

# Radyoterapiye bağlı “bystander” etki: Oluşum mekanizmaları ve potansiyel klinik yansımalar

Radiation induced bystander effect: mechanisms and potential clinical reflections

Erkan TOPKAN, Melek Nur YAVUZ, Ali Aydın YAVUZ

Başkent Üniversitesi Adana Tedavi ve Uygulama Merkezi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı

Günümüzde, genel radyobiyojoloji anlayışına bir yenilik olarak, radyasyona maruz kalmamış komşu veya uzak hücre gruplarında da radyasyona maruz kalmış olanlara benzer biyolojik etkilerin görüldüğüne dair giderek artan miktarda kanıt oluşmaya başlamıştır. *Bystander* etki olarak adlandırılan bu etkiler deneysel olarak geniş bir hücre grubunda çekirdek ve sitoplazma radyasyon maruziyeti sonrasında görülebilmektedir. *Bystander* etki sonucunda sağlam hücre gruplarında da bazı önemli genetik değişiklikler söz konusu olduğundan bu etkilerin karsinogenez açısından önemi de cevap bekleyen sorulardandır. *Bystander* etki oluşum mekanizmaları tam olarak bilinmese de hücre zarında bulunan *gap junction*'lar ve lipid boşlukların yanı sıra radyasyona maruz kalmış hücreler tarafından salınan parakrin ve endokrin faktörlerin rolü üzerinde durulmaktadır. Bu yazıda radyobiyojinin yeni bir alanı olan bystander etkinin temel oluşum mekanizmalarından potansiyel klinik uygulamalarına kadar olan yeni literatür bilgilerinin özetlenmesi amaçlandı.

**Anahtar sözcükler:** *Bystander* etki/radyasyon etkisi; hücreler arası iletişim/radyasyon etkisi; lineer enerji transferi.

A long held dogma in radiation biology has been that the effects of ionizing radiation arise only in the directly irradiated cells, and it was presumed that no effect would be expected in cells whose nuclei are spared from ionizing radiation. However, in the past twenty years, it has been suggested that irradiated cells are capable of production and secretion of signals to the neighboring unirradiated cells resulting in damage to these cells. This new challenging phenomenon is termed “the bystander effect”. Bystander effect can be reported in both cytoplasmic and nuclear irradiation in various cell types. Although the exact mechanisms of bystander effect production is not clearly defined yet, intercellular communication via gap junctions and lipid rafts, and secreted paracrine and endocrine soluble factors are potential suggested mechanisms. By this review article it has been aimed to summarize these mechanisms and the clinical reflections of bystander effect.

**Key words:** Bystander effect/radiation effects; cell communication/radiation effects; linear energy transfer.

Radyoterapiye bağlı biyolojik etkilerin görülebilmesi için ilgili hücre grubuna ait DNA sarmallarının doğrudan radyasyona maruz kalmış olma zorunluluğu kanısı yakın zamana kadar hakim olagelmıştır. Ancak, özellikle son iki dekatta yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar DNA'sı doğrudan radyasyona maruz kalmayan komşu hücrelerde de radyasyon almış hücrelerdekine benzer DNA hasarlarının görüldüğü saptanmıştır.

Buna “hedef dışı etkiler” denilmiş olup, *bystander* etki (BSE) de, genomik düzensizlik, adaptas-

yon cevabı, düşük doz radyasyon hipersensitivitesi, ters doz hızı etkisi ve gen ekspresyonu gibi bu gruba dahil edilmektedir.

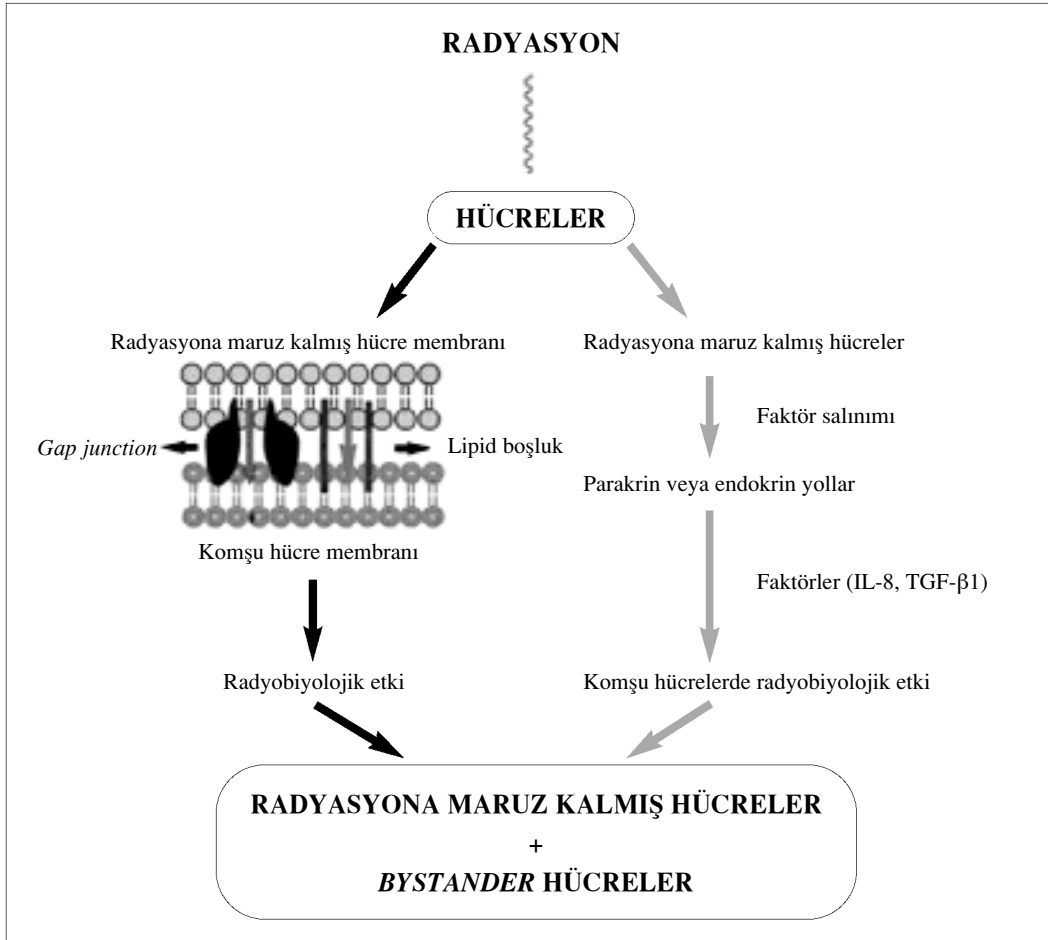
Radyasyona doğrudan maruz kalmayan ancak sadece maruz kalanlarla komşu olan hücrelerde meydana gelen radyasyon almış hücrelerdekine benzer biyolojik etkilere “*bystander* etki” denilmektedir. Nagasawa ve Spark 1992 yılında yayınlanan makalelerinde alfa partikülü ile radyasyon uyguladıkları hücre kültürü çalışmasında sadece %1 hücreye ait çekirdeğin radyasyon almış olma-

sına rağmen kardeş kromozom anomalisi oluşumunun orantısız bir şekilde %30 hücrede görülmüş olduğunu rapor etmiştir.<sup>[1]</sup> BSE birçok hücre grubunda radyasyon türünden bağımsız olarak rapor edilmektedir.<sup>[2]</sup> BSE yüksek lineer enerji transferi (LET) yapan alfa partikülleri<sup>[1,3,4]</sup> ve düşük LET yapan  $\gamma$ -radyasyon tipinde<sup>[5-7]</sup> görülebilmektedir. Ancak her iki radyasyon tipinde rol oynayan sinyal tipi hakkında net bir bilgi mevcut değildir. Günümüzde genel kabul gören iki temel mekanizma söz konusudur: 1) hücreler arası doğrudan iletişim<sup>[8]</sup> ve 2) radyasyona maruz kalmış hücrelerden salınan faktörler aracılığı ile olan iletişimidir.<sup>[9]</sup>

Bu yazıda özellikle bu iki mekanizma ile ilgili bilgiler detaylandırılacak ve potansiyel klinik yansımaları tartışıldı.

## Hücreler Arası İletişim ve *Bystander* Etki

Radyasyona bağılı BSE oluşumu için öne sürülmüş ve literatürle desteklenmiş önemli bir mekanizma: "gap junctionlar aracılığıyla hücreler arası iletişim"dir (GJAHİ) (Şekil 1). *Gap junction*lar hücreler arasında kontakt ve iletişim sağlayan küçük tübüllerden oluşan haberleşme kanallarıdır. Bu kanallar <1 kDa ağırlığında küçük moleküllerin bitişik hücrelere arasında geçişini sağlayabilecek kadar özelleşmiştir.<sup>[10]</sup> Literatür kanıtları BSE indüklemesi sonucu oluşan mikronükleus oluşumu,<sup>[11]</sup> mutasyonlar,<sup>[12,13]</sup> kromatid kırılması,<sup>[13]</sup> p53 ve p21<sup>Waf1</sup> ekspresyonu,<sup>[8]</sup>  $\gamma$ -H2AX fokus oluşumu,<sup>[14,15]</sup> ve hücre ölümünde artış<sup>[16]</sup> bakımından GJAHİ'nin önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Azam ve ark.<sup>[8]</sup> tarafından yapılan bir ça-



Şekil 1. Radyoterapiye bağılı bystander etkide rol oynayan temel mekanizmalar.

(Kısaltmalar: IL-8: İnterlökin-8; TGF-β1: Tumor Growth Factor-β1)

Işıma ile GJAHİ'nin BSE oluşumundaki rolü kesin olarak ortaya konulmuştur. Bu çalışmada düşük doz alfa partikülüne maruz kalan fibroblastlar ve komşu diğer fibroblastlarda p53 ve p21 oluşum hızının gözlemlenmiştir. Bir *gap junction* blokörü olan *lindane* uygulamasını takiben komşu hücrelerde bu ki molekülün oluşum hızının düştüğü bildirilmiştir. Bu bulgular membran aracılığıyla hücreler arası iletişimin BSE oluşumunda önemli bir yere sahip olduğunu açıklayıcı niteliktedir. Eldeki kanıtlara dayanılarak radyasyona maruz kalmış ve komşu hücreler arasında kanallar aracılığıyla iletişimin sağlanmasında rol oynayan faktörlerin ne olduğu konusunda kesin bir kanıya varmak mümkün olmasa da uzun yaşam süreli organik radikallerin hücrel mutasyon ve transformasyon oluşumunda önemli role sahip oldukları düşünülmektedir.<sup>[17,18]</sup>

Bir diğer hücreler arası kontakt iletişim mekanizması da lipid boşluklar aracılığıyla olan yoldur. Hücre zarında bulunan ve kolesterol ve sfingolipidlerden zengin olan bu lipid boşluklar yüzeyel hücre reseptörlerinden sinyal transdüksiyonunu da içine alan bir dizi hücrel olayların oluşumuyla ilişkilendirilmiştir.<sup>[19]</sup> Giderek artan bir şekilde lipid boşlukların BSE bağımlı mutasyonlar ve kardeş kromozom değişimleri,<sup>[20]</sup> mikronükleus oluşumu ile nitrik oksit (NO) oluşumu<sup>[21]</sup> ve  $\gamma$ -H2AX fokus oluşumunda<sup>[15]</sup> rolü olduğuna dair bilgiler artmaktadır. Ayrıca BSE oluşumunda rol oynadığı bilinen NAD(P)H oksidaz ve konneksin proteinlerinin de bu boşluklarda yerleşmiş olması da bu bilgiyi destekler niteliktedir. Nagasawa ve ark.<sup>[20]</sup> yaptığı bir çalışmada hücrelerin lipid boşluk yıkımına sebebiyet veren filipin inkübasyonuna tabi tutulması sonucu BSE ile indüklenmiş mutasyonlar ve kardeş kromozom değişikliklerinin önlenebileceğini göstermiştir.

### **Radyasyona Maruz Kalmış Hücrelerden Salınan Faktörler Aracılığıyla Oluşan BSE**

Radyasyona bağlı BSE, radyasyona maruz kalan hücrelerden salınan faktörlerin komşu hücrelere GJAHİ ile etki etmesi ile görülebileceği gibi hücreler arası mesafeye salınan ve kısa mesafedeki komşu hücrelere etki eden (parakrin) veya kan yoluyla çevre veya uzak hücrelere etki eden (en-

dokrin) mekanizmalara da bağlı olabilmektedir (Şekil 1).<sup>[22]</sup> Kan yoluyla taşınan bu faktörler “klas-tojenik faktörler” olarak anılır ve radyasyona maruz kalmamış hücre gruplarında kromozom hasarına sebebiyet verebilirler.<sup>[23]</sup> Parakrin etkinin varlığı *in vitro* çalışmalarda radyasyon uygulanmış hücrelerin bulunduğu besi yerinin radyasyon uygulanmamış hücre ortamına taşınması ile bu hücrelerde BSE ile indüklenmiş kromozomal hasarlarının oluşması ile gösterilmiştir.<sup>[1,5,6]</sup> Bu mekanizmada savunulan hipotez, her ne kadar izole edilmiş kesin bir faktör olmasa da, radyasyon uygulanmış hücrelerin besi yerine birtakım faktörler salgıladığı ve bunların da bazı sinyal ileti yollarını aktifleyerek radyasyon uygulanmamış hücrelerde hücre ölümüne varabilen değişiklikler zincirini tetikleyebileceği yönündedir.<sup>[6]</sup> Bu mekanizmada rolü olduğu düşünülen en önemli faktörler, alfa partikül radyasyonu uygulamalarına bağlı BSE oluşumunda öne sürülmüş olan interlökin-8<sup>[3,24]</sup> ile Barcellos-Hoff ve Brooks<sup>[25]</sup> tarafından gösterilmiş olan ve bir ekstrasellüler hasar sensörü olan TGF- $\beta$ 1'dir. Ayrıca, bir diğer olası medyatör de oksidatif stres durumlarında mitokondrilerde sentezi uyarılan “apoptoz indükleyici faktör”dür (AIF).<sup>[26]</sup> AIF'nin hücre içi bir faktör olmasına rağmen Kroemer<sup>[26]</sup> bu faktörün başka sitotoksik faktörlerin sentezlenmesini aktifleyip hücreler arası mesafeye salınmalarını indükleyebildiğini bildirmiştir.

BSE'nin endokrin olarak aktiflenmesi kısmi organ ışınlamaları yapılan *in vivo* çalışmalarda gözlemlenmiştir.<sup>[27]</sup> Sıçanlarda yapılan bir çalışmada akciğer bazalinin radyasyona maruz bırakılmasını takiben yapılan incelemelerde, mikronükleus oluşumunun radyasyon uygulanmamış apeks kısmında belirgin biçimde artmış olduğu gösterilmiştir. Ancak apikal akciğer radyasyon uygulaması sonrasında radyasyon uygulanmamış bazal kısımda mikronükleus oluşumunun herhangi bir artış göstermediği bildirilmiştir. Bu sonuç, radyasyon uygulanan akciğer kısmından uygulanmayan kısma doğru bir faktör geçişi olduğu ve bu geçiş yönünün de bazalden apekse doğru olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Benzer şekilde sol akciğeri radyasyona maruz bırakılan ratlarda radyasyon uygulanmayan sağ akciğerde de anlamlı miktarda mikronükleus oluşumu gözlemlendiği bildirilmiştir.<sup>[27]</sup>

## Hücre Çekirdeği ve Sitoplazmasının BSE Oluşumundaki Olası Roller

Radyasyon hasarının tamamen hücre DNA'sı yani hücre çekirdeği hasarına bağılı olduğuna dair temel radyobiyojik yaklaşım yakın zamana kadar kabul görmekteydi. Ancak, izole çekirdek ışınlamaları sonucu gerek ışınlanan gerekse *bystander* hücrelerde nükleer kodlu gen hasarları gözlemlenmezken,<sup>[28]</sup> izole sitoplazmik ışınlama yapılan hücreler ve *bystander* hücrelerde bu durumun aksine belirgin mikronükleus oluşumu saptanmıştır.<sup>[12,29]</sup> Bu çalışmalarda ilave olarak nitrik oksit'in hücre gruplarında izole sitoplazma radyasyon uygulaması ile *bystander* mutagenesi,<sup>[12,29]</sup> hücre çekirdeği ve sitoplazmasına eşzamanlı radyasyon uygulaması ile de mikronükleus oluşumunu aktiflediği<sup>[21]</sup> bildirilmektedir. Buna karşın radyasyon hasarlarının oluşumunda önemli bir yere sahip olan reaktif oksijen radikallerinin izole sitoplazma radyasyon uygulaması sonucu mutagenesi indüklediği<sup>[28]</sup> buna karşın izole çekirdek radyasyon uygulaması ile BSE'ye bağılı mutagenesi aktiflemediği<sup>[29]</sup> rapor edilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalarla normal hücreler ve p53 inaktive tümör hücreleri arasındaki iletişim araştırılmış ve radyasyon uygulanan normal hücrelerden tümör *bystander* hücrelere olan bilgi akımının reaktif oksijen radikalleri aracılığıyla olduğu, buna karşın ışınlanan tümör hücrelerinden normal *bystander* hücrelere olan bilgi akımının nitrik oksit aracılığıyla olduğu gibi önemli bilgiler elde edilmiştir.<sup>[21]</sup> Bu yeni bilgilerimiz tedavi amaçlı tümör ışınlamaları sonrası meydana gelebilecek BSE'nin mekanizma olarak açıklanması bakımından önemlidir.

## *Bystander* Etkinin Klinik Uygulamalar Açısından Önemi

BSE, radyasyon onkolojisinde klinik uygulamalar açısından terapötik ve karsinogenez ve normal doku hasarı oluşumu risk değerlendirmesi yönleriyle önem taşımaktadır. BSE ile ilgili bilgilerimizin de hesaba katılmasıyla "tedavi alanı" ve "biyolojik penumbra" gibi kavramlar ile radyobiyojik açıdan radyasyonun doğrudan ışınlamaya bağılı hücresel etkileri ve BSE'nin doz-cevap ilişkisine olan etkilerinin yeniden gözden geçirilme-

sine ihtiyaç duyulacağı anlaşılmaktadır. Ayrıca radyasyon fiziği ve radyobiyojik açısından da tedavi dozu hesaplamaları yapılırken BSE'nin normal ve tumor hücrelerine olan rölatif katkılarının hesaba katılabildiği yeni algoritmalara ihtiyaç duyulacaktır.

Radyasyon onkolojisinin şu ana kadar açıklamadığı olaylardan biri de "apiskopal etki" olarak adlandırılan ve herhangi bir organda radyasyona maruz kalınmamasına rağmen maruz kalmış dokulardakine benzer değişikliklerin görülmesi durumudur. BSE ile bazı apiskopal etkilerin açıklanabilmesi mümkün olabilir gibi durmaktadır. Nobler 1969 yılında lenfoma nedeniyle abdominal radyoterapi uygulanan bir hastanın daha önce var olan bilateral pleural efüzyonunun kaybolduğunu bildirmiştir.<sup>[30]</sup> Sıçanlarda yapılan bir çalışmada fertilizasyon öncesi dönemde sol overlere radyoterapi uygulanırken sağ overler korunmuş ancak fertilizasyon döneminde iki over arasında fark olmadığı görülmüştür.<sup>[31]</sup> Bu örnekler lokal stresin vücutta global etkiler yaratabileceğini ve bazı BSE mekanizmaları ile (örn.; faktör salınımı) bu etkilerin açıklanmasının mümkün olabileceğini düşündürmektedir.

Eldeki kanıtlar radyasyon hedef alanının uzandığındaki neoplastik dokularda da anti-tümör etki görülebildiği bildirilmiştir.<sup>[32]</sup> Bu bulgu, radyoterapi uygulamaları sonucu BSE ile hedeflenenden çok daha fazla tümör yükünün tedavi edilmesi olasılığını ortaya çıkarmaktadır. Bu durum özellikle radyonüklid tedaviler, steryotaktik radyoterapi ve brakiterapi gibi hedefleyici özelliği belirgin tedaviler açısından özel öneme sahip olacak izlenimi vermektedir. Ayrıca GJAHİ'nin önemli bir BSE oluşum mekanizması olduğu göz önünde bulundurulursa GJAHİ aktifleyici ajanlar (örn; retinoidler) gibi yeni sistemik tedavilerin kullanılmasıyla tümör hücreleri arasındaki BSE'nin artırılması mümkün olabilecek ve böylece tedaviye cevapta anlamlı artışlar sağlanabilecektir. Bir diğer önemli nokta da tümör hücreleri ve sağlıklı hücreler arasında GJAHİ bulunmuyor olması bu noktanın hedeflenmesi ile selektif tümör tedavileri mümkün olabilecek olmasıdır. Ancak, GJAHİ'nin yanısıra parakrin ve endokrin mekanizmaların da

BSE oluşumunda önemli roller üstlenmeleri nedeniyle, radyasyon uygulanan hücelere komşu ve uzak hücre gruplarında oluşabilecek erken ve geç radyasyon hasarlarının hesaba katılması zorunlu hale gelmektedir. Bu durum, radyobiyojik ve radyasyon fiziği hesaplamalarının daha fazla faktörü içereceği dolayısıyla daha komplike bir hal alacağı sonucunu getirmektedir.

Klinik olarak BSE'nin anti-tümöral etkinliği artırma olasılığının var olduğu ve bunun da *gap junction*lar aracılığıyla olabilme ihtimali üzerinde durulmaktadır. Tümör hücrelerinin *gap junction*lardan yoksun olması bu mekanizmanın tedavide kullanılabilmesinin önünde önemli bir engeldir. Ancak son zamanlarda bu durumun üstesinden gelinebileceği yönünde kanıtlar oluşmaya başlamıştır. Örneğin, bazı tümör hücrelerinde *gap junction* oluşumunda önemli bir rolü olan konneksin-43 ekspresyonunun altransretinoik asit uygulaması ile arttığı ve bu durumun da gansiklovir ile indüklenen BSE bağımlı hücre ölümünü gerek *in vitro* gerekse *in vivo* ortamda arttırdığı gösterilmiştir.<sup>[33]</sup> Diğer bir çalışmada, insan koryokarsinoma hücre kültüründe 8-bromo-c-AMP uygulanmasını takiben konneksin-40 mRNA ekspresyonunun arttığını ve bununla ilişkili olarak *gap junction*lar aracılığıyla oluşan gansiklovir ile indüklenmiş BSE bağımlı hücre ölümünün arttığı gösterilmiştir.<sup>[34]</sup> Robe ve ark.<sup>[35]</sup> benzer bulguları insan glioblastoma hücre kültüründe göstermiştir.

*Gap junction* oluşumu ve buna bağlı olarak BSE bağımlı hücre ölümü konneksin kodlayan genlerin *gap junction*lardan yoksun tümör hücrelerine aktarılması ile aktiflenebilmektedir. HeLa hücreleri normalde *gap junction*lardan yoksun hücrelerdir, ancak konneksin-43 gen transfeksiyonu sonrası timidin kinaz negatif (TK-) ve TK+ hücrelerin hücrel kontak halinde birlikte kültürlenmesi sonucunda TK- hücrelerde BSE bağımlı ölümün görüldüğü bildirilmiştir.<sup>[36]</sup> Aynı hücrelerin hücrel kontak olmaksızın aynı ortamda birbirinden ayrı kültürlenmesi durumunda hücre ölümü görülmediği belirtilmiştir. Bu bulgu *gap junction*ların BSE oluşumundaki önemini destekler nitelikte olması bakımından değerlidir. Aynı çalışmada gansiklovir uygulanan glioma hücrelerinde or-

ta derecede tümör baskılanması gözlenirken, konneksin transfeksiyonu uygulanmasını takiben gansiklovir uygulamasının anlamlı derecede tümör baskılanmasına yol açtığı da bildirilmiştir. Yakın zamanda Chen ve ark.<sup>[37]</sup> tarafından yayınlanan bir makalede, sitozin deaminaz/5-fluorositozin uygulamasının glioblastoma hücrelerinde BSE bağımlı hücre ölümü ve radyosensitizasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak hipoksik hücre gruplarında BSE bağımlı hücre ölümü ve radyosensitizasyonun arttığı bildirilmiştir. Her ne kadar bu çalışmalar doğrudan RT çalışmaları olmasa da, sonuçlara bakarak *gap junction* oluşumunun indüklenmesi ile birçok tümör grubunda BSE bağımlı hücre ölümünün artırılabilirliği anlaşılmaktadır. Bu durumun, özellikle anoksinin gerek RT gerekse kemoterapi direnci açısından önemli bir sorun olduğu glioblastoma multiform gibi tümörlerin tedavisinde önemli bir basamak olacağı kanısı oluşmaktadır. Radyoterapiye dirençli tümör gruplarında *gap junction*ların gen transfeksiyonu veya ilaç uygulamaları ile oluşturulması sonucu BSE bağımlı hücre ölümünün artırılabilirliği ve dolayısıyla da RT direncinin yakın bir gelecekte aşılmasının mümkün olabileceği izlenimi vardır. Ancak bu öngörülerin netlik kazanabilmesi için iyi dizayn edilmiş çalışmalara ihtiyaç vardır.

## Sonuçlar

Özet olarak, oluşan yeni kanıtlar yüzyılı aşan bir süreden beridir kanser ve bazı benign hastalıkların tedavisinde etkin olarak kullanılmakta olan radyoterapinin sadece maruz kalan hücrelerde değil yakın komşuluk içerisinde bulunan ve hatta nispeten uzak yerleşimli hücrelerde bile birtakım biyolojik etkiler oluşturabildiğini göstermiştir. Bu durum ileride gerek yan etkilerin gerekse tedavi etkinliğinin ve potansiyel genetik etkilerin hesaplanmasını gerektiren radyoterapi planlamalarının gündeme gelmesi ve tedavi seçeneklerinde önemli değişikliklerin yapılmasını gerektireceği izlenimini vermektedir. Ayrıca BSE oluşum mekanizmalarının ilaçlar veya genetik kod transfeksiyonu sonucunda aktiflenmesi ile RT ve kemoterapiye dirençli birçok tümör grubunda BSE bağımlı hücre ölümünün indüklenmesi dolayısıyla tedavi başarısının artırılması mümkün olabilecektir.

## KAYNAKLAR

1. Nagasawa H, Little JB. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res* 1992;52(22):6394-6.
2. Snyder AR. Review of radiation-induced bystander effects. *Hum Exp Toxicol* 2004;23(2):87-9.
3. Deshpande A, Goodwin EH, Bailey SM, Marrone BL, Lehnert BE. Alpha-particle-induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts: evidence for an extranuclear target. *Radiat Res* 1996;145(3):260-7.
4. Lorimore SA, Kadhim MA, Pocock DA, Papworth D, Stevens DL, Goodhead DT, et al. Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after alpha-particle irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(10):5730-3.
5. Mothersill C, Seymour C. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol* 1997;71(4):421-7.
6. Mothersill C, Seymour CB. Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium. *Radiat Res* 1998;149(3):256-62.
7. Seymour CB, Mothersill C. Delayed expression of lethal mutations and genomic instability in the progeny of human epithelial cells that survived in a bystander-killing environment. *Radiat Oncol Investig* 1997;5(3):106-10.
8. Azzam EI, de Toledo SM, Gooding T, Little JB. Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat Res* 1998;150(5):497-504.
9. Mothersill C, Seymour C. Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Radiat Res* 2001 Jun;155(6):759-67.
10. Hamada N, Matsumoto H, Hara T, Kobayashi Y. Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects. *J Radiat Res (Tokyo)* 2007;48(2):87-95.
11. Shao C, Furusawa Y, Kobayashi Y, Funayama T, Wada S. Bystander effect induced by counted high-LET particles in confluent human fibroblasts: a mechanistic study. *FASEB J* 2003;17(11):1422-7.
12. Zhou H, Suzuki M, Gillispie J, Randers-Pehrson G, Hei TK. Cytoplasmic irradiation induced bystander mutagenesis. *Radiat Res* 2006;166:689.
13. Zhou H, Suzuki M, Randers-Pehrson G, Vannais D, Chen G, Trosko JE, et al. Radiation risk to low fluences of alpha particles may be greater than we thought. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(25):14410-5.
14. Hu B, Wu L, Han W, Zhang L, Chen S, Xu A, et al. The time and spatial effects of bystander response in mammalian cells induced by low dose radiation. *Carcinogenesis* 2006;27(2):245-51.
15. Burdak-Rothkamm S, Short SC, Folkard M, Rothkamm K, Prise KM. ATR-dependent radiation-induced gamma H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells. *Oncogene* 2007;26(7):993-1002.
16. Bishayee A, Hill HZ, Stein D, Rao DV, Howell RW. 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(2):335-44.
17. 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(1):45-54.
18. Kumagai J, Masui K, Itagaki Y, Shiotani M, Kodama S, Watanabe M, et al. Long-lived mutagenic radicals induced in mammalian cells by ionizing radiation are mainly localized to proteins. *Radiat Res* 2003;160(1):95-102.
19. Munro S. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 2003;115(4):377-88.
20. Nagasawa H, Cremesti A, Kolesnick R, Fuks Z, Little JB. Involvement of membrane signaling in the bystander effect in irradiated cells. *Cancer Res* 2002;62(9):2531-4.
21. Shao C, Folkard M, Michael BD, Prise KM. Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(37):13495-500.
22. Hollowell JG Jr, Littlefield LG. Chromosome damage induced by plasma of x-rayed patients: an indirect effect of x-ray. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968;129(1):240-4.
23. Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1994;16(1):99-109.
24. Narayanan PK, LaRue KE, Goodwin EH, Lehnert BE. Alpha particles induce the production of interleukin-8 by human cells. *Radiat Res* 1999;152(1):57-63.
25. Barcellos-Hoff MH, Brooks AL. Extracellular signaling through the microenvironment: a hypothesis relating carcinogenesis, bystander effects, and genomic instability. *Radiat Res* 2001;156(5 Pt 2):618-27.
26. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in

- regulating apoptosis. *Nat Med* 1997;3(6):614-20.
27. Khan MA, Hill RP, Van Dyk J. Partial volume rat lung irradiation: an evaluation of early DNA damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;40(2):467-76.
  28. Wu LJ, Randers-Pehrson G, Xu A, Waldren CA, Geard CR, Yu Z, et al. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(9):4959-64.
  29. Zhou H, Randers-Pehrson G, Waldren CA, Vannais D, Hall EJ, Hei TK. Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(5):2099-104.
  30. Nobler MP. The abscopal effect in malignant lymphoma and its relationship to lymphocyte circulation. *Radiology* 1969;93(2):410-2.
  31. Hahn EW, Feingold SM. Abscopal delay of embryonic development after prefertilization x-irradiation. *Radiat Res* 1973;53(2):267-72.
  32. Kaminski JM, Shinohara E, Summers JB, Niermann KJ, Morimoto A, Brousal J. The controversial abscopal effect. *Cancer Treat Rev* 2005;31(3):159-72.
  33. Park JY, Elshami AA, Amin K, Rizk N, Kaiser LR, Albelda SM. Retinoids augment the bystander effect in vitro and in vivo in herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated gene therapy. *Gene Ther* 1997;4(9):909-17.
  34. Kunishige I, Samejima Y, Moriyama A, Saji F, Murata Y. cAMP stimulates the bystander effect in suicide gene therapy of human choriocarcinoma. *Anticancer Res* 1998;18(5A):3411-9.
  35. Robe PA, Princen F, Martin D, Malgrange B, Stevenaert A, Moonen G, et al. Pharmacological modulation of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system: effects of dibutyl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, alpha-glycyrrhetic acid, and cytosine arabinoside. *Biochem Pharmacol* 2000;60(2):241-9.
  36. Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H. Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(5):1831-5.
  37. Chen JK, Hu LJ, Wang D, Lamborn KR, Deen DF. Cytosine deaminase/5-fluorocytosine exposure induces bystander and radiosensitization effects in hypoxic glioblastoma cells in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67(5):1538-47.