

# A frakcionált besugárzás sugárérzékenyítő hatása

Drahos Ágnes,<sup>1</sup> Dám Annamária,<sup>1</sup> Öreg Zsolt<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Országos „Frédéric Joliot-Curie” Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet,

<sup>2</sup>Semmelweis Egyetem Egészségügyi Főiskolai Kar

A hiperfrakcionált sugárkezelés hatását vizsgáltuk két humán melanóma-sejtvo-nalon. A sejteket 1–8 frakcióban összesen 4 Gy gamma-besugárzásnak tettük ki in vitro. A kezeléseket akut hipoxiában is elvégeztük. Vizsgáltuk továbbá, hogy a besugárzás frakcionálása hogyan befolyásolja a bioreduktív szerként alkalmazott dibromodulcitol sugárérzékenyítő hatását. A sejtek túlélését közvetlenül a kezelése után, valamint 24 óra elteltével a klonogenitási index meghatározásával vizsgáltuk. Az apoptózis kimutatását a kezeléseket követően 72 órán át TUNEL módszerrel végeztük. Eredményeink szerint a 0,5 Gy besugárzás hatására a hipoxiás sejtek sugárérzékenysége nagyobb volt, mint a normoxiás sejteké. A dibromodulcitol sugárérzékenyítő hatása a dózis frakcionálásával megnövekedett. Az apotikus sejtek aránya sokkal magasabb volt a frakcionált besugárzás hatására, mint az ugyanazon dózist egyszerre kapott sejteké. Eredményeink a 0,5 Gy frakciónkénti dózisu frakcionált besugárzás jelentőségét hangsúlyozzák. *Magyar Onkológia* 48:323–331, 2004

To determine whether hyperfractionated treatment has benefits in the radiation therapy, two melanoma cell lines were irradiated with eight 0.5 Gy fractions as well as one single 4 Gy in vitro. The radiation was performed in air and in hypoxia as well. Cells were also irradiated in the presence of dibromodulcitol, a bifunctional alkylating agent with a weak radiosensitizer effect. The aim of the study was to examine whether hyperfractionation can influence the radiosensitizing effect of the bioreductive agent. Survival of the cells was determined immediately and 24 hours after various treatments by cell counting in hemocytometer and clonogenic assay. The number of the apoptotic cells was determined by the TUNEL assay and was followed up to 72 hours after treatment. Hypoxic cells had higher sensitivity than normoxic cells after 0.5 Gy irradiation. Radiosensitizing enhancement of DBD was higher with fractionated irradiation. The number of the apoptotic cells was significantly higher after hyperfractionated treatments than after single dose treatment combinations. Our results showed the significance of the hyperfractionated irradiation with 0.5 Gy per fraction in vitro. *Drahos Á, Dám A, Öreg Z. Radiosensitizing effect of hyperfractionated radiation. Hungarian Oncology* 48:323–331, 2004



## Bevezetés

Az akcerelált besugárzás célja a daganatosproliferáció csökkentése a teljes besugárzási idő lerövidítésével, amely a relapszusok megelőzésére

kedvező hatású. Ezzel ellentétben a hiperfrakcionálás kihasználja a tumoros és a normális sejtek különböző sugárérzékenységét, növelve a terápiás hatásfokot. Az utóbbi időben számos klinikai tanulmány jelent meg az akcerelált hiperfrakcionált besugárzás sikeres alkalmazásáról különböző daganatok, így az agydaganatok (1, 2) és a fejnaki daganatok (3, 4) kezelésében.

Közlésre érkezett: 2004. szeptember 17.

Elfogadva: 2004. december 13.

Levelezési cím: Drahos Ágnes, Országos „Frédéric Joliot-Curie” Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet, 1221 Budapest, Anna u. 5. Tel./fax: 482-2011, E-mail: drahos@hp.osski.hu

A nagyon alacsony (0,5 Gy körüli) dózissal végzett hiperfrakcionált besugárzás az in vitro tanulmányok szerint egy hatásos daganatspecifikus sugárérzékenyítő eszköz lehet, mert ebben a dózistartományban a hipoxiás sejtek érzékenyebbek a besugárzásra, mint a jól oxigenált sejtek (5). A hiperfrakcionált besugárzás optimális

Készült az OTKA F 3000, az ETT-155/2003, az NKFP-1/008/2001 és 1/016/2001 pályázat támogatásával.

dózisa 0,4-0,6 Gy körüli, ahol a hipoxia „védőhatása” a minimálisra tehető (6). A hipoxia okozta sugárrezisztencia elvesztése a frakcionáláskor arra vezethető vissza, hogy a sejtekben ezek az alacsony dózisok nem képesek a javító (repair) mechanizmusokat beindítani.

Nemrégiben fedezték fel, hogy az indukálható repair a fő tényező, amely befolyásolhatja a sejtre jellemző (intrinsic) sugárérzékenységet a klinikailag mérvadó dózisonál (2 Gy). Valószínűsíthető, hogy az extrém hiperfrakcionálás előnye leginkább azoknál a sejtípusoknál jelenik meg, amelyeknél kimutatható az alacsony dózisú hiperérzékenység (HRS = hyper-radiosensitivity) és a megnövekedett sugárrezisztencia a magasabb dózisoknál (IRR = induced radioresistance). Az egyelőre vitatott, hogy az indukált sugárrezisztencia és a 2 Gy-nél mérhető sugárérzékenység jól korrelál-e egymással (5, 6, 7).

Egy másik hipotézis a szenzitív szubpopulációk szerepét magyarázza. Eszerint a sejtciklus bizonyos fázisaiban levő sejtek sugárérzékenysége nagyobb, mint várható lenne. A HRS/IRR modell szerint az alacsony dózisú besugárzás elsősorban a szenzitív sejtciklusbeli fázisban levő sejteket eliminálja, és magasabb dózisok szükségesek a rezisztens fázisban levő sejtek elpusztításához. Az indukálható repair válasz arány formájában számszerűsíthető, az  $\alpha_s/\alpha_r$  a hiperérzékeny alacsony dózisú szakasz meredeksége a lineáris-kvadratikus (LQ) modell szerint. Emellett az eredeti függvény LQ-IR formulájában az IRR-nek van egy különös szerepe, leírja a repair indukációjához szükséges dózist, és ennek figyelembevételével a túlélési görbe jobb illeszkedése érhető el az alacsonyabb dózisoknál. De egyik modell sem képes igazán leírni a számos ismételt kis dózisfrakciójú besugárzás hatását.

Egy másik fontos figyelembe veendő tényező a sugárbiológiában az oxigén hatása, a sugárhatásra adott válasz befolyásolása oxigénnel. Az oxigenátság sugárhatást fokozó arányát (OER), vagyis a levegőben és a hipoxiában besugározott sejtek eltérő sugárérzékenységét széles körben tanulmányozták. Számos kísérletes tanulmány arra utal azonban, hogy az oxigén sugárérzékenyítő hatása alacsony dózisoknál csökkenni látszik (8, 9). Viszont csak néhány tanulmányban tették fel a kérdést, vajon az apoptózis indukció csökken-e, ha a sejteket hipoxiában sugarazzák be, ahhoz képest, ha aerob körülmények között történik mindez (10). Ha a hipoxiás védelem az apoptotikus sejthalálnál kifejezettebb, mint a nekrozisnál, akkor az azt jelenti, hogy a különbség és a növekedés az apoptotikus sejtek arányában klinikai jelentőséggel bírhat.

Egy számítógépes szimulációs vizsgálat megmutatta, hogy az OER dóziszfüggése csak akkor jelentkezik, ha a választ egyenlő dózisfrakciók stimulálják a normoxiás és a hipoxiás oldalon. Ez a helyzet a klinikumban, amikor egy megfelelő dózist adnak le egy daganatra, amely normoxiás és hipoxiás sejteket egyaránt tartalmaz (6, 11). Jelen tanulmányunkban pontosan ugyanazt a frakcionálási menetet alkalmaztu hipoxiában és leve-

gőben, hogy direkt módon összevethessük a frakcionált alacsony dózisú besugárzás hatását.

A kolóniaképzés egy széleskörűen tanulmányozott végpont a sugárbiológiában, az apoptózis szerepét a sugárzás okozta klonogenitási képesség elvesztésében azonban nemigen vizsgálták.

A technika fejlődése lehetővé tette, hogy megvizsgáljuk a „rizikó-sejtek” pontos számát egy kolóniaképzési módszerrel. Ez egyrészt elérhető fluoreszcens sejt számlálással (fluorescence activated cell sorter, FACS), ekkor lézertény segítségével számoljuk meg a sejteket, így pontosan lehet tudni, hogy mennyi sejtet teszünk ki, vagy a kiültetés után a sejteket pásztázó mikroszkóppal pozícionálni lehet (Dynamic Microscopic Image Processing System, DMIPS). Mindkét technikával beindíthatunk azonban bizonyos stresszfolyamatokat, mivel a lézertény, ill. a mikroszkóp fénye kelthet ilyen hatásokat. Lehetséges még a hagyományos kolóniaképzési vizsgálat alkalmazása, amennyiben a sejteket alacsony denzitásban sugarazzuk be. Ennélfogva a DMIPS használata nem feltétlenül szükséges ezeknek a hatásoknak a tanulmányozásához (7).

A dibromodulcitol (Mitolactol<sup>®</sup>, Elobromol<sup>®</sup>, DBD) egy bifunkcionális alkilálószert, amelyet széleskörűen alkalmaznak különböző daganatok kezelésében (12). A klinikai adatok azt mutatták, hogy a radioterápia DBD-vel vagy Carmustinnal (CCNU) kombinálva szignifikánsan jobb túlélést eredményezett, mint a besugárzás önmagában (13). DBD és Lomustin (BCNU) kombinációja hasznos és jól tolerálható adjuvánsa a malignus glióma sebészi és sugárterápiás kezelésének (14). Ígéretes eredményekről számoltak be humán xenotranszplantált melanóma és egérszarkóma kezelésében is (15, 16). A DBD-nek van egy gyenge sugárérzékenyítő hatása in vitro rendszerekben is. Laphámsejtes karcinóma kombinált kezelése besugárzással és DBD-vel a sejtproliferáció gátlását eredményezte a mitotikus aktivitás gátlásával és az apoptotikus aktivitás elősegítésével (17).

Az elmúlt két évtizedben különféle frakcionálási módok és néhány új sugárérzékenyítő jelent meg a tumorkezelés javítására. Jelen kísérleteinkben a melanómasejtek túlélését, proliferációját és klonogenitását vizsgáltuk in vitro hiperfrakcionált besugárzások hatására. Többszöri 0,5 Gy dózist alkalmaztunk normoxiában és hipoxiában, naponta két alkalommal. Vizsgáltuk továbbá azt, hogy vajon a hiperfrakcionálás milyen hatással van a DBD sugárérzékenyítő és alkiláló hatására. Ez a kísérletsorozat in vitro adatokkal szolgálhat a kombinált modalitású daganatkezelés jobb megértéséhez a klinikai gyakorlat számára is.

## Anyag és módszer

### Sejtvonalak, a sejtenyésztés körülményei

Az RPMI 8322 humán melanóma-sejtvonalat Margareta Edgren és Laszlo Revesz (Karolinska Institute, Stockholm) bocsátotta rendelkezésünkre. A törzseket monolayer kultúrában tartottuk fenn, 25 cm<sup>2</sup>-es szövettenyésztő flaskában 5 ml

médiumban. A sejteket Eagle's MEM (E-MEM, M7270, Sigma) tápfolyadékban tartottuk, kiegészítve 10% főtális borjúsavóval (Gibco), 2,2 g/l nátrium-bicarbonáttal és  $10^4$  IU/ml streptomycin/penicillinnel. A sejtvonalat 98% páratartalmú 5% CO<sub>2</sub> és 95% levegő gázkeverékben 37 °C termosztátban tartottuk. Az exponenciális növekedési fázisban levő sejteket hetente kétszer átoltottuk. A kísérletekhez az exponenciálisan növekvő sejt kultúrákat tripszinezttük, a sejteket megszámláltuk, és megfelelő sejtszámot 6 cm átmérőjű Petri-csészébe tettünk, a túlélést kolónia képzési technikával követtük.

#### Besugárzási körülmények

A Petri-csészébe megfelelő sejtszámban kitett sejteket 3 óráig hagytuk letapadni 37 °C-on. Ezután szobahőmérsékleten, 0,28–0,40 Gy/min dózisteljesítménnyel <sup>60</sup>Co gamma-besugárzást kaptak (Gammatron-3 Therapy Unit, Siemens). A sejtekről a médiumot a besugárzás után azonnal eltávolítottuk, és friss médiummal pótoltuk. A kontroll sejteket ugyanilyen módon kezeltük, csak nem kaptak besugárzást. A sejteket ezután az inkubátorba visszatettük, és hagytuk 7 napig, hogy a makroszkópos (50–200 sejt) kolóniák kifejlődjenek. A kolóniákat metilénkék festéssel jól láthatóvá tettük, megszámláltuk, és megadtuk a túlélési frakciót. A kezeletlen kontroll sejtek klonogenitása 60–65% volt.

#### Kombinált kezelés DBD-vel és besugárzással

A DBD sugárérzékenyítő hatásának vizsgálatát úgy határoztuk meg, hogy a sejteket 1 órán át 5 µg/ml DBD-t tartalmazó médiummal inkubáltuk, és a besugárzást is ebben végeztük. Az optimális DBD-koncentrációt előkísérletekben határoztuk meg. A tápfolyadékot közvetlenül a besugárzás után frissre cseréltük. A túlélési frakciót a fentiekhez hasonlóan határoztuk meg. A DBD-vel előkezelt és a DBD nélküli besugárzásokat párhuzamosan végeztük. Egyszerre hat Petri-csészébe a megfelelő számú sejtet kiültettük, és hármat csak besugárzással kezeltünk, háromnál pedig a DBD-kezelést is elvégeztük. A hat (hipoxia szempontjából párhuzamosan kezelt) Petri-csésze egyidőben, random módon ugyanazon besugárzó dobozban volt elhelyezve az előkezelés és a besugárzás alatt.

#### Kezelések hipoxiában

Minden egyes és kombinált kezelést hipoxiás körülmények között is elvégeztünk. A hipoxiát a besugárzás alatt úgy biztosítottuk, hogy a sejteket 1 órával a besugárzás előtt és a besugárzás alatt egy dobozban helyeztük el, amelyben folyamatosan biztosítottuk a 95% N<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub> gázkeverék áramlását. A kísérleteket (hipoxiában és normoxiában egyaránt) üveg Petri-csészében párhuzamosan végeztük.

Mindezek alapján a kezelési csoportok a következők voltak:

1. Kezeletlen kontroll (álbesugarazott),
2. Hipoxiás kontroll (álbesugarazott),
3. Besugarazott (levegőben),
4. Besugarazott (hipoxiás),
5. DBD-kezelt (levegőben),
6. DBD-kezelt (hipoxiában),
7. DBD-kezelt besugarazott (levegőben),
8. DBD-kezelt besugarazott (hipoxiás)

#### Frakcionált besugárzások és kombinált kezelések

A következő kísérletekben a besugárzási dózist 1–8 frakcióban adtuk, 0,5–4 Gy összdózisban. Naponta két frakciót alkalmaztunk, 6 órás különbséggel, amíg a sejtek az összdózist meg nem kapták. A frakciónkénti dózis 0,5–1,0–2,0–4,0 Gy volt. A sugárérzékenyítő hatás mérésére 5 µg/ml DBD-t tartalmazó tápfolyadékban előkezeltük a sejteket 1 órán keresztül, minden egyes besugárzási frakció alkalmával. Az összes frakcionálási kísérletet hipoxiában is elvégeztük, minden kezeléskor biztosítva az 1 órás előkezelést.

A sejteket a kezelési periódusban szérumentes tápfolyadékban tartottuk, hogy a reverzibilis G<sub>1</sub> sejtciklus fázisban maradjanak. Azért volt szükség erre, hogy kiküszöböljük a sejtciklus progressiójából adódó hibákat, és a 4 nap elteltével is egysejtes (illetve minél kisebb) mikrokolóniákat kezeljünk. A szérumentes tápfolyadékot naponta cseréltük. Az egyszeri besugárzást a 4. napon végeztük. Mind a hiperfrakcionált mind az egyszeri besugárzást követően a sejtek tápfolyadékát szérummal kiegészített médiumra cseréltük, hogy a sejtosztódási ciklus beindulhasson, és a kolóniák illetve az apoptózis kialakuljon. A képződött kolóniákat a kezelést követő 7. napon számláltuk meg. A túlélést a kezeletlen szérumentes tápfolyadékban tartott kontroll százalékában adtuk meg.

A kombinált kezelés sejtproliferációra gyakorolt hatását úgy is ellenőriztük, hogy a sejtenyésztfő flaskában besugarazott sejteknél az élő sejtszámot közvetlenül besugárzást követően, ill. 24 óra elteltével meghatároztuk. A túlélő sejtszámot a besugarazott sejteknél DBD jelenlétében és anélkül is megadtuk. A kezeletlen kontroll és az egyszer besugarazott csoportokat a hiperfrakcionált kezelt csoportokhoz hasonlóan ugyanannyi ideig szérumentes médiumban tartottuk. A túlélési frakciókat a kezeletlen kontroll százalékában adtuk meg.

#### Az apoptotikus sejtpusztulás meghatározása

Az apoptotikus sejtek számának meghatározása 0, 24, 48 és 72 órával a kezelési protokollokat követően történt. Ezeket a kísérleteket csak 4 Gy és 8 x 0,5 Gy besugárzást követően DBD-előkezeléssel és anélkül végeztük, biztosítva a megfelelő hipoxiás és normoxiás körülményeket. Az apoptotikus sejtek kimutatására 5x10<sup>4</sup> RPMI 8322 sejtet tettünk ki 1 ml tápfolyadékban 24-lyukú edénybe (Nunc) úgy, hogy a lyukakba előzőleg fedőlemezt helyeztünk. A kezelési protokollokat a fent részletezett módon végeztük. A kezeléseket

után a megfelelő időpontokban a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd 4% paraformaldehiddel fixáltuk 30 percig. Az apoptotikus sejteket TUNEL módszerrel jelöltük (In Situ Cell Death Detection Kit, AP, Boehringer Mannheim) a gyártó utasításait követve. Az apoptotikus sejteket fluoreszcens mikroszkóppal és fénymikroszkóppal egyaránt megfigyeltük. Legalább 1000 sejtet számoltunk meg lemezenként.

### Statistikai elemzés

Minden kezelést háromszor ismételtünk, kezelésként három párhuzamos mintát kezelve. A túlélési görbéket a hagyományos LQ és az LQ-IR modell alapján is megadtuk. Az adatokat az átlag ± standard hiba megadásával ábrázoltuk. Dózispontonként vizsgáltuk a túlélési frakciók szignifikáns eltérését. Szignifikánsnak a  $p > 0,05$  eltéréseket tekintettük.

Annak megvizsgálására, hogy van-e különbség a DBD sugárérzékenyítő hatásában hipoxiás és normoxiás körülmények között, ha a besugárzást több frakcióban adtuk, képeztük a hipoxiás és normoxiás túlélési frakciók hányadosát a különböző besugárzási dózisokat követően DBD jelenlétében és anélkül, a következő függvény szerint:

$$\frac{\text{SFR}_{\text{DBD}+}}{\text{SFR}_{\text{DBD}-}} = \frac{\left( \frac{\text{túlélési frakció hipoxiában}}{\text{túlélési frakció levegőben}} \right)_{\text{DBD}+}}{\left( \frac{\text{túlélési frakció hipoxiában}}{\text{túlélési frakció levegőben}} \right)_{\text{DBD}-}}$$

Ezeknek a számoknak a megadásával meg tudtuk határozni a DBD hatások különbségét a frakcionált besugárzások alkalmával.

Az apoptotikus sejtek arányát átlag ± standard hibaként adtuk meg. A statisztikai elemzéseket varianciaanalízissel végeztük (ANOVA) *post hoc* Bonferroni and Scheffé's tesztet alkalmazva az időfüggésre, független minták t-próbáját a DBD, a frakcionálás és a hipoxia hatásra. A statisztikai vizsgálatokat SPSS 10,0 szoftvercsomag segítségével végeztük.

### Eredmények

#### A sejtek túlélése egyszeri dózisú kezelés hatására

A sejtvonal túlélési görbéjén látható volt a hipersugárérzékenység/indukált rezisztencia jellemzője, többfázisú túlélési görbét eredményezve, elsősorban az 1 Gy alatti tartományban. Az 1. ábrán látható a melanoma sejtek túlélése csak besugárzást követően és DBD-vel kombinált kezeléskor. A sejteket hipoxiában és levegőben is besugárztuk, és túlélési görbéket elkészítettünk. Amennyiben a görbét az LQ modell alapján illesztettük, az az alacsony dózistartományban nem illeszkedett jól.

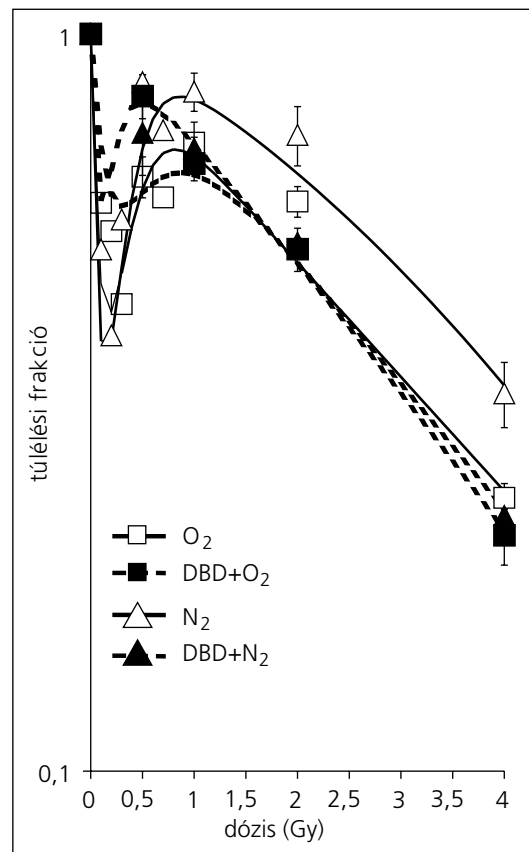
Az LQ-IR modell (5) szerint illesztve a görbét, sokkal jobban illeszkedett az alacsony és a maga-

sabb dózisoknál egyaránt. Ezen melanoma sejtvonallal kapott eredmény is igazolja azt az irodalmi megállapítást, hogy az ún. kis dózishatás azoknál a sejteknél jelentősebb, amelyek sugárrezisztensebbek (18, 19).

A vizsgált melanómasejtek többfázisú túlélési görbét mutattak 1 Gy alatt. A HRS/IRR mértéke azonban nem változott jelentősen attól függően, hogy a kezelést levegőben vagy hipoxiában végeztük, és hogy a DBD jelen volt-e a kezeléskor. A HRS maximuma a 10–30 cGy tartományban volt legjellemzőbben kimutatható (1. ábra). A hipoxia hatása szignifikánsan csak a 4 Gy dózisonál volt kimutatható azonban, függetlenül attól, hogy DBD kezelés történt-e vagy sem. Az OER értéke 4 Gy sugárkezeléskor DBD nélkül 1,33 volt, DBD vel kiegészítve a kezelést pedig 1,8-nak mutatkozott. Ez jelentősen elmarad attól az OER=3 értéktől, amely a nagyobb dózisú besugárzáskor (a sejtek túlélése 0,01) szokott mutatkozni, azonban látható egy tendencia, amely az általunk alkalmazott legnagyobb dózisonál már szignifikáns eltérést eredményezett a hipoxiás és a normoxiás csoport között.

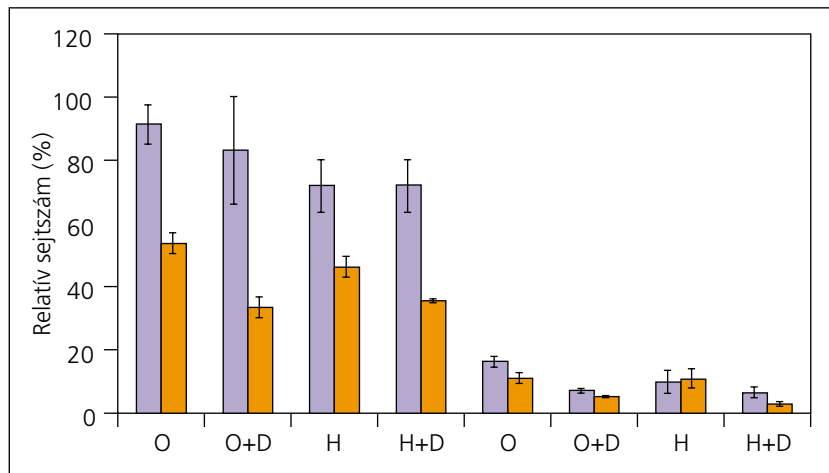
A DBD sugárérzékenyítő hatása hipoxiában 2 Gy besugárzás felett volt szignifikáns, ekkor a SER értéke 4 Gy-nél 1,58 volt. Levegőben besugárzva a sejteket pedig a DBD kezelés hatása nem mutatkozott szignifikánsnak, a maximális SER érték 1,2 volt az általunk alkalmazott dózistartományban. A sugárérzékenyítőként alkalmazott DBD hatása a dózis növekedésével a hipoxia hatáshoz hasonlóan szignifikáns tendenciát mutatott abban az esetben, ha a kezelés hipoxiában történt.

A kombinált kezelést követően a kialakult kolóniák a mikroszkópos megfigyeléskor kevesebb

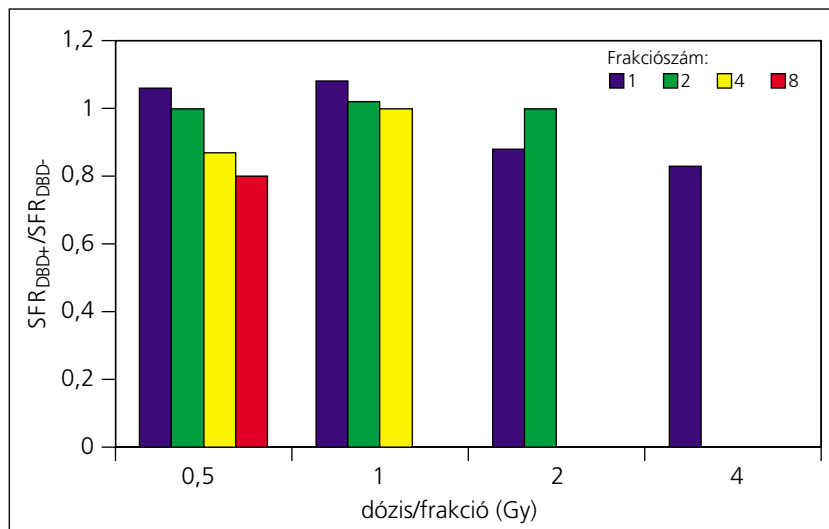


1. ábra. RPMI 8322 melanoma sejtek sugárérzékenysége (A) és DBD előkezeléssel (B) besugárzásakor és előtte 1 órával normoxiás (négyzet) vs. hipoxiás (háromszög) körülmények között. A túlélési görbék az LQ/IR model szerint készültek. A hipoxia hatása 4 Gy-nél szignifikáns ( $p < 0,05$ ), a DBD hatása 2 ill. 4 Gy-nél szignifikáns a hipoxiában végzett kezeléskor ( $p < 0,05$ ).

2. ábra. RPMI 8322 melanoma sejtek száma 4 Gy besugárzás után közvetlenül (fehér) és 24 óra múlva (fekete). O = normoxiában, H = hipoxiában, D = DBD jelenlétében. 1-4. oszlop: 4 Gy egy frakcióban; 5-8. oszlop: 8x0,5 Gy. Jelentősen alacsonyabb volt a túlélés a hiperfrakcionált csoportban a kezelés befejezésekor (0 h), amely 24 h elteltével is megmaradt.



3. ábra. RPMI 8322 melanoma sejtek relatív túlélése 4 Gy 1-8 frakcióban leadott besugárzást követően normoxiás vs. hipoxiás körülmények között, DBD-vel vagy nélkül,  $SFR_{DBD+}/SFR_{DBD-}$  (lásd Anyag és módszer). A frakciószám növekedésével a relatív túlélés csökkenése volt kimutatható, ha a kezelés 0,5 Gy dózis/frakcióval történt, nyolc frakció esetén meghaladta az egy frakcióban adott 4 Gy-nél tapasztaltat. 1 ill. 2 Gy dózis/frakció nem mutatott ilyen jelentős hatást.



sejtből álltak, mint a csak besugározott sejtekből képződött kolóniák, jelezve bizonyos sejtciklusbeli késést.

**Sejtprolifерáció hiperfrakcionált kezeléseknél**

A frakcionálás sejtprolifерációra gyakorolt hatását vizsgáltuk DBD jelenlétében és anélkül. Az élő sejtek meghatározása vitális festéssel történt a kezeléseik végén és 24 óra elteltével. Az 1 ill. 8 frakcióban leadott 4 Gy összdózis hatására élve maradt sejtek számát vetettük össze. A 2. ábrán látható az élő sejtek száma a 4 napig szérummentes tápfolyadékban tartott, besugarozással és DBD-vel nem kezelt kontroll szálalékában közvetlenül kezelés után és 24 óra múlva. A hiperfrakcionálás drámaian csökkentette az élő sejtek számát a nyolc besugárzást követően (p=0,01). Ez volt a kezelés negyedik napja, erre az időpontra a sejtek a szérummegvonás miatt is a sejtciklusukban megtorpantak. Azt is figyelembe kell venni, hogy ez alatt a négy nap alatt a sejtek egy ré-

sze mikrokolóniákat alakított ki, amelyben azok esetleg érzékenyebbek lehetnek, mint az egyedülálló sejtek (20). Amikor a teljes dózist egy frakcióban kapták a sejtek, a sejtszám csökkenése nem volt olyan jelentős. Ekkor a besugárzást követően 75-90%-ra csökkent a túlélés, a kezelés körülményeitől függően (normoxia/hipoxia, DBD jelenléte). Sejtszámolással csak csekély különbséget találtunk a túlélő sejtek számában a normoxiás és a hipoxiás csoportok között 24 óra elteltével. A DBD kezeléseket a hipoxiás hiperfrakcionálást kivéve tovább csökkentették az élő sejtek számát, a szer citotoxikus hatása 24 órás sejtszámoláskor jelentkezett, szignifikáns különbséget az egyszer kezelt csoportok között tudunk kimutatni. Ezzel a kísérleti elrendezéssel nehéz megítélni, vajon kizárólag a sejtciklus hatása, vagy az apoptózis beindulása vagy a mikrokolóniák korai pusztulása felelős ezért a jelentős sejtpusztulásért a hiperfrakcionálást követően. Nehéz megbecsülni a többszöri DBD kezelés citotoxikus hatását, amely szintén része volt a proliferációs aktivitás módosulásának.

Ezt a vizsgálatot, a sejtszámolást követően kolóniaképzési vizsgálattal egészítettük ki. A képződött kolóniák száma 8x0,5 Gy kezelést követően jelentősen csökkent, 23% volt normoxiában és 47% hipoxiában. A kolóniaszám majdnem nulla volt a DBD-kezelt csoportokban.

**A hiperfrakcionált kezeléseket sugárérzékenyítő hatása**

A dózisfrakcionálás és az alkiláló szer közös hatását a kolóniaképzéssel mért túléléssel detektáltuk. A dózis-hatás összefüggést három különböző kísérleti elrendezésben vizsgáltuk:

- (1.) 4 Gy összdózis 1 - 2 - 4 - 8 frakcióban,
- (2.) inkubálás és besugárzás dózis-frakcionálással normoxiás és hipoxiás körülmények között, és
- (3.) DBD hiánya és jelenléte besugárzáskor a fenti két kísérleti elrendezésben.

A következő jelenségeket tapasztaltuk:

A hiperfrakcionálás önmagában csökkentette a túlélő kolóniák számát. Ennek mértéke függött a frakciószámtól és a frakciónkénti dózistól, így ugyanazon összdózist követően a kolóniaszám alacsonyabb volt, ha a frakciószám nőtt.

Különbség mutatkozott az oxigenáltságtól függően, a hipoxia védő hatása csak 1 Gy felett jelentkezett.

A DBD sugárérzékenyítő hatása legkifejezettebben a magasabb sugárdózisoknál volt kimutatható, de a DBD hatása nem látszott hipoxiafüggőnek ezekben az alacsony dózistartományokban.

A kombinált hatás számszerű kifejezése érdekében számoltunk a következő aránnyal:

$$\frac{SFR_{DBD+}}{SFR_{DBD-}}$$

(lásd: Anyag és módszer). A 3. ábrán ennek értékeit tüntettük fel a frakciónkénti dózis függvényében. A DBD sugárhatás-módosító hatása kevésbé volt kifejezett hipoxiában, bár a hipoxiás sejtek a magasabb dózistartományban érzékenyebbek voltak io-

nizáló sugárzásra DBD-vel. Ez a viszonylag alacsony frakciószám csak a tendenciák érzékeltetésére alkalmas, és csak mérsékelt hatást eredményezett. Mindenesetre a tendencia azt mutatta, hogy a DBD sugárérzékenyítő hatása kifejezettebb volt, ha a frakciószámot növeltük. A túlélési frakciók aránya a 0,5 Gy 8 frakcióját követően majdnem a 4 Gy egyszeri dózissal megegyező arányt mutatott. Amikor a frakciónkénti dózis 1 vagy 2 Gy volt, az arány magasabbnak mutatkozott.

#### *Apoptotikus sejtek detektálása különböző kezeléseket követően*

Az alkalmazott proliferációs vizsgálatokban a túlélő sejtek számát a kezeletlen kontrollhoz hasonlítottuk a kezeléseket követően, majd 24 óra elteltével. A kezelt sejtek számának relatív csökkenése nem mutatta, hogy ez vajon a sejtciklus csökkenésének vagy a sejtek pusztulásának volt köszönhető. Ennek eldöntésére vizsgáltuk az apoptotikus DNS-fragmentációt. A besugárzások és a kombinált kezelések időbeli függésének és az apoptotikus sejtek arányának meghatározására a TUNEL módszert választottuk. A kezeletlen kontroll csoportban az apoptózis 2‰ volt (4. ábra). Az összes kezelt csoportban látható, hogy a kezelés befejezése után közvetlenül rendkívül alacsony volt az apoptotikus sejtek aránya, amely a szérumentes környezetben nem meglepő. A kezelés után a normál szérumentartalmú tápfolyadék visszaadásával, a sejtciklus beindulásával az apoptózis különböző mértékű, a kezelésektől függő emelkedését tapasztaltuk.

A kimutatható apoptotikus sejtszám relatíve alacsony maradt a 4 Gy egyszerre alkalmazott besugárzást követően. Az apoptotikus sejtarány enyhe növekedését tapasztalhattuk 24 óra (kb. 2 sejtciklus) és 72 óra elteltével a levegőben történt besugárzást követően. Az apoptotikus sejtek aránya 48 órával a kezelést követően 6%-ig emelkedett, majd 72 óra elteltével 4%-ra csökkent, amennyiben DBD volt jelen a besugárzáskor. A 4 Gy-es hipoxiás besugárzás nem indukálta a DNS fragmentációját a humán melanoma sejteken, a kontrollhoz képest nem tapasztaltunk emelkedést. A normoxiában és a hipoxiában végzett kezelés az apoptotikus sejtek számának szignifikáns eltérést eredményezett egyszeri 4 Gy besugárzást követően ( $p=0,017$ ). Ennek csak elméleti jelentősége van,

mivel klinikai szempontból ez a kezelési mód nem releváns.

A hiperfrakcionálás, vagyis a 4 Gy összdózis 8 frakcióban jelentősen megváltoztatta az apoptózis előfordulását, az egyszerre leadott és a hiperfrakcionált kezelés eredménye szignifikánsan különbözött ( $p=0,0001$ ).

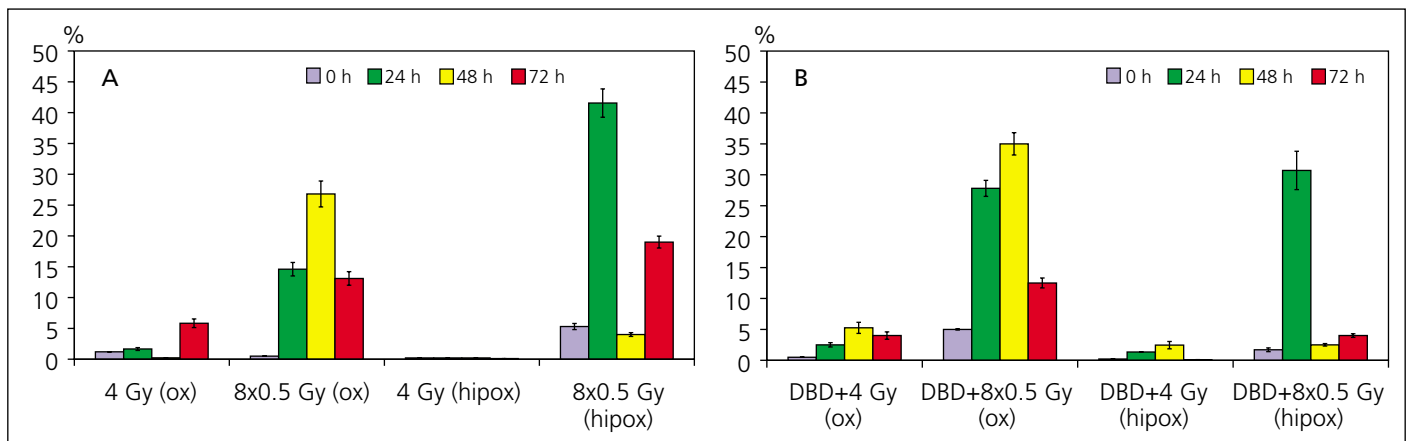
Az apoptotikus sejtszám szignifikánsan nőtt a besugározatlan kontroll szintjéhez és a 4 Gy egyszeri dózis szintjéhez képest is. Az apoptózis indukció egy egyhe további növekedést mutatott 24 óra elteltevel, majd egy maximummal 48 óránál, de még 72 óra elteltével is magasan maradt a normoxiás besugárzást követően.

A DBD jelenléte tovább növelte az apoptotikus sejtek arányát. A hipoxiában történt besugárzás apoptózis indukciója két hullámban jelentkezett, 24 ill. 72 órával a kezelés befejezése után, amely a sejtpusztulási program egy bizonyos kérését mutatja. Ez arra utal, hogy a besugározott sejteknek előre kell haladniuk a sejtcikluson ahhoz, hogy apoptózisba kerüljenek. A besugárzás DBD-vel kombinálva indukálta a legnagyobb arányú apoptózist, ami 24 órán belül bekövetkezett, majd 72 óráig alacsonyabb szinten maradt, amikor egy második hullámban, bár alacsonyabb szinten tetőzött. A DBD hatása összességében azonban nem volt szignifikáns sem normoxiában, sem hipoxiában, annak ellenére, hogy az egyes időpontokban eltéréseket lehetett kimutatni.

Egy késői apoptózis volt még megfigyelhető a frakcionált besugárzást követően, ami azt jelzi, hogy a besugárzás egy perzisztáló károsodást okozott, amelyre a sejtek egy vagy több osztódással reagáltak, vagyis kései apoptózisba mentek. A DBD befolyásolta az apoptotikus folyamatot, de csak az elpusztult sejtek számának enyhe növekedését lehetett kimutatni normoxiában. A hiperfrakcionálás hipoxiában DBD-vel kombinált esetben egy csökkent apoptózis indukcióhoz vezetett, 24 órával a kezelés után mutatott maximumot, és később csak néhány sejt pusztult el apoptózissal.

Az apoptózis időbeli lezajlását statisztikailag nem találtuk szignifikánsnak, azonban mivel a vizsgálatok diszkrét időpontokban történtek, és csak az in situ apoptózis kimutatását engedte meg az általunk alkalmazott módszer, ezért a különböző kezeléseket során hasonlóságok és különbségek mutatkoztak az időben. Így a levegőben kezelt hiper-

4. ábra.  
Apoptózis index RPMI 8322 melanoma sejtek 4 Gy 1-8 frakcióban történt besugárzása után különböző időpontokban, normoxiás vs. hipoxiás körülmények között, DBD nélkül (A) és DBD jelenlétében (B). Az egyszeri kezelt csoportokban az apoptózis aránya egyetlen időpontban sem érte el az 5%-ot. A kezelés hiperfrakcionálása szignifikánsan növelte az apoptózist. A DBD hatása és az apoptózis időbeli lefolyása nem mutatkozott szignifikánsnak.



frakcionált csoportoknál az apoptózis a 48. órában volt a legmagasabb, mind a DBD-vel is kezelt, mind a csak besugárzással kezelt csoportoknál. A hipoxiában elvégzett kezelésnél azonban a kétfázisú apoptózis indukció volt inkább jellemző, ami elsősorban a 24. órában, másodsorban a 72. órában eredményezett csúcspontokat, ez utóbbiak alacsonyabak voltak.

Az apoptózis vizsgálatával egyidőben a mitotikus sejteket is megszámláltuk a fedőlemez tenyészeteken (az adatokat nem ábrázoltuk). Azt tapasztaltuk, hogy ugyanezekben a diszkrét időpontokban a mitózis aránya majdnem nullára csökkent, amennyiben bármelyik DBD-vel kombinált hiperfrakcionált kezelést alkalmaztuk, ami valószínűleg a szer mitózisgátló szerepével is összefüggésbe hozható (17).

### Megbeszélés

Jelen *in vitro* vizsgálatunkban megmutattuk, hogy a hiperfrakcionált 4 Gy gamma-besugárzás hatásosabban pusztította a sejteket, mint az egyszerre adott kezelés. Ha az összdózist 2–8 frakcióban alkalmaztuk, a klonogénikus túlélés a frakciószámától és a frakciónkénti dózis függvényében csökkent. A hipoxiában történő dózisfrakcionálás a sejtek sugérérzékenységét tovább fokozta, ami a magasabb dózissal végzett kezeléseknél tapasztalatai alapján nem várt eredmény. A bifunkcionális alkilezőszer, a DBD alkalmazása csak mérsékelt további toxicitásbeli növekedést eredményezett.

A DBD egy gyenge sugérérzékenyítő szer, amelynek azonban ezen hatása nem kizárólag a hipoxiás sejtekhez kapcsolódik. Megvizsgáltuk a DBD sugérérzékenyítő hatásának dóziszfüggését. Megállapítottuk, hogy ez a hatás a magasabb dózisoknál kifejezettebb volt, de ki lehetett mutatni az alacsony dózisoknál is. A besugárzás frakcionálása, minden frakcióban DBD kezeléssel kiegészítéssel eredményes volt. A DBD sejtciklus specifikus hatása, maximális a tumorsejtek  $G_1$  fázisában, míg a dianhidro-galactitol (DAD), amely a DBD aktív metabolitja, a legerősebb hatást a késői S-fázisban mutatja (21, 22). A hiperfrakcionálási kísérletekben a sejtek többsége  $G_1$  fázisban volt, mivel a tápfolyadékot a kezeléseknél megkezdése előtt 24 órával szérumentesre cseréltük, és a kezeléseknél alatt végig így tartottuk (19).

Az egyszerre adott kezeléseknél a melanómasejtek többfázisú túlélési görbéjét mutatták az 1 Gy alatti tartományban. A HSR/IR mértéke és mintázata a következő feltételektől függött: normoxiás vagy hipoxiás körülmények és a DBD jelenléte. A hipoxiás sejtek az alacsony dózistartományban érzékenyebbek voltak a normoxiás sejteknél. A sejtvonalakra jellemző a hiper-sugérérzékenység (HRS) a nagyon alacsony dózistartományokban ( $<10$  cGy), ami nem várható a magasabb dózissal okozta hatás alapján. Amint a dózis kb. 30 cGy fölé emelkedik, megnövekedett sugárrezisztencia (IRR) tapasztalható kb. 1 Gy dózissal, ahol a sugárrezisztencia maximális, és a sejt túlélése inentől a szokásos csökkenő görbelefutást mutatja, ahogyan a dózis növekszik (23). Feltételezhető, hogy a

HRS/IRR a sejtek repair képességéhez köthető, azonban a folyamat pontos működése és az aktivációs mechanizmusok még nem ismertek. A DNS károsodása és kijavitódása is valószínűleg ehhez kapcsolódik (24). Ráadásul a környezeti feltételek (pl. szérummegvonás vagy a sejtsűrűség hatása), genetikai vagy epigenetikai tényezők szintén befolyásolhatják a hiper-sugérérzékenységet és az indukált sugárrezisztenciát. A hiperfrakcionált besugárzás hatékonyabban indukálta a tumorsejtek pusztulását kísérletes (19) és klinikai (9) körülmények között is. Kísérleteinkben 4 Gy összdózist adtunk 1–8 frakcióban, négy nap alatt. Kimutattuk a sejtek a frakciószámától és a frakciónkénti dózistól függő csökkent klonogenitását. A kolóniaszám alacsonyabb volt, ha ugyanazt az összdózist 2–8 frakcióban adtuk. A hipoxiás védelem csak 1 Gy felett volt kimutatható. A DBD jelenléte nem befolyásolta a sugárhatást az alacsony dózistartományban (1 Gy alatt), miközben a szer nem fejtette ki sugárdóziszfüggő hatását. Hiperfrakcionálási eredményeink Short (19) eredményeivel összevethető. Abban a tanulmányban a szerzők szignifikánsan nagyobb sejtpusztulást tudtak kimutatni napi többszöri kis dózissal besugárzással, összehasonlítva ugyanannak a dózissal a napi egyszeri leadásával. Kísérleteinkben  $G_1$  fázisban tartott sejteket 0,4 Gy dózissal kezelték 4 órás különbséggel naponta 3 alkalommal, amellyel csökkent túlélést mutattak ki az 1,2 Gy napi egyszeri alkalmazásához képest 5 napos kezelési periódus után (19). Kimutatták, hogy a második dózissal adott válasz a HRS-pozitív és -negatív sejteknél egyaránt függött a frakciók között eltelt időtől, hasonló hatásokat kiváltva az aszinkron és a  $G_1$  fázisban tartott kultúrákban egyaránt. Az eredmények szerint a sejtciklus progressziója nem maga volt az oka a túlélés időfüggő eltéréseinek frakcionált dózist követően, bár a HRS jelenség mértéke a sejtciklus függvényében változó lehet.

Az utóbbi időben kialakult vélemények alapján a hiper-sugérérzékenység nem kapcsolható az apoptózishoz (23, 25). Vizsgálatunkban levegőben és hipoxiában besugárzott sejtek apoptózis indukcióját vetettük össze 4 Gy 1 ill. 8 frakcióban való leadását követően. A módszer kifejezetten az apoptotikus sejtek *in situ* kimutatására alkalmas, és az apoptotikus folyamat befejeztével a lemezről a tápfolyadékba kerülő, flotáló sejteket már nem tudja kimutatni, azonban a nekrotikus sejtek elkülönítése a módszerrel elérhető. Ennek alapján az apoptózis index és a túlélési adatok egymás kiegészítését szolgálhatják a hiperfrakcionált sugárzás tanulmányozásában. Nem vizsgáltuk az apoptózis indexet 4 Gy-nél kisebb leadott dózisoknál, mert ezekben az esetekben az apoptózis aránya várhatóan alacsonyabb, és célunk elsősorban a frakcionálás, a hipoxia és a DBD hatásának kimutatása volt. Alapvető sugárbiológiai tanulmányok alapján a hipoxia védi a sejteket a sugárzás-indukálta klonogenitás csökkenéstől és az apoptózistól a magasabb dózisoknál. Alacsonyabb sugárdózisoknál Hopcia és mtsai kimutatták, hogy a HL60 sejtek apoptózisa besugárzás után 2 nappal bekövetkezik és az apoptózis mitotikus pusztulás része (vagyis az apoptózis néhány mitózis után alakul ki) (26). A hipoxiás sejtek szignifikánsan fokozottan el-

lenáltak az apoptózisnak, mint a levegőben besugárzott sejtek. Mi azt tapasztaltuk, hogy a frakcionálás önmagában fokozta az apoptotikus sejtpusztulást levegőben és hipoxiában egyaránt, amit a DBD jelenléte részben módosított. Az apoptózis időbeli lefutása valószínűleg a szer apoptózis támogató hatásának volt köszönhető. Ez valószínűsíti, hogy a mitotikus sejthalál és a DNS töredezése egyik magyarázata lehet a frakcionálás okozta megnövekedett sejtpusztulásnak. A saját proliferációs kísérleteink alapján a sejtciklus perturbációjának jelentősége nem zárható ki. A bystander hatás, vagyis azon sejtek károsodása, amelyek maguk nem kaptak találatot (27) szerepet játszhatnak a többszöri besugárzás utáni helyreállításban. Az első dózis után kialakuló bystander hatások szerepet játszhatnak sugárzást kapott sejtek végső reakciójában a következő sugárzások alkalmával (25, 28).

In vitro kísérleteinkben a hiperfrakcionálás hatásosságát mutattuk ki a melanómasejtek pusztulásában. Az irodalmi adatok a melanóma palliatív terápiájában elsősorban a konvencionális vagy a hipofrakcionált besugárzást mutatják előnyösnek (29–31). Harney és munkatársai azonban a közelmúltban in vivo is kimutatták az alacsony dózisú hiperfrakcionált kezelés jó hatását a melanóma kezelésében, bár egyelőre még csekély számú beteg-egyazon (32).

A bifunkcionális alkilezőszer enyhén módosította frakcionált dózis hatását. Míg a pontos mechanizmus nem ismert, úgy gondoljuk, hogy további in vitro vizsgálatok szükségesek azoknak a tényezőknek az azonosítására, amelyek szerepet játszanak a dózisfrakcionálás hatásmechanizmusában, hogy megérthessük az in vivo radioterápia mechanizmusait.

## Köszönetnyilvánítás

A jelen kísérletek az OTKA F03000 and 30353, valamint az NKFP 1/016/2001 támogatásával készültek.

## Irodalom

- Gonzalez D, Menten J, Bosch DA, et al. Accelerated radiotherapy in glioblastoma multiforme: A dose searching prospective study. *Radiother Oncol* 32:98-105, 1994.
- Prados MD, Wara WM, Sneed PK, et al. Phase III trial of accelerated hyperfractionation with or without difluoromethylornithine (DMFO) versus standard fractionated radiotherapy with or without DMFO for newly diagnosed patients with glioblastoma multiforme. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 49:71-77, 2001
- Nguyen LN, Ang KK. Radiotherapy for cancer of the head and neck: altered fractionation regimens. *Lancet Oncol* 3:693-701, 2002.
- Petrascu S, Reinacher-Schick A, Busemann B, et al. Neoadjuvant, hyperfractionated irradiation induces apoptosis and decreases proliferation in squamous cell cancer of the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg* 29:285-289, 2000
- Denekamp J, Dasu A, Waites A, Littbrand B. Hyperfractionation as an effective way of overcoming radioresistance. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 42:705-709, 1998
- Dasu A, Denekamp J. Inducible repair and intrinsic radiosensitivity: A complex but predictable relationship? *Radiat Res* 153:279-288, 2000
- Chandna S, Dwarakanath BS, Khaitan D, et al. Low-dose radiation hypersensitivity in human tumour cell lines: Effects of cell-cell contact and nutritional deprivation. *Radiat Res* 157:516-525, 2002

- Palcic B, Skarsgard LD. Reduced oxygen enhancement ratio at low doses of ionizing radiation. *Radiat Res* 100:328-339, 1984
- Skarsgard LD, Harrison I. Dose dependence of the oxygen enhancement ratio (OER) in radiation inactivation of Chinese hamster V79-171 cells. *Radiat Res* 127:243-247, 1991
- Klassen NV, Walker PR, Ross, CK, et al. Two stage cell shrinkage and the OER for radiation-induced apoptosis of rat thymocytes. *Int J Radiat Biol* 64: 571-581, 1993
- Dasu A, Denekamp J. Superfractionation as a potential hypoxic cell radiosensitizer: prediction of an optimum dose per fraction. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 43:1083-1094, 1999
- Eckhart S. (ed.) *Dibromodulcitol*. Budapest, Medicina, 1982
- Afra D, Kocsis B, Dobay J, Eckhart S. Combined radiotherapy and chemotherapy with dibromodulcitol and CCNU in the postoperative treatment of malignant gliomas. *J Neurosurg* 59:106-110, 1983
- Hildebrand J, Sahnoud T, Mignolet F, Afra D. Adjuvant therapy with dibromodulcitol and BCNU increases survival of adults with malignant gliomas. *Neurology* 44:1479-1483, 1994
- Hidvegi EJ, Drahos A, Unger E, et al. Combined treatment of S-180 sarcoma with dibromo-dulcitol, X-irradiation and hyperthermia. *Clin Cancer Res* 7:3808s, 2001
- Jeney A, Kovalszky I, Rásó E, et al. The biological activity of cisplatin and dibromodulcitol in combination therapy. *Br J Cancer* 71:317-321, 1995
- Kraxner H, Tamas L, Safrany G, et al. Apoptotic and mitotic activity in squamous cell carcinoma cells after combined modality treatment with  $\gamma$ -irradiation and dibromodulcitol. *Cell Biol Int* 25:599-606, 2001
- Short SC, Mitchell SA, Boulton P, et al. The response of human glioma cell lines to low-dose radiation exposure. *Int J Radiat Biol* 75:1341-1348, 1999
- Short SC, Kelly J, Mayes CR, et al. Low-dose hypersensitivity after fractionated low-dose irradiation in vitro. *Int J Radiat Biol* 77:655-664, 2001
- Mothersill C, Seymour C. Survival of human epithelial cells irradiated with cobalt 60 as microcolonies or single cells. *Int J Radiat Biol* 72:597-606, 1997
- Oláh E, Pályi I, Sugár J. Effects of cytostatics on proliferating and stationary cultures of mammalian cells. *Eur J Cancer* 14:895-900, 1978
- Pályi I. Survival and phase sensitivity of HeLa cells treated with dianhydrogalactitol (NSC-132313). *Cancer Chemother Rep* 59:493-499, 1975
- Joiner M, Marples B, Lambin P, et al. Low-dose hypersensitivity: Current status and possible mechanisms. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 49:379-389, 2001
- Marples B, Joiner MC. The elimination of low dose hypersensitivity in Chinese hamster V79-379A cells with pretreatment with X-rays or hydrogen peroxide. *Radiat Res* 141:160-169, 1995
- Mothersill C, Seymour CB. Bystander and delayed effects after fractionated radiation exposure. *Radiat Res* 158:626-633, 2002
- Hopcia KL, McCarey YL, Sylvester FC, Held KD. Radiation-induced apoptosis in HL60 cells: Oxygen effect, relationship between apoptosis and loss of clonogenicity and dependence of time to apoptosis on radiation dose. *Radiat Res* 145:315-323, 1996
- Mothersill C, Seymour CB. Radiation induced bystander effects: Past history and further directions. *Radiat Res* 155:759-767, 2001
- Mothersill C, Seymour CB, Joiner MC. Relationship between radiation-induced low-dose hypersensitivity and the bystander effect. *Radiat Res* 157:526-532, 2002
- Cooper JS, Chang WS, Oratz R, et al. Elective radiation therapy for high-risk malignant melanomas. *Cancer J* 7:498-502, 2001
- Cooper JS. Radiation therapy of malignant melanoma. *Dermatol Clin* 20:713-716, 2002
- Fenig E, Eidelevich E, Njuguna E, et al. Role of radiation therapy in the management of cutaneous malignant melanoma. *Am J Clin Oncol* 22:184-186, 1999
- Harney J, Short SC, Shah N, et al. Low dose hyper-radiosensitivity in metastatic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59:1190-1195, 2004