologicznego [24]. Ciekawe jest jednak to, iż zahamowanie wzrostu guza leżącego poza polem napromieniania było zależne od dawki frakcyjnej i liczby frakcji [18], a zastosowanie inhibitora białka p53 (*pifthrin-α*) niwelowało to hamowanie wzrostu wskazując, że mediatorem efektu „abscopal” może być białko p53. Doniesienia ostat-

nich kilku lat potwierdzają, że efekt ten może być uważany za efekt sąsiedztwa *in vivo*, aczkolwiek zjawisko takie nie dotyczy wyłącznie promieniowania [45].

Przekonujące zmiany potwierdzające występowanie efektu sąsiedztwa *in vivo* obserwowano w obrębie jednego narządu [47]. Jeżeli podstawę płuca szczura napromieniano dawką 10 Gy, osłaniając jednocześnie pozostałe 70% płuca, to znaczące zmiany w postaci wczesnych uszkodzeń DNA (mikrojąder) obserwowano w obrębie osłoniętych szczytów płuca. Poza tym obserwowano, że różne fragmenty płuca różnią się poziomem mikrojąder w odpowiedzi, czy to na bezpośrednie napromienienie, czy też tylko na sygnały efektu sąsiedztwa [47]. Uszkodzeniom DNA w komórkach fibroblastów płucnych leżących w polu napromienienia, ale także w mniejszym stopniu poza polem napromienienia towarzyszyły zmiany ekspresji cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β), oraz aktywacja makrofagów [96], sugerując, że czynniki zapalne indukowane przez reaktywne formy tlenu w komórkach układu immunologicznego są mediatorami uszkodzeń DNA w docelowych komórkach tkanki płucnej.

Wyniki badań na zwierzętach wykazują, że napromienianie jedynie głowy myszy dawką 1 Gy wywołuje podobne zmiany jakościowe w śledzionie, takie jak napromienianie całego ciała wyrażające się w postaci nadekspresji białka p53, zmiany tempa proliferacji mierzone ekspresją antygenu proliferacyjnego Ki67, jak również wzrostu odsetka apoptozy i dwuniciowych pęknięć DNA, których markerem były ogniska histonu γ H2AX [52]. Proces fosforylacji jest jednym z wielu typów modyfikacji histonów obejmujących ponadto metylację, acetylację i ubikwitynację, które są określane mianem zmian epigenetycznych. Zaobserwowano, że indukowana przez promieniowanie jonizujące hipometylacja była związana z naprawą DNA [82,83]. Wykazano, że po ekspozycji obszaru hipokampa u szczurów na dwukrotną dawkę 10 Gy promieniowania X występowały w śledzionie znaczne zmiany w metylacji DNA, w ekspresji metylotransferaz i białka wiążącego grupy metylowe, retrotransposomalnego elementu LINE-1, oraz nadekspresja jednego z mikro RNA, miR-194, utrzymujące się od 24 godzin do siedmiu miesięcy, którym towarzyszyła obniżona ekspresja onkogenów *NOTCH1*, *MYC* oraz białek E2F3 i cykliny D1 [40]. A zatem transkrypcyjnie regulowane zmiany epigenetyczne są niewątpliwie związane z popromiennym efektem sąsiedztwa, lecz mogą być swoiste dla niektórych tkanek, bowiem podobne zmiany nie występowały w tkance skórnej [40,50].

Wszystkie te doświadczenia wskazują, że komórki i tkanki napromienowane *in vivo* wysyłają sygnały, które są przekazywane drogą parakrynną i endokrynną i są w stanie indukować pęknięcia DNA, apoptozę, efekty klastogenne, a także zmiany epigenetyczne, które prowadzą do niestabilności genetycznej. Konsekwencją tych długo utrzymujących się zmian mogą być późne efekty popromienne, a także nowotwory drugiego rzutu.

POTENCJALNE KONSEKWENCJE KLINICZNE POPROMIENNEGO EFEKTU SĄSIEDZTWA

Wprawdzie bezpośrednie ekstrapolowanie wyników z eksperymentów *in vitro* do sytuacji *in vivo* w radioterapii, gdzie mamy do czynienia z trójwymiarową strukturą tka-

nek nie jest możliwe, to należy przypuszczać, że efekt sąsiedztwa wiąże się z ryzykiem popromiennych powikłań w tkankach zdrowych włącznie z indukacją mutacji i wtórnych nowotworów. Sugeruje się, że u chorych poddanych radioterapii niestabilność genetyczna, która przybiera postać opóźnionej śmierci reprodukcyjnej (DRD) może mieć udział w powstawaniu odczynów popromiennych w tkankach prawidłowych z powodu zwiększonej utraty komórkowej, dłuższej odnowy i w konsekwencji wzrostu uszkodzeń [34]. Zwiększony poziom aberracji chromosomowych i mikrojąder wykrywa się po roku u chorych poddawanych radioterapii np. z powodu nowotworów regionu głowy i szyi [28]. Zjawisko DRD związane z obecnością zwiększonego odsetka stabilnych i niestabilnych aberracji chromosomowych wykrywano w limfocytach u chorych leczonych napromienianiem z powodu zeszywniającego zapalenia kręgosłupa nawet po 30 latach od radioterapii (cytowane za [34]). Jednakże inne badania wykonane u osób dorosłych wiele lat po radioterapii stosowanej w wieku dziecięcym nie wykazały niestabilności genetycznej [99] podobnie jak u osób mających zawodowy kontakt z promieniowaniem, którzy doznali skażenia wewnętrznego plutonem co najmniej 10 lat wcześniej [106].

Z kolei, powstanie w wyniku niestabilności genetycznej mutatorowego fenotypu, mogłoby – jak się wydaje – zwiększać prawdopodobieństwo indukcji nowotworów wtórnych. Na modelu zwierzęcym wykazano, że promieniowanie jonizujące indukuje niestabilność genetyczną ujawniającą się jako opóźnione mutacje genu *p53*, częstsza transformacja w komórkach nabłonkowych gruczołu młecznego i w konsekwencji rozwój nowotworu [103].

Chorzy napromieniani z powodu nowotworów wykazują w porównaniu z osobami zdrowymi wzrost zachorowalności na nowotwory pierwotne drugiego rzutu [12,14,48,101], aczkolwiek popromienny efekt sąsiedztwa nie musi być jedyną przyczyną tego wzrostu. Wiadomo bowiem, że istotny wpływ na powstawanie nowotworów mogą mieć czynniki środowiskowe oraz predyspozycje genetyczne. Wraz z rozwojem nowoczesnych technik napromieniania, takimi jak trójwymiarowa radioterapia konformalna (3D-CRT) i radioterapia intensywnie modulowaną dawką (IMRT), których celem jest obniżenie dawki w tkankach zdrowych, rośnie zagrożenie niepożądanymi efektami wynikającymi z możliwego efektu sąsiedztwa, zwłaszcza, że przy tych technikach napromieniania większe objętości prawidłowych tkanek są ekspozowane na mniejsze dawki [31]. Ryzyko wtórnych nowotworów rośnie zwłaszcza w raku stercza [14] i szyjki macicy [12,48,101]. W terapii przeciwnowotworowej stercza chirurgia i radioterapia są metodami o porównywalnej skuteczności, zatem ewentualne późne następstwa w postaci wtórnych nowotworów powinny być brane pod uwagę, zwłaszcza u młodszych osób z perspektywą dłuższego czasu przeżycia. Brenner i wsp. [14] porównując częstość występowania nowotworów drugiego rzutu u chorych na raka stercza leczonych wyłącznie chirurgicznie (ponad 50 tys.) i chorych poddanych radioterapii (ponad 70 tys.), zaobserwowali statystycznie znamienne, chociaż niewielki wzrost ryzyka nowotworów wtórnych w tej ostatniej grupie (6%, $p=0,02$). Ryzyko to wiązało się z dawką i z czasem latencji i rosło ze wzrostem czasu przeżycia. Wynosiło ono 15% dla chorych przeżywających ponad 5 lat i 34% dla chorych przeżywających ponad 10 lat. Pojawiające się

nowotwory były to nowotwory lite, takie jak rak pęcherza, jelita grubego i płuc oraz mięsaki, te ostatnie w obrębie pola napromienienia. Autorzy nie obserwowali przypadków białaczki w grupie badanych chorych.

Ryzyko wtórnych nowotworów po radioterapii raka szyjki macicy jest podobne jak w raku stercza. Badania Kleinerman i wsp. [48], w których również porównywano ryzyko wystąpienia wtórnych nowotworów u chorych napromienianych z powodu inwazyjnego raka szyjki macicy (prawie 50 tys.) z grupą chorych nienapromienianych, przeżywających ponad 30 lat wykazały 12% wzrost zachorowań na nowotwory wtórne, przy czym po 10 latach wzrost ten wynosił 15%, a po 20 latach 26%. Nowotwory, takie jak rak okrężnicy i odbytnicy, pęcherza, pochwy i jajnika były w obrębie pola, które objęte było wysoką dawką promieniowania, natomiast pojawiły się nieliczne przypadki białaczki. Jednakże połowę nowotworów wtórnych stanowił rak płuca. Pojawienie się raka płuca, narządu relatywnie odległego od miejsca napromieniania guza pierwotnego, w którym dawka promieniowania oszacowana była na ~0,6 Gy [14], wydaje się związane z efektem sąsiedztwa indukowanym przez cząsteczki sygnalizacyjne, potencjalnie mutagenne i kancerogenne generowane przez napromienione komórki, aczkolwiek podłoże genetyczne, czynniki środowiskowe i styl życia u tych chorych może też mieć znaczący udział.

Opracowania Followilla i wsp. [27] w oparciu o wyliczenia równoważnej dawki na całe ciało podanej techniką IMRT wysokoenergetycznego promieniowania generowanego przez obecne akceleratory terapeutyczne, wskazują, że w porównaniu z konwencjonalną radioterapią ryzyko wtórnych nowotworów litych znacznie wzrasta. Wzrost ten jest zależny od energii promieniowania X i wynosi 1% dla energii 6 MV, 4,5% dla energii 18 MV i 8,4% dla 25 MV w porównaniu z 0,4, 1,6 i 3% odpowiednio dla tychże samych energii promieniowania X podanego w sposób konwencjonalny. Z opracowania tego wynika, że ryzyko powstawania białaczek w systemie napromieniania intensywnie modulowaną dawką również wzrasta.

Ostatnio w kilku opracowaniach [97,101,102,110] zwrócono uwagę na problem nowotworów wtórnych jako następstwa radioterapii. W oparciu o badania epidemiologiczne oraz radiobiologiczne dane eksperymentalne, Suit i wsp. [97] stwierdzają, że zależność ryzyka indukcji nowotworu od dawki jest złożona i różni się nie tylko między gatunkami ssaków, między osobnikami danego gatunku, ale może być różna dla różnych tkanek i organów. I tak różnie ono wraz z dawką 1–45 Gy w raku żołądka i trzustki, lecz zależność ta jest niezmienna w zakresie dawek 1–60 Gy w raku pęcherza, a nawet negatywna w raku okrężnicy [97]. Zjawiska te są trudne do wytłumaczenia. Może to prawdo-

podobnie być wynikiem większej niestabilności genetycznej, jako efektu sąsiedztwa przy niższych dawkach podanych na obszar guza, a jednocześnie zahamowania emisji sygnałów sąsiedztwa przez letalnie uszkodzone wyższymi dawkami komórki.

Międzynarodowa Komisja do Spraw Ochrony Radiologicznej podkreśla trzy ustalone na podstawie różnych badań wnioski:

- 1) większość nowotworów wtórnych pojawia się w bliskim sąsiedztwie pola napromieniania, a więc w obszarze wysokich i średnich dawek,
- 2) dzieci są znacznie bardziej wrażliwe na kancerogenne działanie promieniowania jonizującego,
- 3) różne organy różnią się bardzo znacznie pod względem podatności na kancerogenezę indukowaną promieniowaniem [cytowane za 48].

Jednakże niezbędne są zintegrowane badania radiobiologów, fizyków i biologów nad tym problemem, aby opracować właściwe zalecenia i protokoły, które mogą nawet zmienić dotychczasową koncepcję radioterapii. Zamiast dążyć do podania maksymalnie tolerowanej dawki przez dany organ, należy raczej dążyć do podania na guz minimalnej dawki skutecznej [102].

Możliwe jest jednak, iż prożyciowe sygnały wysyłane przez letalnie uszkodzone komórki, jak te obserwowane przez Mackonisa i wsp. [63] mogą zwiększać szanse przeżycia innych, mniej uszkodzonych komórek guza w obrębie pola napromienienia i mogą stanowić ryzyko powstania wznowy miejscowej.

Wydaje się, że efekt sąsiedztwa może mieć też korzystny wpływ na wyniki radioterapii, a mianowicie w terapii radioizotopowej i w brachyterapii [13,111], w których komórki guza napromieniane w wyniku pochłonięcia izotopu lub absorpcji energii są w bezpośrednim sąsiedztwie z komórkami nienapromienianymi, indukując w nich uszkodzenia. Efekt sąsiedztwa może też zwiększać uszkodzenia w komórkach nowotworowych poddanych terapii neutronowo-boronowej (boron neutron capture therapy) [6]. Opisany wcześniej „abscopal efekt” jest także przykładem ujawniającym korzystne działanie napromienionych komórek nawet na odległe od nich komórki nowotworowe [45].

Zatem, potencjalne i realne konsekwencje kliniczne popromiennego efektu sąsiedztwa istnieją, jednak jak dotąd nie jesteśmy w stanie przewidywać czy i jaką postać będą one przybierały u danego pacjenta bez znajomości podłoża genetycznego jego radiowrażliwości. Tym bardziej nie jesteśmy jeszcze w stanie modulować odpowiedzi pacjenta na sygnały generowane w tym procesie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Azzam E.I., de Toledo S.M., Gooding T., Little J.B.: Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluency of alpha particles. *Radiat. Res.*, 1998; 150: 497–504
- [2] Azzam E.I., de Toledo S.M., Little J.B.: Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene*, 2003; 22: 7050–7057

- [3] Azzam E.I., de Toledo S.M., Raaphorst G.P., Mitchel R.E.: Low-dose ionizing radiation decreases the frequency of neoplastic transformation to a level below the spontaneous rate in C3H 10T1/2 cells. *Radiat. Res.*, 1996; 146: 369–373
- [4] Azzam E.I., de Toledo S.M., Spitz D.R., Little J.B.: Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures. *Cancer Res.*, 2002; 62: 5436–5442

- [5] Azzam E.I., Raaphorst G.P., Mitchel R.E.: Radiation-induced adaptive response for protection against micronucleus formation and neoplastic transformation in C3H 10T1/2 mouse embryo cells. *Radiat. Res.*, 1994; 138(Suppl.1): S28–S31
- [6] Barth R.F., Coderre J.A., Vicente M.G., Blue T.E.: Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 3987–4002
- [7] Belyakov O.V., Folkard M., Mothersill C., Prise K.M., Michael B.D.: Bystander-induced apoptosis and premature differentiation in primary urothelial explants after charged particle microbeam irradiation. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 2002; 99: 249–251
- [8] Belyakov O.V., Folkard M., Mothersill C., Prise K.M., Michael B.D.: Bystander-induced differentiation: A major response to targeted irradiation of a urothelial explant model. *Mutat. Res.*, 2006; 597: 43–49
- [9] Belyakov O.V., Mitchell S.A., Parikh D., Randers-Pehrson G., Marino S.A., Amundson S.A., Geard C.R., Brenner D.J.: Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 14203–14208
- [10] Bishayee A., Hill H.Z., Stein D., Rao D.V., Howell R.W.: Free radical-initiated and gap junction-mediated bystander effect due to nonuniform distribution of incorporated radioactivity in a three-dimensional tissue culture model. *Radiat. Res.*, 2001; 155: 335–344
- [11] Bishayee A., Rao D.V., Howell R.W.: Evidence for pronounced bystander effects caused by nonuniform distributions of radioactivity using a novel three-dimensional tissue culture model. *Radiat. Res.*, 1999; 152: 88–97
- [12] Boice J.D.Jr, Day N.E., Andersen A., Brinton L.A., Brown R., Choi N.W., Clarke E.A., Coleman M.P., Curtis R.E., Flannery J.T., et al. Second cancers following radiation treatment for cervical cancer: an international collaboration among cancer registries. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1985; 74, 955–975
- [13] Brans B., Linden O., Giammarile F., Tennvall J., Punt C.: Clinical applications of newer radionuclide therapies. *Eur. J. Cancer.*, 2006; 42: 994–1003
- [14] Brenner D.J., Curtis R.E., Hall E.J., Ron E.: Second malignancies in prostate carcinoma patients after radiotherapy compared with surgery. *Cancer*, 2000; 88: 398–406
- [15] Burdak-Rothkamm S., Rothkamm K., Prise K.M.: ATM acts downstream of ATR in the DNA damage response signaling of bystander cells. *Cancer Res.*, 2008; 68: 7059–7065
- [16] Burdak-Rothkamm S., Short S.C., Folkard M., Rothkamm K., Prise K.M.: ATR-dependent radiation-induced γ H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells. *Oncogene*, 2007; 26: 993–1002
- [17] Calveley V.L., Khan M.A., Yeung I.W., Vandyk J., Hill R.P.: Partial volume rat lung irradiation: temporal fluctuations of in-field and out-of-field DNA damage and inflammatory cytokines following irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2005; 81: 887–899
- [18] Camphausen K., Moses M.A., Menard C., Sproull M., Beecken W.D., Folkman J., O'Reilly M.S.: Radiation abscopal antitumor effect is mediated through p53. *Cancer Res.*, 2003; 63: 1990–1993
- [19] Chang W.P., Little J.B.: Evidence that DNA double strand breaks initiate the phenotype of delayed reproductive death in Chinese hamster ovary cells. *Radiat. Res.*, 1992; 131: 53–59
- [20] Chaturvedi A.K., Engels E.A., Gilbert E.S., Chen B.E., Storm H., Lynch C.F., Hall P., Langmark F., Pukkala E., Kaijser M., Andersson M., Fosså S.D., Joensuu H., Boice J.D., Kleinerman R.A., Travis L.B.: Second cancers among 104,760 survivors of cervical cancer: evaluation of long-term risk. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2008; 99: 1634–1643
- [21] Chaudhry M.A.: Bystander effect: Biological endpoints and microarray analysis. *Mutat. Res.*, 2006; 597: 98–112
- [22] Chipuk J.E., Green D.R.: Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.*, 2006; 13: 994–1002
- [23] Clutton S.M., Townsend K.M., Walker C., Ansell J.D., Wright E.G.: Radiation-induced genomic instability and persisting oxidative stress in primary bone marrow cultures. *Carcinogenesis*, 1996; 17: 1633–1639
- [24] Demaria S., Ng B., Devitt M.L., Babb J.S., Kawashima N., Liebes L., Formenti S.C.: Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2004; 58: 862–870
- [25] Deshpande A., Goodwin E.H., Bailey S.M., Marrone B.L., Lehnert B.E.: Alpha-particle-induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts: evidence for an extranuclear target. *Radiat. Res.*, 1996; 145: 260–267
- [26] Elmore E., Lao X.Y., Kapadia R., Giedzinski, E., Lizoli C., Redpath J.L.: Low doses of very low-dose-rate low-LET radiation suppress radiation-induced neoplastic transformation *in vitro* and induce an adaptive response. *Radiat. Res.*, 2008; 169: 311–318
- [27] Followill D., Geis P., Boyer A.: Estimates of whole-body dose equivalent produced by beam intensity modulated conformal therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1997; 8: 667–672
- [28] Gamulin M., Kopjar N., Grgić M., Ramić S., Bisof V., Garaj-Vrhovac V.: Genome damage in oropharyngeal cancer patients treated by radiotherapy. *Croat. Med. J.*, 2008; 49: 515–527
- [29] Ghandhi S.A., Yaghoubian B., Amundson S.A.: Global gene expression analyses of bystander and alpha particle irradiated normal human lung fibroblasts: Synchronous and differential responses. *BMC Med. Genomics*, 2008; 1: 63
- [30] Gorgojo L., Little J.B.: Expression of lethal mutations in progeny of irradiated mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1989; 55: 619–630
- [31] Hall E.J.: Intensity-modulated radiation therapy, protons, and the risk of second cancers. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2006; 65: 1–7
- [32] Harada T., Kashino G., Suzuki K., Matsuda N., Kodama S., Watanabe M.: Different involvement of radical species in irradiated and bystander cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2008; 84: 809–814
- [33] Harper K., Lorimore S.A., Wright E.G.: Delayed appearance of radiation-induced mutations at the *Hprt* locus in murine hemopoietic cells. *Exp Hematol.*, 1997; 25: 263–269
- [34] Hendry J.H.: Genomic instability: potential contributions to tumour and normal tissue response, and second tumours, after radiotherapy. *Radiother. Oncol.*, 2001; 59: 117–126
- [35] Hickman A.W., Jaramillo R.J., Lechner J.F., Johnson N.F.: α -particle-induced p53 protein expression in rat lung epithelial cell strain. *Cancer Res.*, 1994; 54: 5797–5800
- [36] Hollowell J.G.Jr., Littlefield L.G.: Chromosome damage induced by plasma of X-rayed patients: an indirect effect of X-ray. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1968; 129: 240–244
- [37] Holmberg K., Meijer A.E., Auer G., Lambert B.O.: Delayed chromosomal instability in human T-lymphocyte clones exposed to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1995; 68: 245–255
- [38] Hu B., Wu L., Han W., Zhang L., Chen S., Xu A., Hei T.K., Yu Z.: The time and spatial effects of bystander response in mammalian cells induced by low dose radiation. *Carcinogenesis*, 2006; 27: 245–251
- [39] Hussain S.P., Hofseth L.J., Harris C.C.: Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 276–285
- [40] Ilnytskyy Y., Koturbash I., Kovalchuk O.: Radiation-induced bystander effects *in vivo* are epigenetically regulated in a tissue specific manner. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2009; 50: 105–113
- [41] Iwakawa M., Hamada N., Imadome K., Funayama T., Sakashita T., Kobayashi Y., Imai, T.: Expression profiles are different in carbon ion-irradiated normal human fibroblasts and their bystander cells. *Mutat. Res.*, 2008; 642: 57–67
- [42] Iyer R., Lehnert B.E.: Factors underlying the cell growth-related bystander responses to α particles. *Cancer Res.*, 2000; 60: 1290–1298
- [43] Iyer R., Lehnert B.E.: Low dose, low-LET ionizing radiation-induced radioadaptation and associated early responses in unirradiated cells. *Mutat. Res.*, 2002; 503: 1–9
- [44] Kadhim M.A., Lorimore S.A., Townsend K.M., Goodhead D.T., Buckle V.J., Wright E.G.: Radiation induced genomic instability: Delayed cytogenetic aberrations and apoptosis in primary human bone marrow cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1995; 67: 287–293
- [45] Kaminski J.M., Shinohara E., Summers J.B., Niermann K.J., Morimoto A., Brousal J.: The controversial abscopal effect. *Cancer Treat. Rev.*, 2005; 31: 159–172
- [46] Kashino G., Suzuki K., Matsuda N., Kodama S., Ono K., Watanabe M., Prise K.M.: Radiation induced bystander signals are independent of DNA damage and DNA repair capacity of the irradiated cells. *Mutat. Res.*, 2007; 619: 134–138
- [47] Khan M.A., Hill R.P., Van Dyk J.: Partial volume rat lung irradiation: an evaluation of early DNA damage. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1998; 40: 467–476
- [48] Kleinerman R.A., Boice J.D. Jr, Storm H.H., Sparen P., Andersen A., Pukkala E., Lynch C.F., Hankey B.F., Flannery J.T.: Second primary cancer after treatment for cervical cancer. An international cancer registries study. *Cancer*, 1995; 76: 442–452
- [49] Konopacka M., Rzeszowska-Wolny J.: The bystander effect-induced formation of micronucleated cells is inhibited by antioxidants, but the parallel induction of apoptosis and loss of viability are not affected. *Mutat. Res.*, 2006; 593: 32–38

- [50] Koturbash I., Boyko A., Rodriguez-Juarez R., McDonald R.J., Tryndyak P., Kovalchuk I., Pogribny I.P., Kovalchuk O.: Role of epigenetic effectors in maintenance of the long-term persistent bystander effect in spleen *in vivo*. *Carcinogenesis*, 2007; 28: 1831–1838
- [51] Koturbash I., Rugo R.E., Hendricks C.A., Loree J., Thibault B., Kutanzi K., Pogribny I., Yanch J.C., Engelward B.P., Kovalchuk O.: Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue *in vivo*. *Oncogene*, 2006; 25: 4267–4275
- [52] Koturbash I., Zemp F.J., Kutanzi K., Luzhna L., Loree, J., Kolb B., Kovalchuk O.: Sex-specific microRNAome deregulation in the shielded bystander spleen of cranially exposed mice. *Cell Cycle*, 2008; 7: 1658–1667
- [53] Koyama S., Kodama S., Suzuki K., Matsumoto T., Miyazaki T., Watanabe M.: Radiation-induced long-lived radicals which cause mutation and transformation. *Mutat. Res.*, 1998; 421: 45–54
- [54] Lala P.K., Chakraborty C.: Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol*, 2001; 2: 149–156
- [55] Little J.B.: Induction of genetic instability by ionizing radiation. *CR. Acad. Sci. III*, 1999; 322: 127–134
- [56] Little J.B., Gorgojo L., Vetrovs H.: Delayed appearance of lethal and specific gene mutations in irradiated mammalian cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1990; 19: 1425–1429
- [57] Little J.B.: Lauriston S.: Nontargeted effects of radiation: implications for low-dose exposures. *Health Phys.*, 2006; 91: 416–426
- [58] Little J.B., Nagasawa H., Pfenning T., Vetrovs H.: Radiation-induced genomic instability: delayed mutagenic and cytogenetic effects of X rays and alpha particles. *Radiat. Res.*, 1997; 148: 299–307
- [59] Lorimore S.A., Kadhim M.A., Pocock D.A., Papworth D., Stevens D.L., Goodhead D.T., Wright E.G.: Chromosomal instability in the descendans of unirradiated surviving cells after α -particle irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 5730–5733
- [60] Luce A., Courtin A., Levalois C., Altmeyer-Morel S., Romeo P.H., Chevillard S., Lebeau J.: Death receptor pathways mediate targeted and non-targeted effects of ionizing radiations in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 2009; 30: 432–439
- [61] Lyng F.M., Maguire P., McClean B., Seymour C., Mothersill C.: The involvement of calcium and MAP kinase signaling pathways in the production of radiation-induced bystander effects. *Radiat. Res.*, 2006; 165: 400–409
- [62] Lyng F.M., Seymour C.B., Mothersill C.: Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis. *Br. J. Cancer*, 2000; 83: 1223–1230
- [63] Mackonis E.C., Suchowska N., Zhang M., Ebert M., McKenzie D.R., Jackson M.: Cellular response to modulated radiation fields. *Phys. Med. Biol.*, 2007; 52: 5469–5482
- [64] Mairs R.J., Boyd M.: National symposium on low-dose radiation and bystander effects -12 October 2004, Cancer Research UK Beatson Laboratories, Glasgow. Sponsored by Glasgow University School for Cancer Studies, the Department of Health and the National Cancer Research Institute. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2005; 81: 259–262
- [65] Marder B.A., Morgan W.F.: Delayed chromosomal instability induced by DNA damage. *Mol. Cell Biol.*, 1993; 13: 6667–6677
- [66] Marnett L.J.: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 361–370
- [67] Marples B., Skov K.A.: Small doses of high-linear energy transfer radiation increase the radioresistance of Chinese hamster V79 cells to subsequent X-irradiation. *Radiat. Res.*, 1996; 146: 382–387
- [68] Massagué J., Chen Y.G.: Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev.*, 2000; 14: 627–644
- [69] Matsumoto H., Hamada N., Takahashi A., Kobayashi Y., Ohnishi T.: Vanguard of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses. *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, 2007; 48: 97–106
- [70] Matsumoto H., Hayashi S., Hatashita M., Ohnishi K., Shioura H., Ohtsubo T., Kitai R., Ohnishi T., Kano E.: Induction of radioresistance by a nitric oxide-mediated bystander effect. *Radiat. Res.*, 2001; 155: 387–396
- [71] Mendonca M.S., Kurohara W., Antoniono R., Redpath J.L.: Plating efficiency as a function of time postirradiation: evidence for the delayed expression of lethal mutations. *Radiat. Res.*, 1989; 119: 387–393
- [72] Mothersill C., Seymour C.B.: Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997; 71: 421–427
- [73] Mothersill C., Seymour C.B.: Cell-cell contact during gamma-irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of signal controlling survival into the medium. *Radiat. Res.*, 1998; 149: 256–262
- [74] Mothersill C., Seymour C.: Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Radiat. Res.*, 2001; 155: 759–767
- [75] Mothersill C., Seymour C.: Characterisation of a bystander effect induced in human tissue explant cultures by low LET radiation. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 2002; 99: 163–167
- [76] Nagasawa H., Huo L., Little J.B. Increased bystander mutagenic effect in DNA double-strand break repair-deficient mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2003; 79: 35–41
- [77] Nagasawa M., Little J.B.: Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res.*, 1992; 52: 6394–6396
- [78] Narayanan P.K., LaRue K.E., Goodwin E.H., Lehnert B.E.: Alpha particles induce the production of interleukin-8 by human cells. *Radiat. Res.*, 1999; 152: 57–63
- [79] Nikjoo H., Khvostunov I.K.: Biophysical model of the radiation-induced bystander effect. *Int. J. Radiat. Biol.* 2003; 79: 43–52
- [80] Nikjoo H., Khvostunov I.K.: Modelling of radiation-induced bystander effect at low dose and low LET. *Int. J. Low Radiation*, 2006; 3: 143–158
- [81] Parsons W.B., Watkins C.H., Pease G.L., Childs D.S.Jr.: Changes in sternal marrow following roentgen-ray therapy to the spleen in chronic granulocytic leukemia. *Cancer*, 1954; 7: 179–189
- [82] Pogribny I., Koturbash I., Tryndyak V., Hudson D., Stevenson S.M., Sedelnikova O., Bonner W., Kovalchuk O.: Fractionated low-dose radiation exposure leads to accumulation of DNA damage and profound alterations in DNA and histone methylation in the murine thymus. *Mol. Cancer Res.*, 2005; 3: 553–561
- [83] Pogribny I., Raiche J., Slovack M., Kovalchuk O.: Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 320: 1253–1261
- [84] Poon R.C., Agnihotri N., Seymour C., Mothersill C.: Bystander effects of ionizing radiation can be modulated by signaling amines. *Environ. Res.*, 2007; 105: 200–211
- [85] Prise K.M., Belyakov O.V., Folkard M., Michael B.D.: Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1998; 74: 793–798
- [86] Prise K.M., Folkard M., Michael B.D.: Radiation-induced bystander and adaptive responses in cell and tissue models. *Dose-Response*, 2006; 4: 263–276
- [87] Przybyszewski W.M., Widel M., Szurko A., Lubecka B., Matulewicz L., Maniakowski Z., Polaniak R., Birkner E., Rzeszowska-Wolny J.: Multiple bystander effect of irradiated megacolonies of melanoma cells on non-irradiated neighbours. *Cancer Lett.*, 2004; 214: 91–102
- [88] Rzeszowska-Wolny J., Herok R., Widel M., Hancock R.: X-irradiation and bystander effects induce similar changes of transcript profiles in most functional pathways in human melanoma cells. *DNA Repair*, 2009; 8: 732–738
- [89] Sawant S.G., Randers-Pehrson G., Metting N.F., Hall E.J.: Adaptive response and the bystander effect induced by radiation in C3H 10T(1/2) cells in culture. *Radiat. Res.*, 2001; 156: 177–180
- [90] Sedelnikova O.A., Nakamura A., Kovalchuk O., Koturbash I., Mitchell S.A., Marino S.A., Brenner D.J., Bonner W.M.: DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer Res.*, 2007; 67: 4295–4302
- [91] Shao C., Folkard M., Prise K.M.: Role of TGF- β 1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells. *Oncogene*, 2008; 27: 434–440
- [92] Shao C., Lyng F.M., Folkard M., Prise K.M.: Calcium fluxes modulate the radiation-induced bystander responses in targeted glioma and fibroblast cells. *Radiat. Res.*, 2006; 166: 479–487
- [93] Shao C., Prise K.M., Folkard M.: Signaling factors for irradiated glioma cells induced bystander responses in fibroblasts. *Mutat. Res.*, 2008; 638: 139–145
- [94] Sokolov M.V., Dickey J.S., Bonner W.M., Sedelnikova O.A.: γ -H2AX in bystander cells: not just a radiation-triggered event, a cellular response to stress mediated by intercellular communication. *Cell Cycle*, 2007; 6: 2210–2212
- [95] Snyder A.R., Morgan W.F.: Gene expression profiling after irradiation: clues to understanding acute and persistent responses? *Cancer Metastasis Rev.*, 2004; 23: 259–268

- [96] Spitz D.R., Azzam E.I., Li J.J., Gius D.: Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev.*, 2004; 23: 311–322
- [97] Suit H., Goldberg S., Niemierko A., Ancukiewicz M., Hall E., Goitein M., Wong W., Paganetti H.: Secondary carcinogenesis in patients treated with radiation: a review of data on radiation-induced cancers in human, non-human primate, canine and rodent subjects. *Radiat. Res.*, 2007; 167: 12–42
- [98] Tartier L., Gilchrist L., Burdak-Rothkamm S., Folkard M., Prise K.M.: Cytoplasmic irradiation induces mitochondrial-dependent 53BP1 protein relocalization in irradiated and bystander cells. *Cancer Res.*, 2007; 67: 5872–5879
- [99] Tawn E.J., Whitehouse C.A., Winther J.F., Curwen G.B., Rees G.S., Stovall M., Olsen J.H., Guldborg P., Rechnitzer C., Schröder H., Boice J.D. Jr: Chromosome analysis in childhood cancer survivors and their offspring – no evidence for radiotherapy-induced persistent genomic instability. *Mutat. Res.*, 2005; 583: 198–206
- [100] Tlsty T.D.: Functions of p53 suppress critical consequences of damage and repair in the initiation of cancer. *Cancer Cell*, 2002; 2: 2–4
- [101] Trott K.R.: Can we reduce the incidence of second primary malignancies occurring after radiotherapy? *Radiother. Oncol.*, 2009; 91: 1–3
- [102] Tubiana M.: Can we reduce the incidence of second primary malignancies occurring after radiotherapy? A critical review. *Radiother. Oncol.*, 2009; 91: 4–15
- [103] Ullrich R.L., Ponnaiya B.: Radiation-induced instability and its relation to radiation carcinogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1998; 74: 747–754
- [104] Vines A.M., Lyng F.M., McClean B., Seymour C., Mothersill C.: Bystander effect induced changes in apoptosis related proteins and terminal differentiation in *in vitro* murine bladder cultures. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2009; 85: 48–56
- [105] Weissenborn U., Streffer C.: Analysis of structural and numerical chromosomal aberrations at the first and second mitosis after irradiation of one-cell mouse embryos with X-rays and neutrons. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1989; 117: 214–220
- [106] Whitehouse C.A., Tawn E.J.: No evidence for chromosomal instability in radiation workers with *in vivo* exposure to plutonium. *Radiat. Res.*, 2001; 156: 467–475
- [107] Widel M., Szurko A., Przybyszewski W., Lanuszewska J.: Non-irradiated bystander fibroblasts attenuate damage to irradiated cancer cells. *Radioprotection*, 2008; 43(Suppl.): 194
- [108] Wolff S.: Aspects of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents. *Mutat. Res.*, 1996; 358: 135–142
- [109] Xu W., Liu L.Z., Loizidou M., Ahmed M., Charles I.G.: The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res.*, 2002; 121: 311–320
- [110] Xu X.G., Bednarz B., Paganetti H.: A review of dosimetry studies on external-beam radiation treatment with respect to second cancer induction. *Phys Med Biol.*, 2008; 53: R193–R241
- [111] Xue L.Y., Butler N.J., Makrigiorgos G.M., Adelstein S.J., Kassis A.I.: Bystander effect produced by radiolabelled tumour cells *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 13765–13770
- [112] Zhong W., He Q., Chan L.L., Zhou F., El Naghy M., Thompson E.B., Ansari N.H.: Involvement of caspases in 4-hydroxy-alkenal-induced apoptosis in human leukemic cells. *Free. Rad. Biol. Med.*, 2001; 30: 699–706
- [113] Zhou H., Randers-Pherson G., Waldren C.A., Vannais D., Hall E.J., Hei T.K.: Induction of a bystander mutagenic effect of alpha-particles in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 2099–2104

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.