



Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji  
im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

mgr inż. stud. med. Mateusz Pociągiel

### **Badanie potencjału terapeutycznego i efektu radiobiologicznego niskich dawek promieniowania jonizującego w modelach klinicznych oraz przedklinicznych**

*Study of the therapeutic potential and radiobiological impact of low  
doses of ionizing radiation in clinical and preclinical models*

*Rozprawa doktorska w oparciu o cykl publikacji naukowych na stopień doktora  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauk medycznych*

**Promotor:** prof. dr hab. n. med. dr h. c. Krzysztof J. Filipiak

**Promotor pomocniczy:** dr n. med. Michał Lis

Warszawa 2025

Bez wsparcia moich najbliższych nie byłbym w stanie wykonać  
tego kroku na drodze naukowego i zawodowego rozwoju

Dziękuję Wam za wysłuchanie, pełną akceptację, nieskończoną cierpliwość,  
każdą cenną radę oraz lata oparcia w momentach,  
które dzielicie ze mną zawsze w miłości  
Kochana Mamo, Tato i Siostry – Dziękuję z całego serca

رحلتنا تحدث مرة واحدة فقط، لكنها تستمر حتى النهاية – الآن أو لاحقاً – قوتك ستلهمني دائماً

Moim promotorom za wskazanie i wsparcie ścieżki  
pozwalającej na przygotowanie tej pracy składam serdeczne podziękowania

# Spis treści

|                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>WYKAZ SKRÓTÓW</b>                                                                                                             | <b>5</b>  |
| <b>1. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ</b>                                                                       | <b>7</b>  |
| <b>2. STRESZCZENIE</b>                                                                                                           | <b>8</b>  |
| 2.1. JĘZYK POLSKI                                                                                                                | 8         |
| 2.2. JĘZYK ANGIELSKI (ENGLISH ABSTRACT)                                                                                          | 9         |
| <b>3. WPROWADZENIE</b>                                                                                                           | <b>10</b> |
| <b>4. CELE PRACY</b>                                                                                                             | <b>14</b> |
| <b>5. METODOLOGIA</b>                                                                                                            | <b>15</b> |
| 5.1. STRATEGIA GROMADZENIA DANYCH                                                                                                | 16        |
| 5.1.1. Ekspozycja zawodowa na promieniowanie jonizujące                                                                          | 16        |
| 5.1.2. Napromienianie całego ciała LDIR w leczeniu nowotworów                                                                    | 16        |
| 5.1.3. Wpływ LDIR na śmiertelność i progresję chorób sercowo-naczyniowych                                                        | 16        |
| 5.2. POZYSKANIE DANYCH                                                                                                           | 17        |
| 5.3. OCENA JAKOŚCI I ZBIERANIE DANYCH                                                                                            | 17        |
| <b>6. WYNIKI</b>                                                                                                                 | <b>18</b> |
| 6.1. WPŁYW PROMIENIOWANIA NA CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA CHOROÓB SERCOWO-NACZYNIOWYCH                                                  | 19        |
| 6.1.1. Skutki promieniowania na wczesną postać miażdżycy                                                                         | 21        |
| 6.1.2. Współczynnik śmiertelności w grupach narażonych na niskie dawki promieniowania jonizującego                               | 22        |
| 6.1.3. Współczynnik progresji chorób serca w grupie narażonej na niskie dawki promieniowania jonizującego                        | 23        |
| 6.1.4. Wskaźnik progresji różnych chorób serca w grupie narażonej na niskie dawki promieniowania jonizującego                    | 24        |
| 6.1.5. Porównanie wskaźnika śmiertelności w grupie osób narażonych na niskie dawki promieniowania jonizującego a grupą kontrolną | 24        |
| 6.1.6. Porównanie progresji chorób serca między grupą narażoną na niskie dawki promieniowania jonizującego a grupą kontrolną     | 25        |
| 6.2. MODYFIKACJE DNA INDUKOWANE NISKIMI DAWKAMI PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO                                                      | 31        |
| 6.3. WPŁYW LDIR NA MECHANIZM SYNTEZY BIAŁEK                                                                                      | 32        |
| 6.4. WPŁYW NISKICH DAWEK PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO NA AKTYWNOŚĆ UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO WŚRÓD RADIOLOGÓW                       | 33        |
| 6.5. POTENCJALNE KORZYŚCI NISKICH DAWEK PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO                                                              | 34        |
| 6.5.1. Terapeutyczny efekt hormetyczny niskich dawek promieniowania jonizującego                                                 | 34        |
| 6.6. PERSPEKTYWA HISTORYCZNA I ZASTOSOWANIE TERAPEUTYCZNE TB-LDIR                                                                | 36        |
| 6.7. POCZĄTKOWE BADANIA I WYNIKI ZASTOSOWANIA LDIR                                                                               | 36        |
| 6.7.1. Wczesne osiągnięcia w zakresie radioterapii niskimi dawkami w leczeniu nowotworów hematologicznych                        | 36        |
| 6.7.2. Rozwój badań nad TB-LDIR – pierwsze przetłomowe wyniki                                                                    | 37        |
| 6.7.3. Badania długoterminowe efektów TB-LDIR                                                                                    | 38        |
| 6.7.4. Rozszerzenie zastosowania TB-LDIR w praktyce klinicznej                                                                   | 41        |
| 6.7.5. Leczenie raka prostaty za pomocą TB-LDIR i terapii radonowej                                                              | 43        |
| 6.7.6. Efekty terapii radonowej w różnych typach nowotworów                                                                      | 44        |
| 6.7.7. Modulacja punktów kontrolnych układu immunologicznego w połączeniu z TB-LDIR                                              | 44        |
| 6.7.8. Ewolucja badań klinicznych nad TB-LDIR oraz wnioski z dotychczasowych badań                                               | 45        |

|                                                                                                                                                                                                                        |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.8. PRAWDOPODOBNY MECHANIZM TERAPEUTYCZNY TB-LDIR.....                                                                                                                                                                | 48         |
| 6.8.1. Stymulacja układu odpornościowego .....                                                                                                                                                                         | 48         |
| 6.8.2. Eliminacja komórek nowotworowych indukowana promieniowaniem .....                                                                                                                                               | 49         |
| 6.8.3. Hiperwrażliwość na promieniowanie i nasiloną apoptozę .....                                                                                                                                                     | 50         |
| 6.8.4. Immunogenna śmierć komórkowa w gruczakowym NHL.....                                                                                                                                                             | 50         |
| <b>7. PUBLIKACJE .....</b>                                                                                                                                                                                             | <b>64</b>  |
| 7.1. PUBLIKACJA NR 1 „TIME TO REJUVENATE ULTRA-LOW DOSE WHOLE-BODY RADIOTHERAPY OF CANCER” .....                                                                                                                       | 65         |
| 7.2. PUBLIKACJA NR 2 „EFFECTS OF A UNIQUE COMBINATION OF THE WHOLE-BODY LOW DOSE RADIOTHERAPY WITH INACTIVATION OF TWO IMMUNE CHECKPOINTS AND/OR A HEAT SHOCK PROTEIN ON THE TRANSPLANTABLE LUNG CANCER IN MICE” ..... | 80         |
| 7.3. PUBLIKACJA NR 3 „META-ANALYSIS OF THE IMPACT OF LOW-DOSE IONIZING RADIATION ON MORTALITY AND PROGRESSION OF HEART DISEASE IN THE GENERAL PATIENT POPULATION: INSIGHTS FROM HORMESIS THEORY IN CARDIOLOGY” .....   | 110        |
| 7.4. PUBLIKACJA NR 4 „POSSIBLE POSITIVE IMPACT OF LOW-DOSES OF IONIZING RADIATION (LDIR) IN THE OCCUPATIONAL EXPOSURE OF HEALTH CARE WORKERS” .....                                                                    | 125        |
| <b>8. DYSKUSJA.....</b>                                                                                                                                                                                                | <b>136</b> |
| 8.1. RYZYKO SERCOWO-NACZYNIOWE ZWIĄZANE Z LDIR .....                                                                                                                                                                   | 136        |
| 8.1.1. Zwiększona śmiertelność w grupach narażonych na LDIR.....                                                                                                                                                       | 137        |
| 8.1.2. Progresja chorób serca .....                                                                                                                                                                                    | 137        |
| 8.1.3. Rodzaje chorób serca w kontekście LDIR.....                                                                                                                                                                     | 138        |
| 8.2. POTENCJAŁ TERAPEUTYCZNY TB-LDIR W LECZENIU NOWOTWORÓW .....                                                                                                                                                       | 138        |
| 8.2.1. Profil bezpieczeństwa i działania niepożądane .....                                                                                                                                                             | 139        |
| 8.2.2. Optymalizacja dawki frakcyjnej dla maksymalnej skuteczności .....                                                                                                                                               | 139        |
| 8.2.3. Porównywalne zalety w stosunku do chemioterapii .....                                                                                                                                                           | 139        |
| <b>9. WNIOSKI .....</b>                                                                                                                                                                                                | <b>141</b> |
| 9.1. WNIOSKI Z PRZEPROWADZONYCH BADAŃ WŁASNYCH .....                                                                                                                                                                   | 141        |
| 9.2. PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ .....                                                                                                                                                                                   | 143        |
| <b>LITERATURA.....</b>                                                                                                                                                                                                 | <b>146</b> |

## Wykaz skrótów

- 4-HNE** – (*ang. 4-hydroxynonenal*), 4-hydroksynonenal  
**8-OHdG** – (*ang. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*), 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna  
**<sup>99m</sup>Tc-HMDP** – (*ang. <sup>99m</sup>Tc-hydroxymethylene diphosphonate*), <sup>99m</sup>Tc-hydroksy-metylenodifosfonian  
**ALL** – (*ang. acute lymphoblastic leukemia*), ostra białaczka limfoblastyczna  
**ATM** – (*ang. ataxia telangiectasia mutated*), kinaza białkowa serynowo-treoninowa  
**C57BL/6** – linia myszy laboratoryjnych  
**CAT** – (*ang. catalase*), katalaza  
**CD4+** – (*ang. cluster differentiation 4*), kompleks 4 różnicowania  
**CD8+** – (*ang. cluster differentiation 8*), kompleks 8 różnicowania  
**CHD** – (*ang. congenital heart disease*), wrodzona wada serca  
**CHOP** – (*ang. cyclophosphamide, hydroxydoxorubicin/doxorubicin, oncovin/vincristine, prednisone*), cyklofosfamid, hydrosydoksorubicyna, winkrystyna i prednizon  
**CI** – (*ang. confidence interval*), przedział ufności  
**CIMT** – (*ang. carotid intima-media thickness*), grubość kompleksu intima-media tętnicy szyjnej wspólnej  
**CLL** – (*ang. chronic lymphocytic leukemia*), przewlekła białaczka limfocytową  
**CML** – (*ang. chronic myelogenous leukemia*), przewlekła białaczka szpikowa  
**COVID-19** – (*ang. coronavirus disease 2019*), koronawirus 2019  
**CR** – (*ang. complete remission*), całkowita remisja  
**CT** – (*ang. chemotherapy*), chemioterapia  
**CTLA-4** – (*ang. cytotoxic T cell antigen 4*), cytotoksyczne białko 4 związane z limfocytami T  
**CVD** – (*ang. cardiovascular disease*), choroby sercowo-naczyniowe  
**CVP** – (*ang. cyclophosphamide, vincristine, prednisone*), cyklofosfamid, winkrystyna, prednizon  
**DNA** – (*ang. deoxyribonucleic acid*), kwas dezoksyrybonukleinowy  
**Dnmts** – (*ang. DNA methyltransferases*), metylotransferaza DNA  
**EAR** – (*ang. excess absolute risk*), nadmierne ryzyko bezwzględne  
**Elk-1** – (*ang. ETS-like kinase 1*), kinaza podobna do ETS-1  
**EORTC** – (*ang. European Organisation on Research and Treatment of Cancer*), Europejska Organizacja Badań i Leczenia Raka  
**ERR** – (*ang. excess relative risk*), nadmierne ryzyko względne  
**FL** – (*ang. follicular lymphoma*), chłoniak grudkowy  
**Gy** – (jednostka SI), grej; jednostka dawki pochłoniętej  
**HB-LDIR** – (*ang. half body low-dose ionizing radiation*), napromienianie połowy ciała niskimi dawkami promieniowania jonizującego  
**HBI** – (*ang. half body irradiation*), napromienianie połowy ciała  
**Hcy** – (*ang. homocysteine*), homocysteina  
**HDIR** – (*ang. high-dose ionizing radiation*), wysokie dawki promieniowania jonizującego  
**HL** – (*ang. Hodgkin lymphoma*), chłoniak ziarniczny  
**HRS** – (*ang. hyper-radiosensitivity*), nadwrażliwość na promieniowanie  
**HSP90** – (*ang. heat shock protein 90*), białko szoku cieplnego 90  
**IFN-γ** – (*ang. interferon gamma*), interferon gamma  
**IFRT** – (*ang. involved-field radiotherapy*), radioterapia ograniczonego pola  
**IR** – (*ang. ionizing radiation or irradiation*), promieniowanie jonizujące lub napromienianie  
**LDIR** – (*ang. low-dose ionizing radiation*), niskie dawki promieniowania jonizującego  
**LL** – (*ang. lymphoblastic lymphoma*), chłoniak limfoblastyczny  
**LLC1** – (*ang. Lewis lung carcinoma 1*), linia komórkowa mysiego raka płuca

## Wykaz skrótów c. d.

- LNT** – (*ang. linear no-threshold model*), model liniowy bezprogowy
- MAPK** – (*ang. mitogen-activated protein kinase*), kinaza białkowa aktywowana mitogenami
- MBq** – (jednostka SI), megabekerel, jednostka aktywności promieniotwórczej
- MCP-1** – (*ang. monocyte chemoattractant protein-1*), białko chemotaktyczne monocytów 1
- MEK-ERK1/2** – (*ang. mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*), kinaza białkowa aktywowana mitogenami/kinaza regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi 1/2
- MN** – (*ang. micronuclei*), mikrojądro
- mRNA** – (*ang. messenger RNA*), informacyjny RNA (kwas rybonukleinowy)
- MSK1** – (*ang. mitogen- and stress-activated protein kinase 1*), kinaza białkowa 1 aktywowana mitogenami i stresem
- mSv** – (jednostka SI), milisiwert
- NEORAD** – Northeast Ohio Conjoint Radiation Centre
- NETs** – (*ang. neutrophil extracellular traps*), zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilii
- NHL** – (*ang. non-Hodgkin lymphoma*), chłoniak nieziarniczy
- NK** – (*ang. natural killer*), naturalni zabójcy; typ komórki układu odpornościowego
- NKT** – (*ang. natural killer T cells*), limfocyty naturalni zabójcy
- Nrf2** – (*ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), czynnik jądrowy 2 związany z czynnikiem erytroidalnym 2
- NSCLC** – (*ang. non-small cell lung cancer*), niedrobnokomórkowy rak płuca
- ORR** – (*ang. overall response rate*), całkowity odsetek odpowiedzi
- P53** – (*ang. tumor protein p53*) – białko supresorowe nowotworów p53
- PR** – (*ang. partial remission*), częściowa remisja
- PD-1** – (*ang. programmed death-1*), receptor programowanej śmierci
- PET** – (*ang. positron emission tomography*), pozytonowa tomografia emisyjna
- R** – (*ang. roentgen equivalent in man*), rem; jednostka równoważnika dawki promieniowania jonizującego pochłoniętego przez organizm
- ROS** – (*ang. reactive oxygen species*), reaktywne formy tlenu
- RRTI** – Rotterdamisch Radio-Therapeutisch Instituut
- RT** – (*ang. radiotherapy*), radioterapia
- SCLC** – (*ang. small cell lung cancer*), drobnokomórkowy rak płuca
- SOD** – (*ang. superoxide dismutase*), dysmutaza ponadtlenkowa
- STBI** – (*ang. subtotal body irradiation*), subtotalne napromienianie ciała
- TAC** – (*ang. total antioxidant capacity*), całkowita pojemność antyoksydacyjna
- TAM** – (*ang. tumor-associated macrophages*), makrofagi związane z guzem
- TB-LDIR** – (*ang. total body low-dose ionizing radiation*), napromienianie całego ciała niskimi dawkami promieniowania jonizującego
- TBI** – (*ang. total body irradiation*), napromienianie całego ciała
- TGF- $\beta$**  – (*ang. transforming growth factor beta*), transformujący czynnik wzrostu beta
- TIL** – (*ang. tumor-infiltrating lymphocytes*), naciekające limfocyty nowotworowe
- TIM-3** – (*ang. T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*), T-komórkowe białko błonowe
- TNF- $\alpha$**  – (*ang. tumor necrosis factor alpha*), czynnik martwicy nowotworu alfa
- WM** – (*ang. Waldenström's macroglobulinemia*), makroglobulinemia Waldenströma

## 1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

| Nr           | Opis bibliograficzny                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Impact Factor | Punkty MNiSW |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------|
| 1            | <b>Time to rejuvenate ultra-low dose whole-body radiotherapy of cancer</b> , Janiak MK, <b>Pocięgiel M</b> , Welsh JS; Critical Reviews in Oncology/Hematology Elsevier, Volume 160, <b>2021</b> , 103286, ISSN 1040-8428; DOI: 10.1016/j.critrevonc.2021.103286                                                                                                   | 5,5           | 100          |
| 2            | <b>Effects of a Unique Combination of the Whole-Body Low Dose Radiotherapy with Inactivation of Two Immune Checkpoints and/or a Heat Shock Protein on the Transplantable Lung Cancer in Mice</b> ; Nowosielska, E.M., Cheda, A., <b>Pocięgiel M</b> , Cheda, L., Szymański, P., Wiedlocha, A.; Int. J. Mol. Sci. <b>2021</b> , 22, 6309; DOI: 10.3390/ijms22126309 | 6,2           | 140          |
| 3            | <b>Meta-Analysis of the Impact of Low-Dose Ionizing Radiation on Mortality and Progression of Heart Disease in the General Patient Population: Insights from Hormesis Theory in Cardiology</b> ; <b>Pocięgiel M</b> , Opyd P, Zawodny T, Lis M, Filipiak KJ; J. Clin. Med. <b>2024</b> , 13(22), 6909; DOI: 10.3390/jcm13226909                                    | 3,0           | 140          |
| 4            | <b>Possible positive impact of low-doses of ionizing radiation (LDIR) in the occupational exposure of health care workers</b> ; <b>Pocięgiel M</b> , Opyd P, Langowska A, Lis M; Folia Cardiologica <b>2024</b> , 19 DOI: 10.5603/fc.101430                                                                                                                        | -             | 40           |
| Podsumowanie |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>14,7</b>   | <b>420</b>   |

## 2. Streszczenie

### 2.1. Język polski

Niskie dawki promieniowania jonizującego (LDIR - low-dose ionizing radiation) są coraz częściej wykorzystywane w praktyce klinicznej – zarówno w terapii, diagnostyce czy teranostyce, co wywołuje rosnące obawy dotyczące potencjalnych skutków zdrowotnych wynikających z takiego ich wykorzystania. Podczas gdy zagrożenia wynikające z wysokich dawek promieniowania jonizującego (HDIR – high-dose ionizing radiation) są dobrze znane, długoterminowe konsekwencje LDIR, zwłaszcza w kontekście nowotworów, układu sercowo-naczyniowego oraz immunomodulacji, są mniej zrozumiane. Niniejsza rozprawa omawia najnowsze obserwacje i badania dotyczące dwóch aspektów radioterapii (RT). Przy optymalnych dawkach może ona stymulować odpowiedź immunologiczną, wspierając tworzenie odporności przeciwnowotworowej oraz optymalizację immunoterapii choroby nowotworowej. Niemniej jednak wysokie dawki promieniowania jonizującego niosą ze sobą znaczne zagrożenia, takie jak immunosupresja i uszkodzenie komórek wraz z ich materiałem genetycznym. Z kolei promieniowanie o niskiej dawce lub niskiej intensywności zdaje się stymulować reakcje biologiczne, takie jak szybka naprawa DNA i zmniejszenie stresu oksydacyjnego, co sugeruje potencjał terapeutyczny przy minimalnych działaniach niepożądanych. Praca doktorska koncentruje się zatem na delikatnej równowadze między potencjałem leczniczym promieniowania a jego ryzykiem, podkreślając konieczność dalszych badań nad wpływem LDIR na zdrowie, szczególnie wśród pracowników ochrony zdrowia oraz osób przebywających w środowiskach o wysokiej ekspozycji na promieniowanie jonizujące. Celem pracy jest dostarczenie informacji na temat środków bezpieczeństwa oraz nakreślenie przyszłych kierunków badań, mających na celu bezpieczniejsze i bardziej efektywne zastosowanie promieniowania w medycynie.

**Słowa kluczowe:** *niskie dawki promieniowania jonizującego, radiobiologia, onkologia kliniczna, terapia przeciwnowotworowa, ryzyko sercowo-naczyniowe, naprawa DNA, ekspozycja zawodowa, odpowiedź immunologiczna wywołana promieniowaniem, radioterapia.*

## 2.2. Język angielski (English abstract)

Low-dose ionizing radiation (LDIR) is increasingly used in clinical practice, including therapy, diagnostics, and theranostics, raising growing concerns about the potential health effects of such applications. While the risks associated with high doses of ionizing radiation (HDIR) are well understood, the long-term consequences of LDIR, particularly in the context of cancer, the cardiovascular system, and immunomodulation, are less well-known. This dissertation discusses the latest observations and research on these dual aspects of radiotherapy (RT). At optimal doses, RT can stimulate immune responses, supporting the development of anti-tumor immunity and enhancing the optimization of cancer immunotherapy. However, high doses of ionizing radiation pose significant risks, such as immunosuppression and cellular damage, including genetic material. In contrast, low-dose or low-intensity radiation appears to stimulate biological responses such as rapid DNA repair and reduced oxidative stress, suggesting therapeutic potential with minimal side effects. The dissertation therefore focuses on the delicate balance between the therapeutic potential of radiation and its risks, emphasizing the need for further research into the health impacts of LDIR, particularly among healthcare workers and individuals in environments with high exposure of ionizing radiation. The objective of this study is to provide insights into safety measures and outline future research directions aimed at achieving safer and more effective applications of radiation in medicine.

**Key words:** *low-doses ionizing radiation, radiobiology, clinical oncology, anti-tumour therapy, cardiovascular risk, DNA repair, occupational health hazard, radiation-induced immune responses, radiation therapy*

### 3. Wprowadzenie

Niskie dawki promieniowania odnoszą się do ekspozycji na promieniowanie jonizujące na poziomach niższych niż te, które zwykle wiążą się z bezpośrednim ryzykiem dla zdrowia, jak w przypadku wysokich dawek stosowanych w radioterapii. W przeciwieństwie do promieniowania o wysokich dawkach, LDIR jest integralną częścią naszego środowiska, a jego medyczne zastosowania, takie jak tomografia komputerowa (CT) czy radioterapia, znacząco zwiększają ekspozycję ludzi. Szpitale i ochrona zdrowia są największym antropogenicznym źródłem promieniowania, odpowiadając za 14% całkowitej rocznej ekspozycji na świecie. W krajach rozwiniętych medyczne zastosowanie promieniowania jonizującego odpowiada średnio za dawkę 3 mSv na osobę rocznie, co jest ekwiwalentem około 150 zdjęć rentgenowskich klatki piersiowej [1]. W przypadku kardiologów i radiologów interwencyjnych narażenie to stawia personel medyczny w wyższej grupie ryzyka: roczna ekspozycja wynosi około 5 mSv, a ryzyko zachorowania na nowotwór w ciągu dwóch-trzech dekad pracy szacuje się jako 1 na 100 przypadków. Co więcej, w USA średnia skumulowana efektywna dawka u pacjentów poddanych obrazowaniu kardiologicznemu wynosi 23,1 mSv w ciągu trzech lat, a w niektórych przypadkach poziomy ekspozycji mogą sięgać nawet 543,7 mSv [2]. Takie dane wskazują na znaczenie i konieczność przeprowadzenia solidnych badań nad skutkami zdrowotnymi LDIR, zwłaszcza w kontekście rosnącego zastosowania medycznego promieniowania jonizującego oraz złożoności skutków przewlekłej ekspozycji zawodowej.

Według wcześniejszych analiz badawczych około 0,5% zgonów z powodu nowotworów w Stanach Zjednoczonych było związanych z diagnostycznymi badaniami radiologicznymi [3, 4]. Rozprzestrzenianie się elektrowni jądrowych, rozwój technologii kosmicznych oraz wzrost różnorodnych zagrożeń radiologicznych w różnych gałęziach przemysłu wskazują na pilną potrzebę badań nad LDIR. W przeciwieństwie do wpływu wysokich dawek, skutki zdrowotne niskich dawek budzą więcej kontrowersji w badaniach. Narażenie na HDIR wiąże się z problemami kardiologicznymi [5, 6], zaburzeniami psychicznymi [7], zaćmą [8] oraz nowotworami [9, 10] jako bezpośrednia implikacja ekspozycji. Wciąż jednak wiele aspektów dotyczących zagrożeń związanych z LDIR pozostaje niejasnych, co ma bezpośrednie konsekwencje dla zdrowia publicznego, produkcji energii, opieki medycznej oraz narażenia zawodowego.

Co ważne, LDIR odgrywa również istotną rolę we współczesnej medycynie, w szczególności w radioterapii i diagnostyce obrazowej [11, 12]. Nowe dane wskazują na potencjalne długoterminowe skutki ekspozycji na promieniowanie jonizujące (IR) w przypadku chorób niezwiązanych z nowotworami, w tym chorób układu sercowo-naczyniowego (CVD), które są główną przyczyną zgonów na świecie [13]. Teoria hormezy radiacyjnej przedstawia złożony pogląd na funkcję LDIR, sugerując, że niskie dawki promieniowania jonizującego mogą wywoływać reakcje biologiczne o działaniu ochronnym [14]. Badania przynoszą jednak niejednoznaczne wyniki, wskazując zarówno na zwiększone ryzyko chorób sercowo-naczyniowych, jak i na kardioprotekcyjne działanie LDIR [15]. Te rozbieżności podkreślają potrzebę systematycznych przeglądów badań, aby wyjaśnić wpływ niskich dawek promieniowania jonizującego na układ sercowo-naczyniowy i opracować działania zapobiegawcze dla grup narażonych, w tym pacjentów i personelu medycznego [16].



Wykład dotyczący hormezy radiacyjnej

(źródło: Massachusetts Institute of Technology, USA; Michael Short, lecture 34.)

Wpływ LDIR na układ odpornościowy wzbudza coraz większe zainteresowanie, tuż obok jego znaczenia dla zdrowia układu sercowo-naczyniowego. Promieniowanie w wysokich dawkach było dotychczas w centrum zainteresowań badawczych ze względu na jego związek z immunosupresją i kancerogenezą [17]. Nowe badania jednak podważają tę teorię, sugerując, że LDIR może oddziaływać na funkcje układu odpornościowego w złożony sposób [18]. Według niektórych doniesień, LDIR wywołuje adaptacyjne reakcje, które mogą mieć działanie terapeutyczne, takie jak poprawa naprawy DNA, aktywacja układu immunologicznego oraz redukcja stresu oksydacyjnego [19]. Te odkrycia komplikują tradycyjne postrzeganie promieniowania jako czynnika wyłącznie immunosupresyjnego i podkreślają potrzebę dalszych badań nad jego złożonymi efektami [20].

Radioterapia (RT) jest jedną z najskuteczniejszych i najczęściej stosowanych metod leczenia nowotworów, opartą na eliminacji komórek nowotworowych za pomocą

promieniowania jonizującego. Jako klasyczna technika terapii onkologicznej, RT jest stosowana u ponad 50% pacjentów onkologicznych na całym świecie [21–23]. Wykazano, że klasyczna RT w wysokich dawkach może mieć zdolność leczenia niektórych nowotworów wrażliwych na promieniowanie, pod warunkiem, że zmiany nowotworowe są zlokalizowane w jednym obszarze. W przypadku większości guzów litych pochodzenia nabłonkowego (raków), całkowita dawka radioterapeutyczna wynosi od 60 do 80 Gy, podczas gdy w obszarach z masywnymi nowotworami układu chłonnego dawki są zwykle niższe, w zakresie od 20 do 40 Gy, stosując konwencjonalne frakcje o wartości 1,8–2 Gy [24].

Zasada frakcjonowania dawek odgrywa kluczową rolę w RT, umożliwiając regenerację zdrowych komórek pomiędzy sesjami, jednocześnie wykorzystując mniej efektywne mechanizmy naprawcze komórek nowotworowych. Frakcjonowanie zapewnia również, że komórki nowotworowe wchodzą w bardziej wrażliwe na promieniowanie fazy cyklu komórkowego, a obszary hipoksyczne w guzach ulegają reoksygenacji między dawkami, co zwiększa efektywność terapeutyczną [25]. W ostatnich latach badania w zakresie radioterapii wykroczały poza wąski zakres jej tradycyjnej roli w bezpośredniej cytotoksyczności, badając jej funkcje immunomodulujące, które są kluczowe w walce z nowotworami. Zrozumienie zjawiska immunoedycji nowotworów (ang. cancer immunoediting) nadało nowy wymiar rywalizacji między nowotworem a układem odpornościowym, pokazując, jak odpowiedzi immunologiczne ewoluują w relacji z właściwościami immunogennymi komórek nowotworowych. W fazie eliminacji układ odpornościowy dąży do zniszczenia komórek nowotworowych. W miarę postępu choroby, przechodząc w fazy "równowagi" i "ucieczki", nowotwór wykorzystuje układ odpornościowy do stworzenia immunosupresyjnego mikrośrodowiska [26–28]. Zmieniające się paradygmaty immunologii nowotworów pokazują także dwoistość w odniesieniu do radioterapii. Przy umiarkowanych do wysokich dawkach RT indukuje śmierć komórkową o charakterze immunogennym, wywołuje reakcje zapalne i sygnały ostrzegawcze, które stymulują odpowiedź immunologiczną, przełamując immunosupresję wywołaną przez nowotwór i zwiększając skuteczność immunoterapii nowotworowej. Na przykład, umiarkowane dawki (0,2–2,0 Gy) w połączeniu z RT mogą zwiększać odpowiedź przeciwnowotworową i wywoływać efekt abskopalny, w którym odległe przerzuty ulegają regresji dzięki aktywacji systemowej odpowiedzi immunologicznej [29–31]. Jednak RT w wysokich dawkach powoduje znaczne

uszkodzenie zdrowych tkanek, immunosupresję i wtórne nowotwory [32–35], podczas gdy niskie dawki promieniowania ( $\leq 0,1$  Gy lub  $\leq 0,1$  mGy/min) jest mniej szkodliwe, wyzwała szybkie mechanizmy naprawy DNA, zmniejsza stres oksydacyjny i selektywnie niszczy nieprawidłowe komórki [36, 37].

LDIR okazało się także obiecującą metodą leczenia systemowego nowotworów, szczególnie w leczeniu chłoniaków, białaczek i przerzutowych nowotworów litych. Całkowite napromienianie ciała TB-LDIR (total body low-dose ionizing radiation) w dawkach 1–4 Gy przez kilka tygodni zostało udokumentowane jako skuteczne w hamowaniu wzrostu guzów i przerzutów zarówno w badaniach eksperymentalnych, jak i klinicznych [29, 38], a także w badaniach własnych (**Rozdział 7.**). Mechanizmy tego działania obejmują eliminację reaktywnych form tlenu, zmniejszenie stanu zapalnego oraz wzmocnienie funkcji immunologicznych, takich jak aktywacja limfocytów T, B i NK poprzez stymulację makrofagów, komórek dendrytycznych i neutrofili [39–42]. Historyczne zastosowanie niskich dawek radioterapii całego ciała sięga ponad wieku, a dalsze badania stały się podstawą jej zastosowania w stymulacji odporności przeciwnowotworowej. Badania przedkliniczne konsekwentnie wykazywały, że LDIR wzmacnia zarówno wrodzone, jak i adaptacyjne funkcje układu odpornościowego, zwiększając kluczowe odpowiedzi efektorowe, które skutecznie eliminują komórki nowotworowe [29, 38, 42]. Wyniki te sugerują, że strategiczne uwzględnienie LDIR w protokołach leczenia nowotworów mogłoby znacząco poprawić rokowania pacjentów z zaawansowanymi lub systemowymi nowotworami.

W niniejszej rozprawie doktorskiej zestawiono i poddano krytycznej analizie wyniki prac badawczych, z których każda koncentruje się na odrębnym, ale istotnym obszarze badań nad niskimi dawkami promieniowania jonizującego. Obejmują one: **(1) ryzyko sercowo-naczyniowe i potencjalne efekty ochronne związane z LDIR; (2) zagrożenia zawodowe dla pracowników ochrony zdrowia i innych grup narażonych na ekspozycję; oraz (3) skuteczność terapeutyczną i implikacje LDIR w leczeniu nowotworów.** Celem prowadzonych do tej pory prac badawczych jest zrozumienie oraz wyjaśnienie niepewności dotyczących LDIR poprzez połączenie efektów klinicznych, procesów molekularnych i danych epidemiologicznych. Uzyskana wiedza pozwoli na wsparcie polityki zdrowia publicznego, zabezpieczenie populacji narażonych na zagrożenia zawodowe oraz wprowadzenie inicjatyw opartych na dowodach naukowych w praktyce medycznej. W celu lepszego zrozumienia różnorodnych

skutków LDIR, praca ta dąży do zintegrowania przewidywanych zagrożeń z rzeczywistymi zastosowaniami oraz świadomością potencjalnych skutków radiobiologicznych niskich dawek promieniowania jonizującego.

#### **4. Cele pracy**

Zasadniczym celem czterech publikacji (**Rozdział 7.**) przedstawianych w niniejszej dysertacji było przybliżenie aktualnej oceny skutków biologicznych, potencjału terapeutycznego oraz oceny ryzyka skutków zdrowotnych niskich dawek promieniowania jonizującego – ze szczególną obserwacją tych efektów w kontekście onkologicznym i sercowo-naczyniowym. Cele te realizowałem poprzez:

##### **1) Przegląd terapeutycznego zastosowania napromieniania niskimi dawkami promieniowania jonizującego – Publikacja nr 1 (7.1.)**

Pierwszym celem pracy doktorskiej było wykonanie analizy terapii TB-LDIR jako skutecznej metody leczenia nowotworów, bazując na danych historycznych, jak i współczesnych badaniach klinicznych. Analiza opierała się na retrospektywnych obserwacjach skuteczności dyskutowanej metody jako narzędzia terapeutycznego w onkologii.

##### **2) Ocenę eksperymentalną *in vivo* wpływu niskich dawek promieniowania jonizującego z zastosowaniem modelu mysiego raka płuca – Publikacja nr 2 (7.2.)**

Celem przeprowadzanego przez nas badania eksperymentalnego była ocena skuteczności terapeutycznego TB-LDIR w połączeniu z inhibitorami immunologicznych punktów kontrolnych (CTLA-4 i PD-1) i/lub inhibitorem białka szoku cieplnego (HSP90) w mysim modelu niedrobnokomórkowego raka płuca.

##### **3) Przegląd systematyczny wpływu niskich dawek promieniowania jonizującego na układ sercowo-naczyniowy – Publikacja nr 3 (7.3.)**

Celem mojej metaanalizy była systematyczna ocena wpływu ekspozycji na LDIR w kontekście śmiertelności oraz progresji chorób sercowo-naczyniowych w populacji ogólnej – odnosząc wyniki do dyskutowanej w tej pracy teorii hormezy radiacyjnej,

zakładającej, że niskie dawki promieniowania jonizującego mogą mieć korzystny efekt biologiczny

**4) Analizę potencjalnych korzyści i mechanizmów odpowiadających za korzystny wpływ niskich dawek promieniowania jonizującego w kontekście pracowników ochrony zdrowia – Publikacja nr 4 (7.4.)**

Celem przeprowadzonego przeglądu była analiza ryzyka i możliwych korzyści zdrowotnych wynikających z ekspozycji zawodowej na LDIR wśród personelu medycznego. Zgromadziliśmy dane dotyczące wpływu LDIR na metylację DNA, stres oksydacyjny oraz odpowiedź immunologiczną takiej ekspozycji.

**5) Sformułowanie aktualnych wniosków i próbę obiektywnej oceny potencjału efektów biologicznych niskich dawek promieniowania jonizującego**

Ostatnim celem było podsumowanie zgromadzonych danych z publikowanych badań oraz własnych wyników eksperymentalnych, w formie wniosków i perspektywicznej roli dalszych badań dla zrozumienia szczegółowego mechanizmu radiobiologicznych LDIR.

## **5. Metodologia**

Przedstawiana praca doktorska integruje wyniki przeglądów systematycznych, metaanaliz oraz badań eksperymentalnych, aby zsyntetyzować kluczowe aspekty promieniowania jonizującego w zakresie niskich dawek (LDIR) oraz jego implikacje. Przegląd koncentruje się na trzech głównych obszarach: wpływie LDIR na układ sercowo-naczyniowy, ekspozycji zawodowej i jej skutkach zdrowotnych oraz terapeutycznych zastosowaniach niskich dawek promieniowania. W pracy badawczej zastosowano systematyczną strategię w celu odkrycia i połączenia istotnych danych, zapewniając kompleksową analizę skutków LDIR w różnych grupach demograficznych i wynikach zdrowotnych, ze szczególnym uwzględnieniem ekspozycji zawodowej, zastosowań w radioterapii onkologicznej oraz zdrowia jak i ryzyka sercowo-naczyniowego.

## **5.1. Strategia gromadzenia danych**

### **5.1.1. Ekspozycja zawodowa na promieniowanie jonizujące**

Aby ocenić ryzyko i potencjalne korzyści związane z niskimi dawkami promieniowania u osób zawodowo narażonych, przeprowadzono szeroko zakrojone wyszukiwanie literatury w renomowanych bazach danych, takich jak Google Scholar, PubMed, Scopus i Embase. Do wyszukiwania artykułów wykorzystano słowa kluczowe: „radiation”, „ionizing radiation”, „medical personnel” oraz „radiation protection”. Wyszukiwano wszystkie artykuły opublikowane w języku angielskim bez ograniczeń czasowych. Uwzględniono badania eksperymentalne i kliniczne dotyczące wyników zdrowotnych związanych z zawodową ekspozycją na LDIR. Wykluczono artykuły, które były w językach innych niż angielski, zawierały niekompletne dane lub nie dotyczyły bezpośrednio zdrowotnych skutków zawodowej ekspozycji na promieniowanie.

### **5.1.2. Napromienianie całego ciała LDIR w leczeniu nowotworów**

Ten aspekt dotyczył zastosowania terapii LDIR całego ciała w leczeniu nowotworów, koncentrując się na ocenie jej skuteczności i bezpieczeństwa. Pierwszym etapem było wyszukiwanie w bazie PubMed, które następnie uzupełniono o dodatkowe wyszukiwania w Google Scholar, Medline oraz Cochrane Library. Użyte słowa kluczowe obejmowały: “low level radiation”, “whole-body radiation”, “radiotherapy”, “cancer treatment”, “cancer therapy”, oraz “low-dose radiation”. Do niniejszej pracy włączono badania koncentrujące się na zastosowaniu ultraniskich dawek promieniowania ( $\leq 0,1-0,2$  Gy na frakcję) w leczeniu nowotworów, szczególnie te, które nie wykazują typowych działań niepożądanych związanych z wysokodawkową RT. Kryteria włączenia opierały się na badaniach oceniających bezpieczeństwo i skuteczność LDIR w terapii onkologicznej.

### **5.1.3. Wpływ LDIR na śmiertelność i progresję chorób sercowo-naczyniowych**

Trzecią i ostatnią analizowaną w niniejszej pracy kwestią był wpływ LDIR na śmiertelność oraz progresję CVD. W celu przeprowadzenia kompleksowego przeglądu literatury dokonano wyszukiwania w bazach PubMed, Web of Science, Scopus oraz

Embase. Użyte słowa kluczowe obejmowały: “low-dose ionizing radiation”, “cardiovascular disease”, “CVD mortality”, “heart disease progression”, “radiation hormesis”, oraz “radiation exposure”. Do niniejszego opracowania uwzględniono wyłącznie artykuły opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych. Uwzględniono badania kohortowe, badania kliniczno-kontrolne oraz badania eksperymentalne dotyczące wpływu LDIR na układ sercowo-naczyniowy w kontekście jego oddziaływania na śmiertelność oraz progresję choroby. Podsumowanie danych z tych badań dostarczyło informacji na temat potencjalnych korzystnych efektów LDIR oraz roli hormezy w zdrowiu układu sercowo-naczyniowego.

## **5.2. Pozyskanie danych**

Zastosowano ustrukturyzowane podejście do systematycznego pozyskiwania danych dotyczących analizowanych zmiennych. W celu zapewnienia spójności i dokładności, proces ekstrakcji opierał się na standardowych metodach, co umożliwiło konsekwentne gromadzenie i kompilowanie danych. Dzięki temu zapewniono, że wszystkie istotne informacje zostały zarejestrowane w sposób umożliwiający uzyskanie wiarygodnych oraz powtarzalnych wyników. Wszystkie dane poddano analizie zarówno z pierwotnych, jak i wtórnych źródeł, aby zminimalizować rozbieżności i zagwarantować ich kompletność.

## **5.3. Ocena jakości i zbieranie danych**

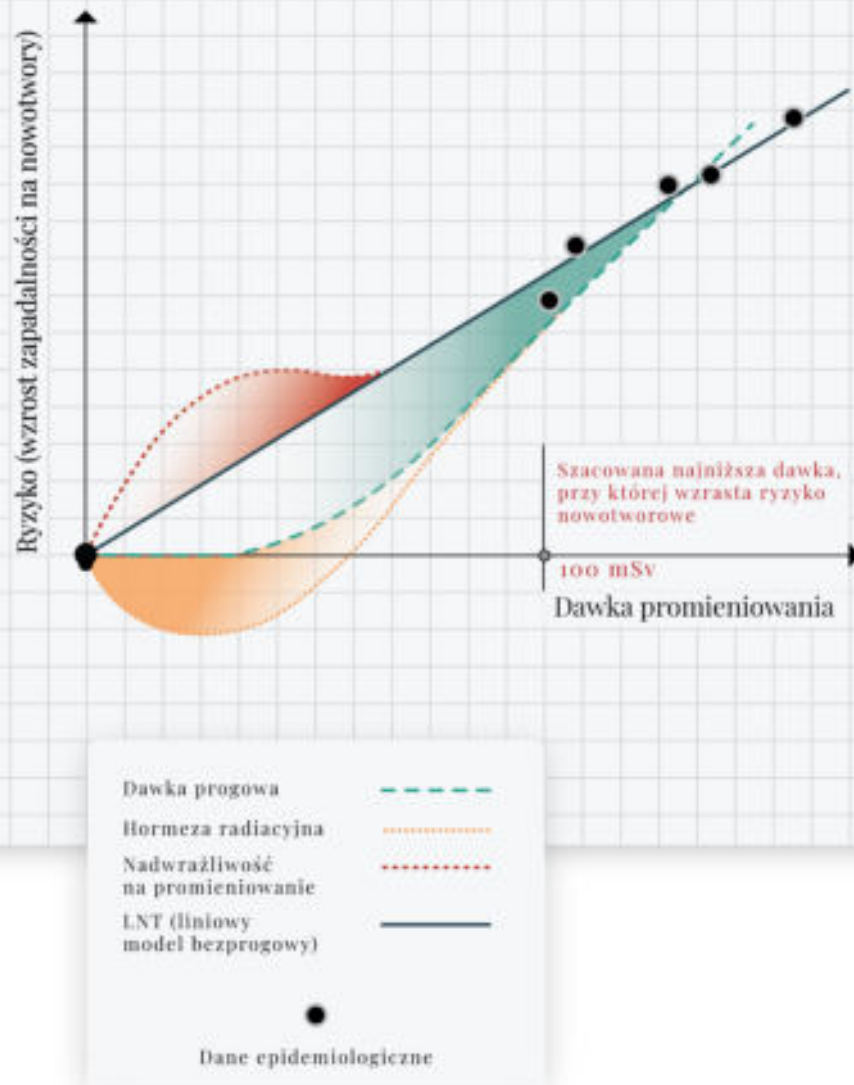
Podstawą niniejszej pracy były oryginalne publikacje naukowe. Aby upewnić się, że spełniono pełen zakres naszych celów, wyeliminowano wszelkie powtarzające się badania. W celu zapewnienia, że abstrakty tych prac spełniają wysokie standardy i odpowiednie kryteria naszych badań, przeprowadzono szczegółową analizę. Następnie oceniono wszystkie publikacje, aby sprawdzić, czy kwalifikują się do uwzględnienia w niniejszej dysertacji doktorskiej. Jakość włączonych badań, szczególnie tych dotyczących dokładności diagnostycznej, oceniano przy użyciu odpowiednich narzędzi. Dodatkowo przeanalizowano potencjalne ryzyko stronniczości oraz problemy z zastosowalnością każdego badania.

## 6. Wyniki

Niskie dawki promieniowania jonizującego są przedmiotem licznych badań, które wskazują na ich szerokie zastosowanie w medycynie. Pomimo istotnych korzyści, szczególnie w diagnostyce obrazowej i terapii, LDIR wiąże się także z szeregiem potencjalnych zagrożeń. Do najważniejszych należą długoterminowe skutki zdrowotne, takie jak zwiększone ryzyko nowotworów, chorób sercowo-naczyniowych oraz zaburzeń immunologicznych.

Chociaż uznaje się korzyści LDIR w rozwoju nauk medycznych, optymalizacja ich stosowania w celu minimalizacji szkód pozostaje skomplikowanym wyzwaniem. Jak przedstawiono na **Rysunku 1.**, skutki zdrowotne ekspozycji na promieniowanie jonizujące są ściśle zależne od dawki: niskie dawki mogą przynosić potencjalne korzyści, podczas gdy wysokie dawki są związane z negatywnymi efektami stochastycznymi i deterministycznym. Wraz z postępem badań coraz większą uwagę poświęca się wpływowi promieniowania na układ sercowo-naczyniowy, podkreślając ryzyko i mechanizmy leżące u podstaw chorób serca wywołanych promieniowaniem jonizującym.

## Zależność skutków zdrowotnych ekspozycji na niskie dawki promieniowania jonizującego w zależności od dawki



**Rysunek 1.** Schemat skutków ekspozycji na promieniowanie jonizujące w zależności od dawki zdrowotnych; teoria hormezy radiacyjnej.

### 6.1. Wpływ promieniowania na częstość występowania chorób sercowo-naczyniowych

Cha i współpracownicy przeprowadzili badanie obejmujące 11 500 pracowników diagnostyki radiologicznej, oceniając ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych

(CVD) wśród osób narażonych na promieniowanie. Badanie wykazało istotny wzrost ryzyka nadciśnienia tętniczego u pracowników, którzy rozpoczęli pracę przed 2000 rokiem, w porównaniu z tymi, którzy zaczęli pracować w 2005 roku lub później. Nadmierne ryzyko względne (ERR) na 100 mGy (ERR/100 mGy) dla całkowitych CVD wyniosło 0,14, z niewielkim wzrostem ryzyka dla chorób mózgowo-naczyniowych i chorób niedokrwiennych serca. ERR było wyższe u kobiet i młodszych pracowników. Badanie dostarczyło ograniczonych dowodów na pozytywny związek między zawodową ekspozycją na promieniowanie a CVD, jednak konieczne jest dalsze monitorowanie podwyższonego ryzyka dla osób narażonych po raz pierwszy oraz ERR u kobiet i młodszych pracowników [43].

Howe i współpracownicy (2004) zauważyli pozytywną, choć statystycznie nieistotną tendencję zachorowań na białaczki oraz nowotwory lite. Znaczący związek zaobserwowano jednak w przypadku miażdżycowej choroby serca, a także wrodzonej choroby serca (CHD), z ERR wynoszącym 8,78 (95% CI: 2,10–20,0) [44].

Ivanov i współpracownicy (2006) stwierdzili znacznie podwyższone ryzyko choroby niedokrwiennej serca ( $\text{ERR Gy}^{-1} = 0,41$ ), nadciśnienia tętniczego ( $\text{ERR Gy}^{-1} = 0,36$ ) oraz chorób mózgowo-naczyniowych ( $\text{ERR Gy}^{-1} = 0,45$ ). Najwyższe ryzyko zaobserwowano u pracowników, którzy otrzymali dawkę powyżej 150 mGy w czasie krótszym niż 6 tygodni [45].

Kreuzer i współpracownicy (2006) nie odnotowali wzrostu śmiertelności z powodu chorób układu krążenia przy skumulowanej ekspozycji na radon, promieniowanie gamma ani kontakt z radionuklidami [46]. Natomiast kolejne badanie Kreuzera i współpracowników (2015) oceniło wskaźnik śmiertelności z powodu CVD wśród niemieckich górników rudy uranu narażonych na niskie poziomy promieniowania jonizującego. Wyniki wskazały na częstsze i bardziej zaawansowane przypadki chorób sercowo-naczyniowych u narażonych pracowników [47].

Korzystając z modelu reakcji-dyfuzji przestrzennej dla miażdżycy, Little i współpracownicy (2009) przeanalizowali mechanizm długoterminowego wpływu frakcjonowanych, niskich dawek promieniowania jonizującego na CVD. Zaproponowany model sugeruje, że długotrwała ekspozycja na niskie dawki promieniowania powoduje wzrost stężenia chemotaktycznego białka MCP-1, co zwiększa ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych [48].

### **6.1.1. Skutki promieniowania na wczesną postać miażdżycy**

Tomei i współpracownicy (1993) przeanalizowali zawodowe narażenie na promieniowanie jonizujące 145 lekarzy. Wykazano istotną korelację pomiędzy narażeniem na promieniowanie a uszkodzeniem mikrokrążenia skórniego. Tylko 20,7% osób narażonych wykazało prawidłowy obraz kapilaroskopii, w porównaniu do 91,5% osób w grupie kontrolnej. Względne ryzyko uszkodzeń kapilaroskopowych wynosiło 0,23, z niewielkimi różnicami zależnymi od płci [49].

Badanie Andreassiego i współpracownicy (2005) analizowali wpływ nisko dawkowego promieniowania jonizującego na śródbłonek oraz ryzyko miażdżycy. Wyniki wykazały, że pracownicy z wysoką ekspozycją mieli wyższe wartości CIMT (grubość kompleksu intima-media tętnicy szyjnej wspólnej) oraz skrócone telomery, co sugeruje przyspieszone starzenie naczyń i wczesny rozwój miażdżycy w porównaniu do grupy z niską ekspozycją [50].

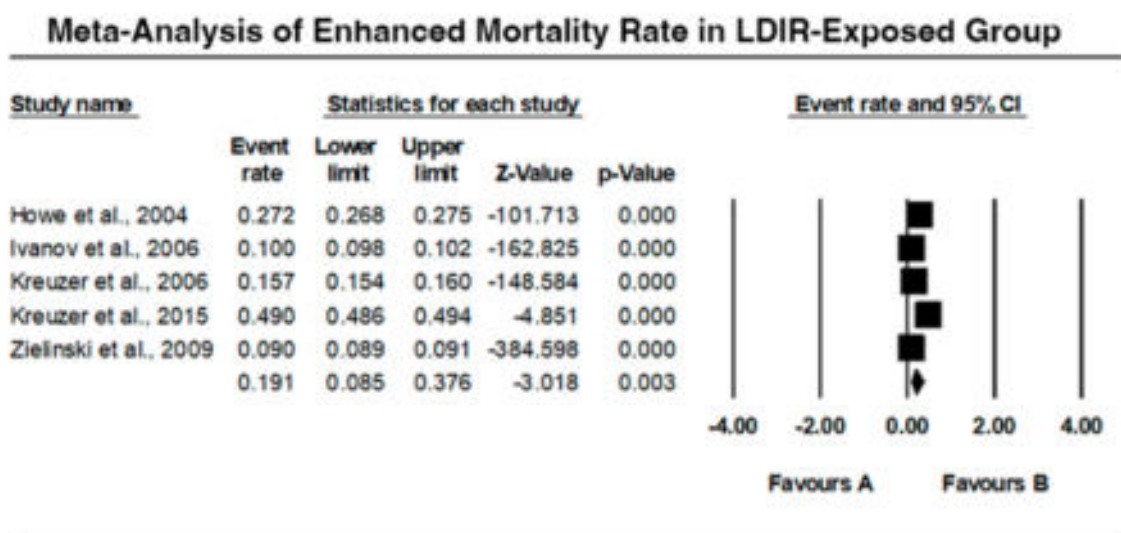
Manenti wraz z współpracownikami (2024) zbadali długoterminowy wpływ niskich dawek promieniowania na ryzyko chorób sercowo-naczyniowych, podkreślając, że choć badania epidemiologiczne mogą być obarczone błędem, dostępne dane są przekonujące. Zasugerowali, że czynniki środowiskowe, styl życia oraz indywidualne czynniki ryzyka mogą zafałszowywać obraz zagrożeń związanych z promieniowaniem, jednak istotność statystyczna pozostaje kluczowa dla dalszego zrozumienia problemu [51].

Zgodnie z badaniem Yan i in. (2014), którzy oceniali długoterminowe skutki sercowo-naczyniowe napromieniania protonami całego ciała oraz napromieniania jonami żelaza myszy, wpływ promieniowania zależał od jego rodzaju; jony żelaza miały szkodliwy wpływ na funkcję serca, podczas gdy promieniowanie protonowe ją poprawiało [52]. Zielinski i in. (2009) podali, że ERR/1 Sv dla śmiertelności z powodu chorób sercowo-naczyniowych wynosiło 1,22 u mężczyzn (90% CI: 0,47–2,10) oraz 7,37 u kobiet (90% CI: 0,95–18,1). Natomiast nadmierne ryzyko bezwzględne (EAR) dla nowotworów litych indukowanych promieniowaniem wynosiło 37,5/1 Sv na 10 000 osobolat (90% CI; średnia w kohorcie: 17,0, SD = 60,1) [53]. Qu i in. (2024) zbadali mechanizmy miażdżycy związane z LDIR, wykazując, że LDIR aktywowało neutrofile i hamowało powstawanie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofili (NETs), co prowadziło do zmniejszenia miażdżycy,

szczególnie w grupie na diecie wysokotłuszczowej [54]. Podobne wnioski wysunąłem w meta-analizie, które przedstawiam poniżej oraz w **Publikacji nr 3 (Rozdział 7.3.)**

### 6.1.2. Współczynnik śmiertelności w grupach narażonych na niskie dawki promieniowania jonizującego

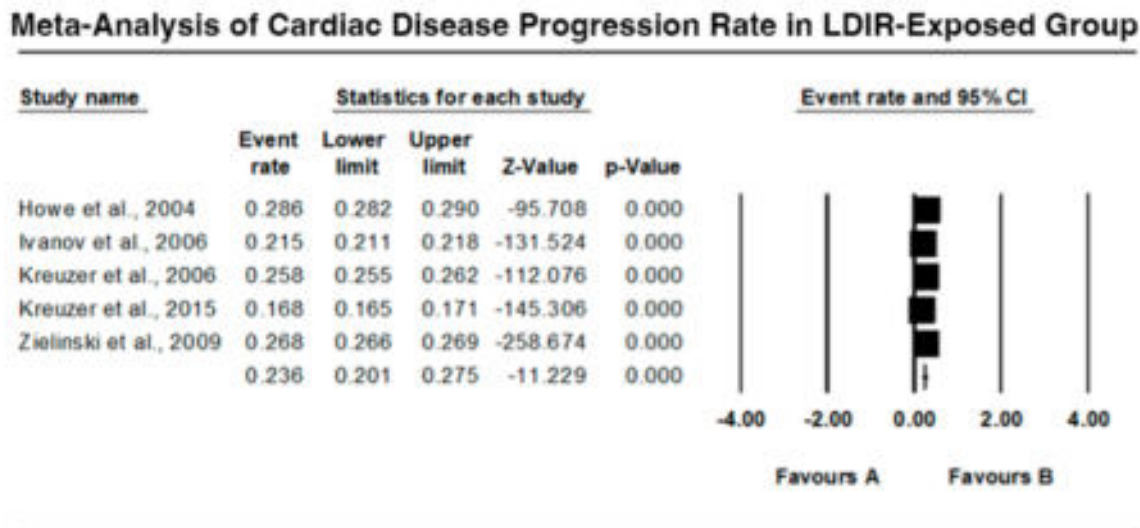
Współczynnik śmiertelności w grupie narażonej na LDIR obejmują pięć badań, przedstawionych na **Rysunku 2**. Howe i in. (2004) [44] odnotowali współczynnik zdarzeń na poziomie 0,272 (95% CI: 0,268–0,275), ze znacznym wzrostem śmiertelności ( $Z = -101,713$ ,  $p < 0,001$ ). Ivanov i in. (2006) [45] wykazali współczynnik zdarzeń wynoszący 0,100 (95% CI: 0,098–0,102), również istotny statystycznie ( $Z = -162,825$ ,  $p < 0,001$ ). Kreuzer i in. (2006) [46] wskazali współczynnik zdarzeń na poziomie 0,157 (95% CI: 0,154–0,160), uzyskując wysoce istotne wyniki ( $Z = -148,584$ ,  $p < 0,001$ ). Kreuzer i in. (2015) [47] zaobserwowali wyższy współczynnik zdarzeń wynoszący 0,490 (95% CI: 0,486–0,494), co wskazuje na istotny wzrost śmiertelności ( $Z = -4,851$ ,  $p < 0,001$ ). Zielinski i in. (2009) [53] odnotowali współczynnik zdarzeń na poziomie 0,191 (95% CI: 0,085–0,376), również wykazując istotny wzrost śmiertelności ( $Z = -3,018$ ,  $p = 0,003$ ). Ogólnie wyniki wskazują na wyraźną i konsekwentną tendencję wzrostu śmiertelności wśród osób narażonych na LDIR. Szczegółowe charakterystyki uwzględnionych badań przedstawiono w **Tabeli 1**.



**Rysunek 2.** Wykres przedstawiający współczynnik śmiertelności wśród osób narażonych na niskie dawki promieniowania jonizującego [44–47, 53].

### 6.1.3. Współczynnik progresji chorób serca w grupie narażonej na niskie dawki promieniowania jonizującego

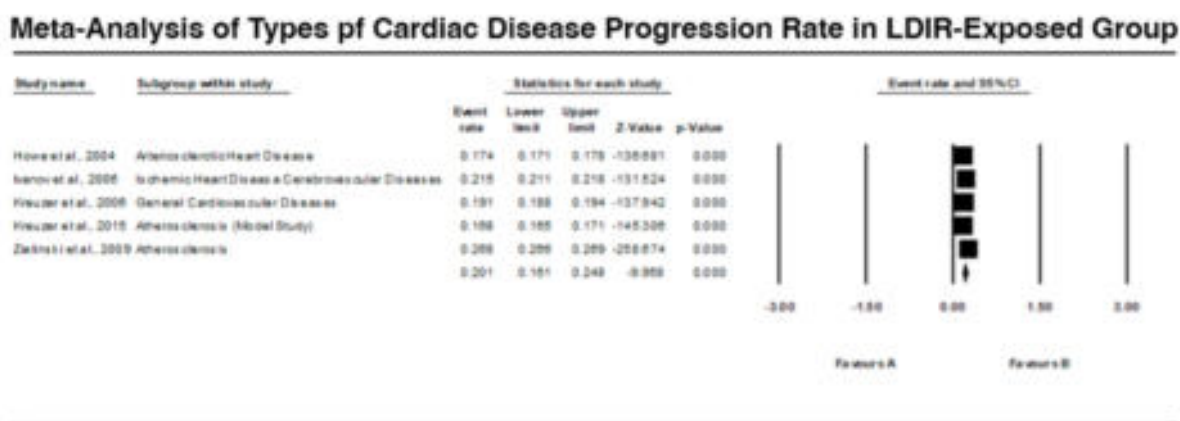
Wyniki dotyczące współczynnika progresji chorób serca w grupie narażonej na LDIR przedstawiono na **Rysunku 3**. Howe i in. (2004) [44] odnotowali współczynnik zachorowalności na poziomie 0,286 (95% CI: 0,282–0,290), wskazujący na istotną progresję choroby ( $Z = -95,708$ ,  $p < 0,001$ ). Ivanov i in. (2006) [45] wykazali statystycznie istotny współczynnik zachorowalności wynoszący 0,215 (95% CI: 0,211–0,218) ( $Z = -131,524$ ,  $p < 0,001$ ). Kreuzer i in. (2006) [46] odnotowali istotną progresję choroby ( $Z = -112,076$ ,  $p < 0,001$ ) przy współczynniku zachorowalności wynoszącym 0,258 (95% CI: 0,255–0,262). Dalsze badania tego zespołu w późniejszych latach wykazały współczynnik zachorowalności wynoszący 0,168 (95% CI: 0,165–0,171) oraz istotne wyniki statystyczne ( $Z = -145,306$ ,  $p < 0,001$ ) [47]. Zielinski i in. (2009) [53] odnotowali istotny wskaźnik progresji choroby ( $Z = -258,674$ ,  $p < 0,001$ ) oraz współczynnik zdarzeń na poziomie 0,268 (95% CI: 0,266–0,269). Łączne wyniki badań wskazują na silną i statystycznie istotną korelację między ekspozycją na LDIR a przyspieszonym rozwojem chorób serca.



**Rysunek 3.** Wykres przedstawiający współczynnik progresji chorób serca wśród osób narażonych na niskie dawki promieniowania jonizującego [44–47, 53].

#### 6.1.4. Wskaźnik progresji różnych chorób serca w grupie narażonej na niskie dawki promieniowania jonizującego

Howe i in. (2004) [44] zidentyfikowali miażdżycową chorobę serca ze współczynnikiem zdarzeń wynoszącym 0,174 (95% CI: 0,171–0,178), uzyskując istotne wyniki ( $Z = -136,681$ ,  $p < 0,001$ ). Ivanov i in. (2006) [45] odnotowali chorobę niedokrwienną serca oraz choroby naczyń mózgowych ze współczynnikiem zdarzeń wynoszącym 0,215 (95% CI: 0,211–0,218), również istotnym statystycznie ( $Z = -131,524$ ,  $p < 0,001$ ). Kreuzer i in. (2006) [46] zaobserwowali ogólne choroby sercowo-naczyniowe ze współczynnikiem zdarzeń na poziomie 0,191 (95% CI: 0,188–0,194), wykazując ich istotny wzrost ( $Z = -137,942$ ,  $p < 0,001$ ). Kreuzer i in. (2015) [47] odnotowali miażdżycę ze współczynnikiem zdarzeń wynoszącym 0,168 (95% CI: 0,165–0,171), również istotnym statystycznie ( $Z = -145,306$ ,  $p < 0,001$ ). Zielinski i in. (2009) [53] wykazali miażdżycę ze współczynnikiem zdarzeń na poziomie 0,268 (95% CI: 0,266–0,269), uzyskując istotne wyniki ( $Z = -258,674$ ,  $p < 0,001$ ). Ogólna analiza wskazuje na związek między ekspozycją na LDIR a różnymi chorobami serca, szczególnie miażdżycą i chorobą niedokrwienną serca. **Rysunek 4** podsumowuje rodzaje chorób serca obserwowanych w grupie narażonej na LDIR.

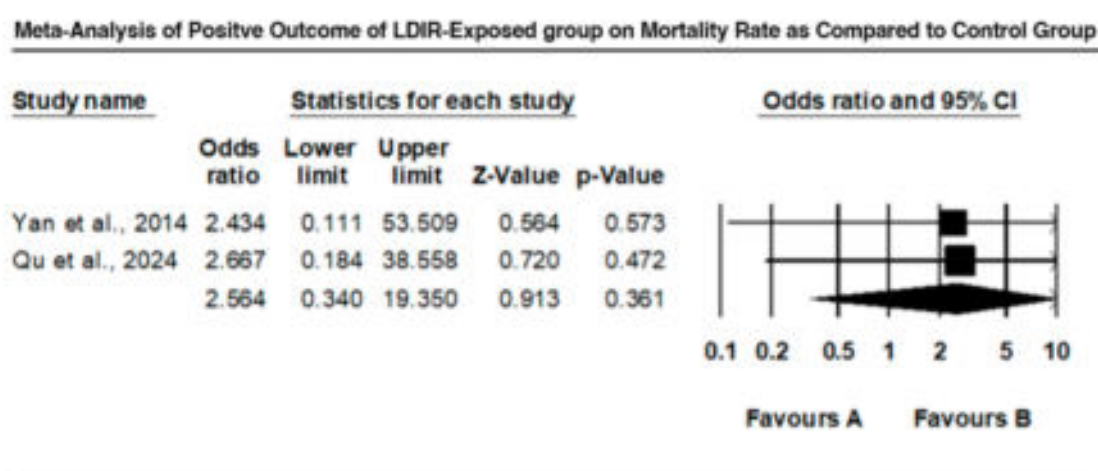


**Rysunek 4.** Wykres przedstawiający wskaźnik progresji chorób serca wśród osób narażonych na niskie dawki promieniowania jonizującego [44–47, 53].

#### 6.1.5. Porównanie wskaźnika śmiertelności w grupie osób narażonych na niskie dawki promieniowania jonizującego a grupą kontrolną

Porównanie wskaźników śmiertelności między grupą narażoną na LDIR a grupą kontrolną, uwzględniające badania wskazujące na pozytywne skutki ekspozycji na LDIR,

przedstawiono na **Rysunku 5**. Yan i in. (2014) [52] odnotowali iloraz szans wynoszący 2,434 (95% CI: 0,111–53,509), sugerując zmniejszoną śmiertelność w grupie LDIR, jednak wynik nie był statystycznie istotny ( $Z = 0,564$ ,  $p = 0,573$ ). Qu i in. (2024) [54] uzyskali iloraz szans równy 2,667 (95% CI: 0,184–38,558), wskazujący na podobną redukcję śmiertelności, lecz również bez istotności statystycznej ( $Z = 0,720$ ,  $p = 0,472$ ). Łączny iloraz szans wynosił 2,564 (95% CI: 0,340–19,350), z wartością  $Z = 0,913$  i  $p = 0,361$ . Wyniki te sugerują tendencję do obniżonej śmiertelności w grupie narażonej na LDIR, jednak szerokie przedziały ufności i brak istotności statystycznej ograniczają jednoznaczną interpretację.

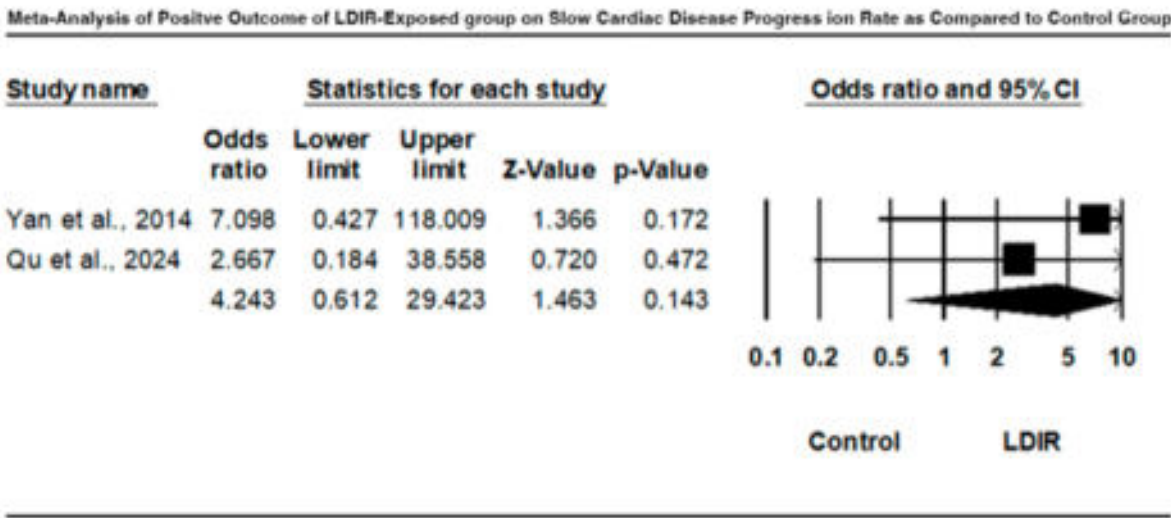


**Rysunek 5.** Wykres porównujący śmiertelność między grupą narażoną na niskie dawki promieniowania jonizującego a grupą kontrolną [52, 54].

#### 6.1.6. Porównanie progresji chorób serca między grupą narażoną na niskie dawki promieniowania jonizującego a grupą kontrolną

Wykres porównujący progresję chorób serca między grupą narażoną na LDIR a grupą kontrolną, przedstawiono na **Rysunku 6**. Yan i in. (2014) [52] odnotowali iloraz szans wynoszący 7,098 (95% CI: 0,427–118,009), sugerując wolniejszą progresję chorób serca w grupie LDIR, jednak wynik nie osiągnął istotności statystycznej ( $Z = 1,366$ ,  $p = 0,172$ ). Podobnie Qu i in. (2024) [54] uzyskali iloraz szans równy 2,667 (95% CI: 0,184–38,558), wskazujący na zmniejszoną progresję choroby, lecz także bez istotności statystycznej ( $Z = 0,720$ ,  $p = 0,472$ ). Łączny iloraz szans wynosił 4,243 (95% CI: 0,612–29,423), z wartością  $Z = 1,463$  i  $p = 0,143$ . Wyniki te sugerują potencjalną tendencję do wolniejszej progresji chorób serca w grupie narażonej na LDIR, jednak brak

istotności statystycznej oraz szerokie przedziały ufności ograniczają jednoznaczną interpretację.



**Rysunek 6.** Wykres porównujący progresję chorób serca między grupą narażoną na niskie dawki promieniowania jonizującego a grupą kontrolną [52, 54].

Badania wykazały zwiększoną śmiertelność oraz przyspieszoną progresję chorób serca u pacjentów narażonych na LDIR. Chociaż niektóre analizy sugerują, że LDIR może obniżać śmiertelność i spowalniać rozwój choroby, są to jedynie obserwacyjne tendencje, które nie osiągnęły istotności statystycznej. Niniejsze badanie podkreśla złożone skutki LDIR dla zdrowia układu sercowo-naczyniowego i wskazuje na potrzebę dalszych badań w celu lepszego zrozumienia jego konsekwencji.

**Tabela 1.** Przegląd wybranych badań dotyczących skutków LDIR na układ sercowo-naczyniowy.

| Nazwa badania                                                                                                                                   | Typ badania       | Cele badania                                                                                                                                            | Ilość badanych | Dawka LDIR                                                | Wpływ na śmiertelność                                                                                                                                                                                    | Wpływ na progresję chorób serca                                                                                                                                                                  | Wyniki                                                                                                                                                                                                                                      | Lit. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Analiza śmiertelności wśród pracowników amerykańskiego przemysłu jądrowego po przewlekłej niskodawkowej ekspozycji na promieniowanie jonizujące | Badanie kohortowe | Analiza wskaźników śmiertelności wśród pracowników amerykańskiego przemysłu jądrowego narażonych przewlekłe na niskie dawki promieniowania jonizującego | 53 698         | Kilka milisiwertów (mSv) rocznie. Dozymetria indywidualna | Pozytywna, lecz statystycznie nieistotna zależność z białaczką i wszystkimi nowotworami litymi. Pozytywna i istotna zależność z miażdżycową chorobą serca, w tym chorobą wieńcową, z ERR wynoszącym 8,78 | Silna pozytywna zależność między dawką promieniowania a liczbą zgonów z powodu miażdżycowej choroby serca, w tym choroby wieńcowej, z ERR wynoszącym 8,78 (95% CI: 2,10–20,0)                    | Śmiertelność niższa w porównaniu z ogólną populacją (efekt zdrowego pracownika). Pozytywna zależność z białaczką i wszystkimi nowotworami litymi oraz silny związek z miażdżycową chorobą serca. Zaleca się dalszą obserwację i analizę     | [44] |
| Ryzyko chorób mózgowo-naczyniowych wywołanych promieniowaniem u likwidatorów awarii w Czarnobylu                                                | Badanie kohortowe | Oszacowanie ryzyka ekspozycji na promieniowanie dla nienowotworowych chorób układu krążenia wśród likwidatorów awarii w Czarnobylu                      | 61 017         | Średnia dawka 0,1 Gy. Dozymetria indywidualna             | Statystycznie istotne ryzyko dla choroby niedokrwiennej serca ( $ERR\ Gy^{-1} = 0,41$ ), nadciśnienia pierwotnego ( $ERR\ Gy^{-1} = 0,36$ ) oraz chorób naczyniowo-mózgowych ( $ERR\ Gy^{-1} = 0,45$ )   | Statystycznie istotna zależność dawka-odpowiedź dla chorób naczyniowo-mózgowych, przy czym najwyższe ryzyko występowało u pracowników, którzy otrzymali >150 mGy w czasie krótszym niż 6 tygodni | Zaobserwowano znaczący wzrost ryzyka choroby niedokrwiennej serca, pierwotnego nadciśnienia tętniczego i chorób naczyń mózgowych. Ryzyko zależy od czasu ekspozycji i dawki, przy czym wysokie dawki dzienne wykazują silniejsze powiązania | [45] |

**Tabela 1.** Przegląd wybranych badań dotyczących skutków LDIR na układ sercowo-naczyniowy c. d.

| Nazwa badania                                                                                                                    | Typ badania       | Cele badania                                                                                                                             | Ilość badanych | Dawka LDIR                                                                                                                                           | Wpływ na śmiertelność                                                                                                                                | Wpływ na progresję chorób serca                                                                                        | Wyniki                                                                                                                                                                                                                                                     | Lit. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Śmiertelność z powodu chorób sercowo-naczyniowych w kohorcie niemieckich górników uranu, 1946–1998                               | Badanie kohortowe | Ocena zwiększenia śmiertelności z powodu chorób sercowo-naczyniowych przy znaczącej ekspozycji na promieniowanie                         | 59 001         | Średnia skumulowana ekspozycja: 241 WLM (ilość miesięcy roboczych) dla radonu, 41 mSv dla zewnętrznego promieniowania gamma. Dozymetria indywidualna | Brak trendu w śmiertelności z powodu chorób układu krążenia wraz ze wzrostem skumulowanej ekspozycji na radon, promieniowanie gamma lub radionuklidy | Nie stwierdzono istotnego związku między narażeniem na promieniowanie a śmiertelnością z powodu chorób serca lub udaru | Badanie nie wykazało związku między śmiertelnością z powodu chorób sercowo-naczyniowych a skumulowaną ekspozycją na promieniowanie. Ograniczone dowody sugerują zwiększone ryzyko chorób układu krążenia w wyniku narażenia na niskie dawki promieniowania | [46] |
| Niskie dawki promieniowania jonizującego a choroby sercowo-naczyniowe – Strategie badań molekularno-epidemiologicznych w Europie | Badanie kohortowe | Ocena śmiertelności z powodu chorób sercowo-naczyniowych wśród populacji zawodowo narażonych na niskie dawki promieniowania jonizującego | 58 972         | Skumulowana ekspozycja na radon, zewnętrzne promieniowanie gamma i długozyciowe radionuklidy. Dozymetria indywidualna i środowiskowa                 | Wyższe wskaźniki śmiertelności z powodu chorób sercowo-naczyniowych u narażonych pracowników                                                         | Nieokreślone, ale sugerowane istotna progresja choroby                                                                 | Zwiększona śmiertelność z powodu chorób sercowo-naczyniowych przy znaczącej ekspozycji na promieniowanie                                                                                                                                                   | [47] |

**Tabela 1.** Przegląd wybranych badań dotyczących skutków LDIR na układ sercowo-naczyniowy c. d.

| Nazwa badania                                                                                                                                      | Typ badania                        | Cele badania                                                                                                                                                                                                       | Ilość badanych                       | Dawka LDIR                                                                           | Wpływ na śmiertelność                                                                                                                                                                                               | Wpływ na progresję chorób serca                                                                                                                                              | Wyniki                                                                                                                                                                                                                               | Lit. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Model chorób sercowo-naczyniowych przedstawiający wiarygodny mechanizm wpływu frakcjonowanej niskodawkowej ekspozycji na promieniowanie jonizujące | Badanie modelowania teoretycznego  | Propozycja modelu reakcyjno-dyfuzyjnego miażdżycy, który dostarcza wiarygodnego mechanizmu wpływu przewlekłej, frakcjonowanej ekspozycji na niskie dawki promieniowania jonizującego na choroby sercowo-naczyniowe | Nie dotyczy (badanie modelowe)       | Frakcjonowane niskie dawki promieniowania jonizującego, dokładna dawka nie określona | Model sugeruje, że przewlekła ekspozycja na niskie dawki promieniowania jonizującego może zwiększać średnie stężenie MCP-1 (białko chemotaktyczne monocytów 1), co może podnosić ryzyko chorób sercowo-naczyniowych | Zwiększony poziom MCP-1 z powodu indukowanej promieniowaniem śmierci monocytów oraz zmniejszonej degradacji MCP-1, co może prowadzić do progresji miażdżycy                  | Predykcja modelu jest zgodna z obserwowanym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych w grupach zawodowo narażonych, co sugeruje, że przewlekła ekspozycja na niskich dawkach może przyczyniać się do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych | [48] |
| Ryzyko sercowo-naczyniowe związane z niskodawkową ekspozycją na promieniowanie jonizujące cząstek                                                  | Badanie eksperymentalne na myszach | Raport dotyczący długoterminowych skutków napromieniania całego ciała protonami i jonami żelaza na zdrowie układu sercowo-naczyniowego u myszy                                                                     | Nie dotyczy (badanie na zwierzętach) | Protony (0.5 Gy, 1 GeV) i jony żelaza (0.15 Gy, 1 GeV/nukleon). Metoda obliczeniowa  | Śmiertelność nie różniła się istotnie między grupą napromienioną a kontrolną                                                                                                                                        | Znaczące zmiany w funkcji serca i przebudowie po napromienowaniu; poprawa funkcji u myszy napromienowanych protonami, ale pogorszenie u myszy napromienowanych jonami żelaza | Wykazano specyficzne skutki sercowo-naczyniowe w zależności od rodzaju promieniowania, co może mieć potencjalne implikacje dla podróży kosmicznych oraz RT                                                                           | [52] |

**Tabela 1.** Przegląd wybranych badań dotyczących skutków LDIR na układ sercowo-naczyniowy c. d.

| Nazwa badania                                                                                                                              | Typ badania                               | Cele badania                                                                                                                                                                    | Ilość badanych                            | Dawka LDIR                                                                     | Wpływ na śmiertelność                                                                                                              | Wpływ na progresję chorób serca                                                                                                         | Wyniki                                                                                                                                                                                                                                      | Lit. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Ekspozycja na niskie dawki promieniowania jonizującego a śmiertelność z powodu chorób sercowo-naczyniowych                                 | Badanie eksperymentalne (model zwierzęcy) | Ocena ryzyka śmiertelności z powodu chorób sercowo-naczyniowych wśród kanadyjskich pracowników narażonych na niskie dawki promieniowania jonizującego                           | 337 397                                   | Średnia dawka: 8,6 mSv (mężczyźni), 1,2 mSv (kobiety). Dozymetria indywidualna | Istotna pozytywna zależność dawka-odpowiedź; wyższe ryzyko niż w innych kohortach zawodowych i u ocalałych z bombardowań atomowych | Zaobserwowano istotną pozytywną zależność dawka-odpowiedź zarówno u mężczyzn, jak i kobiet, z różnymi wartościami ERR dla różnych dawek | Silna pozytywna zależność między dawką promieniowania a śmiertelnością z powodu CVD. Ograniczenia obejmują potencjalne błędy wynikające z niepewności w dozymetrii oraz brak uwzględnienia czynników ryzyka niezwiązanych z promieniowaniem | [53] |
| Efekty naprawcze po ekspozycji na niskie dawki promieniowania: hamowanie miażdżycy poprzez redukcję uwalniania sieci neutrofilowych (NETs) | Badanie eksperymentalne (model zwierzęcy) | Badanie mechanizmów, poprzez które niskie dawki promieniowania mogą przyczyniać się do rozwoju miażdżycy, oraz analiza wpływu takiej ekspozycji na neutrofile i uwalnianie NETs | 40 myszy Apoe-KO (badanie na zwierzętach) | 0,5 Gy promieniowania $\gamma$ na całe ciało LDIR. Metoda obliczeniowa         | Badanie koncentrowało się na mechanizmach, a nie bezpośrednich wskaźnikach śmiertelności                                           | Zaobserwowano znaczące spowolnienie progresji miażdżycy, szczególnie w grupie na diecie wysokotłuszczowej otrzymującej LDIR             | Długotrwała ekspozycja na niskie dawki promieniowania jonizującego stymulowała neutrofile i hamowała ich produkcję NET co prowadziło do zahamowania miażdżycy. Efekt ten był szczególnie wyraźny w grupie na diecie wysokotłuszczowej       | [54] |

## **6.2. Modyfikacje DNA indukowane niskimi dawkami promieniowania jonizującego**

Wpływ promieniowania na zmiany w DNA, szczególnie metylację DNA, stał się ostatnio szeroko dyskutowany, głównie ze względu na możliwy związek z uszkodzeniami oksydacyjnymi. Promieniowanie jonizujące może indukować zmiany w metylacji DNA, jednak skutki niskich dawek pozostają kwestią kontrowersyjną, nawet w środowisku zawodowym. W związku z tą korelacją Chen i współpracownicy [55] w swoim badaniu przeanalizowali możliwy związek między uszkodzeniami oksydacyjnymi wywołanymi promieniowaniem a metylacją DNA. Badaniem objęto 117 lekarzy interwencyjnych oraz 117 osób z grupy kontrolnej, określając globalną metylację DNA w leukocytach krwi obwodowej oraz ekspresję Dnmts (metylotransferazy DNA), Hcy (homocysteina) i markerów uszkodzeń oksydacyjnych, takich jak 8-OHdG (8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna) i 4-HNE (4-hydroksynonenal).

W grupie lekarzy interwencyjnych zaobserwowano wzrost poziomu Dnmts, 4-HNE oraz 8-OHdG w porównaniu z grupą kontrolną. Jednak żadne z tych różnic nie miały wpływu na globalny poziom metylacji DNA ani ekspresję Hcy. Z kolei skumulowana dawka promieniowania była dodatnio skorelowana z poziomami Dnmts, 8-OHdG i 4-HNE, przy czym ekspresja 8-OHdG była negatywnie skorelowana z metylacją DNA, a dodatnio z poziomem Hcy.

Wyniki te sugerują, że ekspozycja zawodowa na promieniowanie może modulować aktywność enzymów związanych z metylacją DNA, prowadząc do oksydacyjnych uszkodzeń materiału genetycznego. Jednak brak jednoznacznych dowodów na bezpośrednią zależność między dawką promieniowania a zmianami w metylacji DNA wskazuje na konieczność dalszych badań w celu rozróżnienia efektów promieniowania od uszkodzeń oksydacyjnych [55].

### **6.3. Wpływ LDIR na mechanizm syntezy białek**

Synteza białek, za którą odpowiedzialny jest mRNA (matrycowy kwas rybonukleinowy), jest procesem silnie regulowanym i energetycznie kosztownym, który jest nierozzerwalnie związany z wieloma szlakami sygnalizacyjnymi. Podczas ekspozycji na stresowy czynnik fizyczny, taki jak promieniowanie jonizujące, synteza białek ulega zmianie, aby sprzyjać translacji mRNA, które ułatwią reakcję fizjologiczną. Niskie dawki promieniowania mogą wywoływać pozytywne efekty, określane jako zjawisko hormezy radiacyjnej, chociaż mechanizmy molekularne tego zjawiska nie są jeszcze w pełni poznane.

Kabilan i współpracownicy badali mechanizmy regulujące różnice w odpowiedzi komórkowej na wysokie dawki i niskie dawki promieniowania jonizującego poprzez modyfikację szlaków molekularnych, głównie poprzez kontrolę translacji mRNA. Odkryli oni, że kontrola translacji utrzymuje równowagę, wspierając tym samym naprawę uszkodzeń, stabilność genomu oraz odpowiedź na stres. Ekspozycja na niskie dawki promieniowania jest również powszechnym zjawiskiem w środowisku i medycynie, a może ona uruchamiać mechanizmy ochronne, przynosząc korzystne efekty biologiczne [56].

Niektóre dowody eksperymentalne sugerujące, że kontrola translacji odgrywa rolę w hormezie radiacyjnej, obejmują m.in. fakt, że zablokowanie syntezy nowych białek zakłóca efekt hormezy, badania nad promieniowaniem o wysokich dawkach wskazują na udział translacji, a także obecność czynników molekularnych nakładających się na szlaki sygnalizacji uszkodzeń DNA oraz rolę pierwotnego mechanizmu translacyjnego w ekspresji hormezy radiacyjnej. Podobnie, badania sugerują, że mutacje szlaków takich jak ATM (kinaza białkowa serynowo - treoninowa), MAPK (kinaza białkowa aktywowana mitogenami), p53 (białko supresorowe p53) i ROS (reaktywne formy tlenu) są istotnie zaangażowane w hormezę wywołaną niskimi dawkami promieniowania jonizującego, odpowiedzi adaptacyjne oraz radiooporność. Ich odkrycia wskazują również, że różne szlaki transdukcji sygnału regulują różne aspekty odpowiedzi komórkowej na niskie dawki promieniowania, a także sugerują udział białka p53 w zjawisku hormezy, niestabilności genomu, radiooporności i odpowiedziach adaptacyjnych. Wskazuje to na złożoność procesu i konieczność ostrożnego podejścia do opracowywania interwencji terapeutycznych opartych na niskich dawkach promieniowania [57].

W związku z tym tematem Mousavikia i współpracownicy przeanalizowali grupę 20 pracowników narażonych na niskie dawki promieniowania jonizującego podczas tomografii komputerowej i angiografii, porównując ich do grupy kontrolnej. Badanie oceniało późne skutki promieniowania u personelu medycznego. Określono częstość występowania MN (mikrojąder) oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak SOD (dysmutaza nadtlenkowa), TAC (całkowita pojemność antyoksydacyjna) i CAT (katalaza). Napromieniowanie *in vitro* zastosowano do testowania adaptacji do wysokich dawek, porównując częstość występowania MN między grupami. Wyniki wykazały znaczący wzrost częstości występowania MN w grupie zawodowo narażonej ( $n = 30$ ) w porównaniu z grupą kontrolną ( $p < 0,0001$ ). Przewlekła ekspozycja nie wywołała adaptacyjnej odpowiedzi „S” - jest to rodzaj odporności indukowanej, w której komórki po wcześniejszej ekspozycji na łagodne dawki czynnika stresowego (np. promieniowania, toksyn) stają się bardziej odporne na późniejsze, silniejsze dawki tego samego czynnika. Podczas gdy ostre niskie dawki promieniowania wywołały pewną odpowiedź ( $p < 0,05$ ), poziomy aktywności enzymów antyoksydacyjnych nie różniły się istotnie między pracownikami medycznymi a grupą kontrolną ( $p > 0,05$ ) [58].

#### **6.4. Wpływ niskich dawek promieniowania jonizującego na aktywność układu immunologicznego wśród radiologów**

Badanie przeprowadzone przez Wanga i współpracowników analizowało wpływ promieniowania na regulację układu immunologicznego w grupie lekarzy radiologów. Naukowcy badali ekspresję białek TIM-3 (T-komórkowe białko błonowe 3) i CTLA-4 (cytotoksyczne białko 4 związane z limfocytami T) w limfocytach T krwi obwodowej radiologów. W badaniu wzięło udział 100 radiologów oraz 107 zdrowych mężczyzn w grupie kontrolnej. Do oceny ekspresji tych białek w komórkach CD4<sup>+</sup> (kompleks 4 różnicowania) i CD8<sup>+</sup> (kompleks 8 różnicowania) zastosowano cytometrię przepływową. Wyniki wykazały, że limfocyty T CD4<sup>+</sup> u osób narażonych na promieniowanie miały niższą ekspresję CTLA-4 i TIM-3 w porównaniu do zdrowych osób z grupy kontrolnej. Stwierdzono pozytywną korelację między poziomem ekspresji CD8+CTLA-4 a indywidualną skumulowaną dawką promieniowania, natomiast ekspresja CD8+TIM-3 wykazywała tendencję odwrotną.

Dane sugerują, że ekspresja TIM-3 i CTLA-4 w ludzkich limfocytach T krwi obwodowej jest modulowana przez niskie dawki promieniowania. Przyszłe badania powinny skupić się na zrozumieniu mechanizmów odpowiedzialnych za te zmiany [59].

## **6.5. Potencjalne korzyści niskich dawek promieniowania jonizującego**

Stosowanie LDIR wiązano z różnymi korzyściami zdrowotnymi, takimi jak redukcja ryzyka nowotworów, zmniejszenie śmiertelności nowotworowej, poprawa funkcji układu nerwowego oraz ograniczenie powikłań cukrzycy. Jednak dostępne dane dotyczące biomarkerów epidemiologicznej ekspozycji na LDIR są ograniczone, co wskazuje na potrzebę dalszych badań nad jego korzystnym wpływem na choroby przewlekłe, takie jak nowotwory, cukrzyca i demencja.

Mechanizmy odpowiedzi organizmu na LDIR mogą stanowić podstawę do opracowania terapii wykorzystujących niskie dawki promieniowania w celu zahamowania progresji chorób. Modulacja szlaków sygnałowych aktywowanych przez ekspozycję na LDIR może przynieść potencjalne korzyści, w tym zwiększenie odporności na promieniowanie. Konieczne są dalsze badania kliniczne wspierane danymi biochemicznymi, komórkowymi i molekularnymi oraz analiza możliwych skutków ubocznych związanych z ekspozycją na LDIR. Jednym z fenomenów związanych z niskimi dawkami promieniowania jonizującego jest hormeza radiacyjna, czyli występowanie korzystnych efektów w odpowiedzi na łagodny stres wynikający z ekspozycji na szkodliwe czynniki w niskich dawkach. Bezpośrednia ekspozycja na wysokie dawki bez wcześniejszych przygotowań jest niepożądana. Chociaż nie wszystkie dotychczasowe badania spełniają rygorystyczne kryteria naukowe, ich wyniki mogą wskazywać przyszłe możliwości wykorzystania LDIR w medycynie, szczególnie w celach terapeutycznych. Zjawisko hormezy stosuje się w takich dziedzinach jak toksykologia, medycyna, farmacja oraz będąca tematem tej pracy radiobiologia [40, 60].

### **6.5.1. Terapeutyczny efekt hormetyczny niskich dawek promieniowania jonizującego**

Wiele badań potwierdza hormetyczne efekty LDIR, w tym wydłużenie długości życia, zmniejszenie przerzutów nowotworowych, łagodzenie objawów raka jajnika oraz redukcję śmiertelności nowotworowej [61-68]. LDIR wykazuje również korzystny wpływ

na choroby o podłożu neurologicznym [69, 70], cukrzycę typu 2 [71] oraz ciężkie przypadki COVID-19 [72].

Badania przedkliniczne wykazują, że mechanizmy molekularne i komórkowe związane z hormezą indukowaną przez LDIR obejmują aktywację szlaków ochronnych przeciwdziałających uszkodzeniom molekularnym. Mechanizmy te obejmują:

- Syntezę mikroRNA, regulację ekspresji genów oraz modyfikacje epigenetyczne poprzez szlaki sygnałowe MEK-ERK1/2 (kinaza białkowa aktywowana mitogenami / kinaza regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi 1/2), MSK1 (kinaza białkowa 1 aktywowana mitogenami i stresem) i Elk-1 (kinaza podobna do ETS-1) [76].
- Zwiększoną naprawę DNA oraz podwyższoną aktywność antyoksydacyjną poprzez szlaki sygnałowe Nrf2 (czynn timer jądrowy 2 związany z czynn timer erytroidalnym 2), a także aktywację autofagii, odgrywającą kluczową rolę w minimalizowaniu uszkodzeń komórkowych [77, 78].
- Indukcję neurotroficzn timer czynników, które wspomagają wzrost i przeżycie neuronów, angiogenezę, wzrost aksonów oraz neuroregenerację [73].
- Korzyści metaboliczne, takie jak poprawa profilu lipidowego i zwiększenie wrażliwości na insulinę [79].

Badania sugerują, że LDIR może mieć zastosowanie w leczeniu różnych chorób, jednak konieczne są dalsze badania w celu zweryfikowania timer wyników. Wykazano, że ekspozycja na promieniowanie  $\gamma$  (gamma) w warunkach *in vitro* prowadzi do 40% hemolizy erytrocytów, co wskazuje na wzrost odporności na stres oksydacyjny. Proces ten wpływa głównie na syntezę i metabolizm glutationu, podkreślając znaczenie tego mechanizmu w ochronie komórek. Adaptacje i zmiany biochemiczne wywołane ekspozycją na promieniowanie  $\gamma$  mogłoby zostać uwzględnione w przeglądzie wytyczn timer dotyczących ochrony radiologicznej osób zawodowo narażonych na promieniowanie [80].

Z uwagi na przesłanki co do ochronnego efektu LDIR oraz jego wpływ na zjawisko hormezy radiacyjnej, warto przeanalizować zastosowanie promieniowania w terapiach nowotworowych co też staraliśmy się zrobić w **Publikacji nr 1 (7.1.)**. Całkowite napromienianie ciała promieniami X (TBI) stanowi przykład zarówno potencjału, jak

i możliwych powikłań związanych z wykorzystaniem promieniowania w walce z nowotworami.

## **6.6. Perspektywa historyczna i zastosowanie terapeutyczne TB-LDIR**

Pomysł zastosowania TBI (napromienianie całego ciała) za pomocą promieniowania rentgenowskiego pojawił się w pierwszych dekadach XX wieku. Wkrótce po odkryciu promieni X przez Roentgena skłonność wielu nowotworów do przerzutów doprowadziła już w 1905 roku do koncepcji TBI. W tym samym roku w Niemczech opracowano konfigurację składającą się z trzech niskonapięciowych lamp rentgenowskich rozmieszczonych wokół pomieszczenia w celu uzyskania jednorodnego napromienienia pacjenta umieszczonego centralnie. Procedura ta została później zastosowana przez Friedricha Dessauera w leczeniu pacjentów [81]. Mimo że początkowe testy kliniczne wydawały się obiecujące, entuzjazm osłabł z powodu zaobserwowanego zahamowania układu krwiotwórczego.

Na początku lat 20. XX wieku Chaoul i Lange w Berlinie opisali skutki teleroentgenoterapii w zaawansowanej chorobie Hodgkina. Spośród dwunastu leczonych pacjentów wszyscy odzyskali pełną zdolność do pracy, a u dziesięciu nie stwierdzono nawrotu choroby przez średnio 2,5 roku [75]. Do połowy lat 20. Werner Teschendorf stosował pojedynczą lampę rentgenowską do leczenia białaczki, chłoniaków oraz nadkrwistości, dostarczając dawkę 200–250 R (około 2–2,5 Gy) na całe ciało. Teschendorf zaobserwował dłuższe okresy remisji w porównaniu do konwencjonalnych terapii miejscowych [82].

## **6.7. Początkowe badania i wyniki zastosowania LDIR**

### **6.7.1. Wczesne osiągnięcia w zakresie radioterapii niskimi dawkami w leczeniu nowotworów hematologicznych**

Na przełomie lat 20. i 30. XX wieku Schwartz donosił o „doskonałych wynikach” w leczeniu wolno postępującej choroby Hodgkina za pomocą ośmiu do dziesięciu ekspozycji na niską dawkę promieniowania rentgenowskiego w ciągu 14 dni [83]. W tym samym okresie Frimann-Dahl i Forsberg napromieniali pacjentów z białaczką

przerywanymi dawkami TBI wynoszącymi od 0,75 do 6 Gy dziennie przez okres od czterech dni do pięciu tygodni. Doszli do wniosku, że TBI było skuteczniejsze niż terapia miejscowa, ponieważ pozwalało pacjentom dłużej zachować zdolność do pracy [84]. Te obiecujące wyniki zainspirowały zastosowanie częściowego i całkowitego napromieniania ciała promieniami rentgenowskimi w całej Europie, m.in. w Norwegii, Francji, Austrii, Belgii i Włoszech, w leczeniu różnych nowotworów hematologicznych [85-87].

#### **6.7.2. Rozwój badań nad TB-LDIR – pierwsze przełomowe wyniki**

W Stanach Zjednoczonych systematyczne badania kliniczne dotyczące TB-LDIR rozpoczęły się na początku lat 30. XX wieku pod kierownictwem Arthura C. Heubleina w Memorial Hospital w Nowym Jorku. Pacjenci z chłoniakami, białaczkami oraz rozszanymi nowotworami litymi byli umieszczani w specjalnie skonstruowanym, osłonnym pomieszczeniu do RT i poddawani napromienianiu za pomocą lampy rentgenowskiej Coolidge'a (wolframowe włókno katody). Dawki promieniowania X wynosiły od 0,01 Gy/h w przypadku napromieniania ciągłego, do 0,3 Gy/h w przypadku sesji przerywanych, przy czym całkowite dawki wynosiły odpowiednio około 0,4–1,9 Gy oraz 7,5–10 Gy [88].

Heublein odnotował znaczną regresję w przypadkach nowotworów wrażliwych na promieniowanie, zarówno hematologicznych, jak i litych, bez istotnego zahamowania liczby białych krwinek po dawkach do 7,5 Gy. Choć wstępne wyniki tych badań były obiecujące, dalsze prace zostały przerwane po przedwczesnej śmierci Heubleina, co zakończyło jego wsparcie dla tej metody leczenia.

Jednak inni badacze kontynuowali ocenę TB-LDIR, przeprowadzając badania na większej liczbie pacjentów. Według wyników jednego z takich badań, przeprowadzonego w latach 1931–1933 na 270 pacjentach z chorobami limfoproliferacyjnymi, osoby, które otrzymały od 0,5 do 0,75 Gy napromieniania całego ciała (metodą Heubleina) bezpośrednio po zakończeniu miejscowej RT promieniami rentgenowskimi, żyły dłużej i miały dłuższe okresy remisji niż pacjenci poddani jedynie radioterapii miejscowej [89].

### 6.7.3. Badania długoterminowe efektów TB-LDIR

Osgood i jego zespół leczyli 163 pacjentów chorych na przewlekłą białaczkę granulocytową i limfocytową między styczniem 1941 a lipcem 1951 roku, stosując frakcjonowane TB-LDIR na dwa sposoby: niektórzy pacjenci otrzymywali wielokrotne „rozproszone” naświetlania (rozłożone na całe ciało) z zewnętrznego źródła promieniowania rentgenowskiego w dawkach 0,1–0,2 Gy na ekspozycję, podczas gdy inni otrzymywali równe dawki wewnętrznego promieniowania poprzez dożylną iniekcję radioaktywnego izotopu fosforu-32 [ $^{32}\text{P}$ ]. Według badaczy przeżywalność pacjentów leczonych TB-LDIR w obu grupach była znacząco lepsza niż w grupie obejmującej wszystkie przypadki leczenia promieniowaniem opisane w literaturze od 1925 do 1951 roku. Co ciekawe, nie zaobserwowano wyraźnej różnicy w reakcji klinicznej między wewnętrznym narażeniem na izotop  $^{32}\text{P}$  a zewnętrzną ekspozycją na promieniowanie rentgenowskie [90].

Między 1943 a 1969 rokiem Juan Angel del Regato i jego współpracownicy leczyli 61 pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową niskimi dziennymi dawkami promieniowania rentgenowskiego całego ciała w Columbia Ellis Fischel Cancer Hospital, w stanie Missouri, a później w Penrose Cancer Hospital w Colorado Springs. W razie potrzeby leczenie uzupełniano naświetlaniem obszarowym śledziony lub węzłów chłonnych. Wcześniej, pod koniec lat 30., del Regato prowadził podobne badania w Warwick Cancer Clinic w Waszyngtonie, jednak wyniki nie zostały opublikowane z powodu utraty dokumentacji pacjentów. Wyniki z lat 1943–1969, przedstawione przez del Regato w jego wykładzie Janeway w 1973 roku, wykazały, że skumulowana ekspozycja na promieniowanie rentgenowskie na poziomie 11–28 Gy wydłużyła średni czas przeżycia pacjentów do 46 miesięcy, przy maksymalnym przeżyciu wynoszącym 15 lat i 5-letnim wskaźniku przeżycia na poziomie 21%. Co istotne, u pacjentów poddanych długotrwałemu TB-LDIR szpik kostny wykazywał względnie zdrowy wygląd poza naciekami białaczkowymi [91].

W latach 60. w USA rozpoczęto kilka programów klinicznych wykorzystujących TB-LDIR. Jednym z kluczowych przedsięwzięć był program w City of Hope Medical Center w Duarte w Kalifornii, gdzie zastosowano specjalnie zaprojektowaną komorę do napromieniania rentgenowskiego całego ciała. Ponad 50 pacjentów z ostrą i przewlekłą białaczką, chłoniakiem, czerwienicą prawdziwą i zaawansowanymi nowotworami litymi

poddano leczeniu dawkami w zakresie od 0,05 do 8 Gy. Wśród nich pacjenci z przewlekłą białaczką, leczeni pojedynczymi lub frakcjonowanymi dawkami 0,1–1 Gy, wykazali znacząco wydłużone przeżycie, co potwierdziło skuteczność TBI jako metody wspomagającej terapię.

Co ważne, nie zaobserwowano poważnych powikłań programu leczenia przy dawkach  $\geq 0,4$  Gy, z wyjątkiem nudności lub wymiotów w trakcie lub bezpośrednio po napromienianiu. Jacobs i Marasso doszli do wniosku, że TB-LDIR ma pewną użyteczność i zapowiedzieli kontynuację badań [92]. Podstawą ich wniosków były wyniki oraz równoległe doświadczenia badaczy z Działu Medycznego Oak Ridge Institute of Nuclear Studies, którzy zaobserwowali regresję limfadenopatii i zmniejszenie wielkości śledziony u pacjentów z NHL (chłoniak nieziarniczy) i przewlekłą białaczką limfocytową po pojedynczym napromienianiu całego ciała promieniowaniem  $\gamma$  w dawkach 0,5–1,0 Gy [93].

W latach 1961–1979 w NEORAD (Northeast Ohio Conjoint Radiation Centre) w Hartville, Ohio, ponad 90 pacjentów z różnymi nowotworami litymi i hematologicznymi poddano frakcjonowanemu TB-LDIR (0,1 Gy dziennie do sumarycznej dawki 1–5 Gy) lub STBI (subtotalnemu napromienianiu ciała); 0,5 Gy dziennie do sumarycznej dawki 1–40 Gy). Wyniki były obiecujące: wielu pacjentów z przewlekłą białaczką, szpiczakiem, chłoniakiem nieziarniczym i ziarnicą złośliwą, a także nasieniakiem, doświadczyło długotrwałych remisji (do 17 lat lub trwałych). „STBI i TBI są użytecznymi metodami terapeutycznymi dla wielu z tych nowotworów” – stwierdził Kenneth Loeffler, autor przeglądu tych badań [94].

RRTI (Rotterdamisch Radio-Therapeutisch Instituut) w Rotterdamie, Holandia, rozpoczął szeroko zakrojone badania nad TB-LDIR na początku lat 70. [95]. Wstępne wyniki u pacjentów z uogólnioną limfadenopatią w stadium III i IV NHL sugerowały, że frakcjonowane całkowite napromienianie ciała może być bezpiecznie stosowane w leczeniu chłoniaka limfocytowego, i że może to być preferowana metoda pierwszego rzutu w leczeniu pacjentów z chłoniakiem limfocytowym [95, 96].

W latach 1973–1979 w RRTI leczono 68 pacjentów z NHL niskiego do wysokiego stopnia zaawansowania, uzyskując bardzo obiecujące wyniki. Pełne remisje wystąpiły u 84% pacjentów z NHL niskiego stopnia, 42% ze średniego stopnia i 40% z wysokiego stopnia. Co istotne, odsetek remisji był wyższy u pacjentów, którzy otrzymali TBI jako

leczenie początkowe, niż u tych, którzy wcześniej przeszli CT (chemioterapię) lub standardową RT [97].

W 1975 roku na Uniwersytecie w Utrechcie w Holandii rozpoczęto badanie obejmujące 30 pacjentów z NHL w stadium III i IV, którzy otrzymywali TB-LDIR promieniami rentgenowskimi w dawce 0,1 Gy trzy razy w tygodniu, aż do osiągnięcia sumarycznej dawki 3,0 Gy. Wśród 19 pacjentów bez wcześniejszych terapii pełne remisje zaobserwowano u 77% pacjentów bez białaczki i 53% pacjentów wcześniej leczonych [98].

Równocześnie, w latach 1973–1977, 37 pacjentów z zaawansowanym chłoniakiem nieziarniczym (NHL), w tym 24, którzy nie otrzymali wcześniej żadnej terapii, było leczonych TBI w Royal Marsden Hospital w Sutton, Surrey, Wielka Brytania. Pacjenci przeszli 10 sesji niskodawkowego TBI w ciągu 12 dni (TBI) lub 5 tygodni (przedłużone TBI). Alternatywnie, niektórzy pacjenci otrzymali napromienianie połowy ciała (HBI), w którym najpierw naświetlano jedną połowę ciała, a następnie drugą po 6–8 tygodniach. Ogólny wskaźnik odpowiedzi wynosił 80% u pacjentów z rozlanym NHL i 73% u pacjentów z chłoniakiem guzkowym, przy czasie trwania pełnej remisji od 2 do 41 miesięcy (mediana 12 miesięcy). HBI okazało się najskuteczniejszą i najmniej mielosupresyjną metodą. Autorzy podkreślili, że choć wskaźniki odpowiedzi były porównywalne z uzyskiwanymi cyklami CT, HBI nie wiązało się z poważną toksycznością [99].

Badanie przeprowadzone przez EORTC (Europejską Organizację Badań i Leczenia Raka) porównało skutki TB-LDIR z wielolekową CT w połączeniu z miejscową RT u ponad 90 pacjentów z NHL w stadium III lub IV. Autorzy doszli do wniosku, że leczenie NHL z użyciem modulatorów odpowiedzi immunologicznej, takich jak interferon  $\alpha 2$ , może być korzystne [100].

Roncadin i współpracownicy stosowali umiarkowane dawki promieniowania, dostarczane przez liniowy akcelerator o energii 6 MV, w leczeniu 40 pacjentów z CCL (przewlekłą białaczką limfocytową) w stadium I–IV oraz 41 pacjentów z NHL o niskim stopniu złośliwości w stadium III–IV w Centrum Onkologii w Aviano, między styczniem 1984 a wrześniem 1992 roku. Ogólny wskaźnik odpowiedzi wynosił 85% w CLL, 91% u pacjentów powyżej 65. roku życia, 78% u pacjentów poniżej 65. roku życia i 83% w NHL [101].

Na podstawie wcześniejszych badań wykazujących 83% wskaźnik odpowiedzi u ponad 100 pacjentów z chłoniakiem o niskim stopniu złośliwości w stadium III–IV, leczonych TB-LDIR, Pierre Richaud i jego zespół przeprowadzili podobne badanie we Francji w latach 1986–1994. Wśród 26 wcześniej nieleczonych pacjentów z grudkowym NHL o niskim stopniu złośliwości w stadium III–IV pełną remisję uzyskano w 92% przypadków [102].

W Afryce Peter Jacobs i Helen S. King z Uniwersytetu w Kapsztadzie prowadzili badania kliniczne w latach 80. XX wieku. Losowo przydzielili 108 pacjentów z indolentnymi chorobami limfoproliferacyjnymi, w tym CLL i chłoniakami w stadium III–IV, do leczenia albo TB-LDIR z użyciem promieniowania  $\gamma$ , albo schematem dwulekowym CT. Obie metody przyniosły podobne wyniki pod względem wskaźnika pełnej remisji (59% dla CT vs. 52% dla TB-LDIR) oraz mediany przeżycia (53 miesiące vs. 57 miesięcy). Jednak TB-LDIR miało istotne zalety – zapewniało szybszą regresję powierzchownych powiększonych węzłów chłonnych, wymagało rzadszego monitorowania morfologii krwi i eliminowało problemy z przestrzeganiem schematu leczenia [103]. Wydaje się, że szerszym badaniom TB-LDIR położyła kres jednoczesna rewolucja w zakresie farmakoterapii onkologicznej, która zaczęła się intensywnie zmieniać od przełomu XXI wieku. Komplementarne leczenie nowoczesną farmakoterapią onkologiczną uzupełnioną o TB-LDIR może jednak nadal rodzić istotne nadzieję na optymalizację terapii.

#### **6.7.4. Rozszerzenie zastosowania TB-LDIR w praktyce klinicznej**

##### ***6.7.4.1. Potencjał terapeutyczny TB-LDIR w przypadku chłoniaka nieziarniczego o wysokim stopniu złośliwości***

Ze względu na niezadowalające wyniki standardowego schematu chemioterapii CHOP (cyklofosamid, hydrosydoksorubicyna, winkrystyna/onkwin i prednizon) w leczeniu NHL oraz wcześniejsze obiecujące wyniki łączące CHOP z TBI [104, 105], Safwat i współpracownicy z Narodowego Instytutu Onkologii Uniwersytetu Kairskiego przeprowadzili badania nad potencjałem terapeutycznym TB-LDIR jako leczenia uzupełniającego.

W okresie od września 1999 r. do września 2001 r. 36 pacjentów z NHL o wysokim stopniu złośliwości, którzy osiągnęli całkowitą remisję po kilku cyklach CHOP, przeszło

dwa kursy TB-LDIR z dwutygodniową przerwą. Trzyletni wskaźnik przeżycia wolnego od choroby wyniósł  $61 \pm 9\%$ , a całkowity wskaźnik przeżycia  $87 \pm 6\%$ . Autorzy stwierdzili, że uzupełniające TB-LDIR jest „realną, nietoksyczną metodą leczenia, wartą przetestowania w przyszłym badaniu fazy III” [106].

#### **6.7.4.2. Analiza retrospektywna TB-LDIR w nawrotowym i opornym na leczenie chłoniaku nieziarniczym**

Bardziej obszerna retrospektywna analiza pacjentów leczonych tym samym schematem TB-LDIR na Uniwersytecie Kairskim w latach 1997–2006 została później przedstawiona przez Yassera Bayoumiego i Aidę Radwan. Badanie to obejmowało 58 pacjentów z nawrotowym lub opornym na leczenie NHL o niskim stopniu złośliwości, z których większość (45) przeszła  $\geq 3$  cykle CT, a w złym stanie ogólnym było 40 z nich. Ogólny wskaźnik odpowiedzi wyniósł 69%, w tym odpowiedzi całkowite u 24% pacjentów i odpowiedzi częściowe u 45%. Mediana przeżycia wolnego od progresji wyniosła 14 miesięcy, a mediana całkowitego przeżycia 39 miesięcy. Badacze doszli do wniosku, że TB-LDIR jest realną, skuteczną i dobrze tolerowaną metodą leczenia, która zasługuje na dalsze badania w połączeniu z CT oraz terapiami celowanymi z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych [107].

#### **6.7.4.3. Badania kliniczne TB-LDIR w zaawansowanych nowotworach z przerzutami**

Profesor Kiyohiko Sakamoto wraz ze swoim zespołem z Uniwersytetu Tohoku w Japonii przeprowadził pierwsze badania kliniczne na dwojgu pacjentów z zaawansowanymi nowotworami w stadium przerzutów – jednym z rakiem jelita grubego i druga z rakiem jajnika. Po chirurgicznym usunięciu guzów zastosowano miejscową konwencjonalną RT, a następnie wielokrotne niskodawkowe napromienianie całego ciała lub jego połowy promieniami rentgenowskimi. U obojga pacjentów zaobserwowano poprawę ogólnego stanu zdrowia przez kilka miesięcy, a progresja choroby została zahamowana.

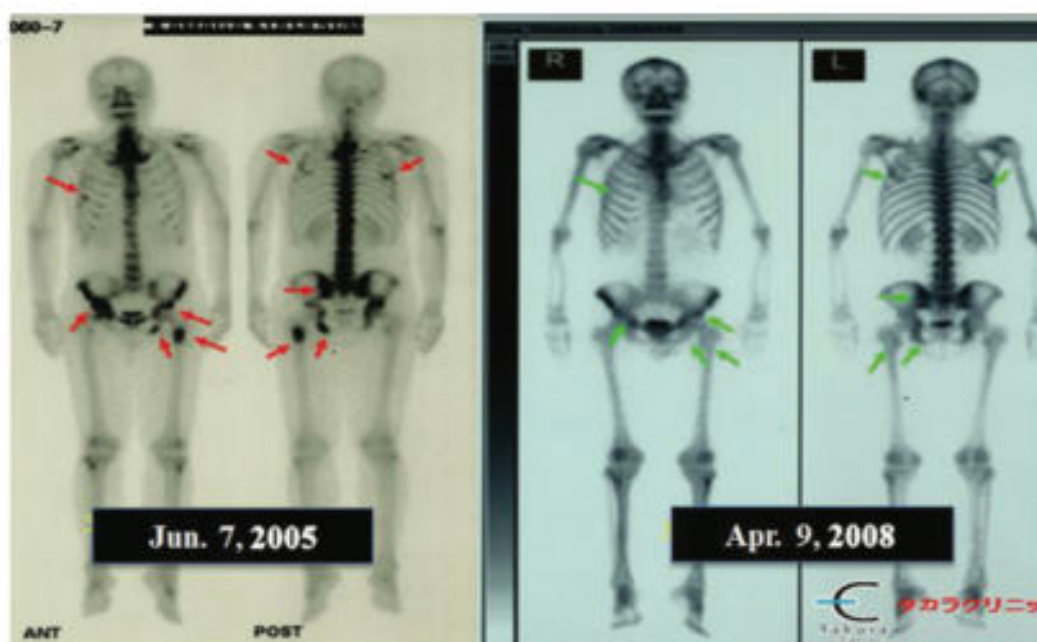
Sakamoto i jego zespół przeprowadzili również większe badanie na pacjentach z NHL, który został wybrany ze względu na jego uogólniony charakter. Pacjenci otrzymali kilka frakcji HB-LDIR lub TB-LDIR promieniami rentgenowskimi, miejscową RT oraz CT.

W sumie leczeniu w takim schemacie poddano około 200 osób, a pięcioletni wskaźnik przeżycia wyniósł 84%, co było znacząco wyższe w porównaniu do 65% i 70% w grupach pacjentów otrzymujących jedynie miejscową RT oraz tych poddanych miejscowej RT w połączeniu z CT. Co więcej, wszyscy pacjenci (84%) pozostawali przy życiu dziewięć lat po zakończeniu terapii adiuwantowej z wykorzystaniem HB-LDIR lub TB-LDIR, podczas gdy wśród pacjentów leczonych wyłącznie miejscową RT i CT odsetek ten wyniósł jedynie 50% [108, 109].

#### 6.7.5. Leczenie raka prostaty za pomocą TB-LDIR i terapii radonowej

Ostatnie japońskie badania nad TB-LDIR zostały przeprowadzone przez Shuji Kojimę i jego współpracowników z Uniwersytetu Naukowego w Tokio (Tokyo University of Science, Noda-Shi). Początkowo leczeniem objęto dwóch pacjentów z zaawansowanym rakiem prostaty – jednego po chirurgicznym usunięciu guza oraz drugiego z nieoperacyjnym stadium końcowym choroby i przerzutami do kości. Pierwszy pacjent został poddany TB-LDIR promieniami rentgenowskimi zgodnie z metodą Sakamoto (6.7.4.3.), natomiast drugi otrzymał podobne leczenie w połączeniu z długoterminową terapią radonową. Obie metody doprowadziły do normalizacji podwyższonych poziomów PSA, a w przypadku drugiego pacjenta zaobserwowano zanik wielu przerzutów kostnych

**Rysunek 7.** [110].



**Rysunek 7.** Scyntygrafia kości z użyciem  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP ( $^{99m}\text{Tc}$ -hydroksymetylenodifosfonianu) u pacjenta z rakiem prostaty i przerzutami do kości przed oraz po leczeniu TB-LDIR [110].

#### **6.7.6. Efekty terapii radonowej w różnych typach nowotworów**

Zespół Kojimy ocenił skuteczność kilkutygodniowej terapii radonowej u sześciu pacjentów z: nowotworem piersi, nowotworem jelita grubego, nowotworem płuc, nowotworem macicy i rakiem wątrobowokomórkowym. Terapia była prowadzona w specjalnej komorze radonowej lub przy użyciu aparatu  $\alpha$ -Radiorespiro- $^{222}\text{Rn}$  (system inhalacji izotopu radonu-222). U wszystkich pacjentów zaobserwowano regresję choroby oraz znaczącą poprawę ogólnego stanu zdrowia i wyników laboratoryjnych. Szczególnie niezwykłym przypadkiem był pacjent z rakiem wątrobowokomórkowym, u którego leczenie przerwano po tym, jak nie stwierdzono obecności nowotworu nawet w badaniach PET (pozytonowa tomografia emisyjna). Autorzy doszli do wniosku, że terapia radonowa jest obiecującą metodą leczenia różnych nowotworów, zarówno jako terapia pierwotna, jak i leczenie wspomagające w połączeniu z CT i/lub miejscową RT wysokodawkową [111, 112].

#### **6.7.7. Modulacja punktów kontrolnych układu immunologicznego w połączeniu z TB-LDIR**

Jak udowodniliśmy w załączonej **Publikacji nr 2 (Rozdział 7.2.)** istnieje obserwowalne przeciwnowotworowe działanie TB-LDIR w połączeniu z inhibitorami punktów kontrolnych układu odpornościowego CTLA-4 i PD-1 (receptor programowanej śmierci) oraz cząsteczką NVP-AUY922 będącą inhibitorem HSP90 (białko szoku cieplnego 90) w mysim modelu NSCLC (niedrobnokomórkowego raka płuca). W tym celu komórki LLC1 (linia komórkowa raka płuca myszy) zostały wszczepione myszom C57BL/6 (linia myszy laboratoryjnych) drogą dożylną (i.v.), ortotopową (o.t.) i podskórną (s.c.). Wyniki wykazały, że frakcjonowane TB-LDIR o całkowitej dawce 0,1 Gy i 1,0 Gy prowadziło do istotnego zmniejszenia liczby kolonii nowotworowych w płucach ( $p < 0,05$ ). Na przykład przy dawce 0,1 Gy samo TB-LDIR obniżyło przeżywalność komórek nowotworowych do 65,1% w porównaniu z kontrolą (100%), a w połączeniu z inhibitorami CTLA-4 i PD-1 – do 43,4%.

Zaobserwowano także znaczny wzrost liczby TIL (naciekające limfocyty nowotworowe, głównie T) zarówno po samym TB-LDIR, jak i w kombinacji z inhibitorami, przy jednoczesnym zmniejszeniu TAM (makrofagów związanych z guzem). Ponadto prozapalne cytokiny TNF- $\alpha$  (czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$ ) i IFN- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ )

istotnie wzrosły ( $p < 0,05$ ), natomiast poziomy przeciwwzapalnych IL-10 (interleukina 10) i TGF- $\beta$  (transformujący czynnik wzrostu  $\beta$ ) uległy obniżeniu po ekspozycji na TB-LDIR. Co istotne, dodanie TB-LDIR do inhibitorów CTLA-4 i PD-1 prowadziło do synergistycznego zahamowania wzrostu nowotworu oraz zmniejszenia jego potencjału klonogenego, zwłaszcza przy niższej dawce 0,1 Gy. Natomiast same inhibitory lub ich inne kombinacje wykazywały niską skuteczność, co podkreśla kluczową rolę TB-LDIR w wzmacnianiu odpowiedzi przeciwnowotworowej. Badania przez nas przeprowadzone sugerują, że TB-LDIR, szczególnie w połączeniu z inhibitorami punktów kontrolnych, może stanowić skuteczną strategię terapeutyczną w leczeniu raka płuca [64].

#### **6.7.8. Ewolucja badań klinicznych nad TB-LDIR oraz wnioski z dotychczasowych badań**

Dostępne i wiarygodne badania kliniczne przeprowadzone do tej pory, w których zastosowano TB-LDIR z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego lub  $\gamma$ , zostały podsumowane w **Tabeli 2**. Wiele z tych badań, szczególnie tych przeprowadzonych w latach 40.–60. XX wieku, nie spełniało współczesnych standardów badań klinicznych.

Do głównych problemów należały:

- Nieprecyzyjna diagnoza,
- Nieodpowiedni dobór pacjentów,
- Brak randomizacji,
- Brak grup kontrolnych,
- Brak zaślepienia,
- Problemy etyczne, takie jak brak świadomej zgody pacjentów czy długoterminowego monitorowania ich stanu zdrowia.

Pomimo tych niedoskonałości, dane zgromadzone w okresie blisko 90 lat, a więc w latach 1930–2024 pozostają dostępne i stanowią solidną podstawę do przyszłych badań klinicznych, prowadzonych zgodnie z obecnymi standardami. Dzięki temu TB-LDIR może być analizowane zarówno jako samodzielna metoda leczenia, jak i w terapiach skojarzonych, szczególnie w leczeniu nowotworów układu krwiotwórczego oraz innych rodzajów nowotworów wywodzących się z tkanki nabłonkowej. Wnioski wyciągnięte

z tych badań zostaną omówione dalszej części rozprawy jak i zostały przedstawione w **Publikacji nr 1 (Rozdział 7.1.)**.

#### **6.7.8.1. Populacja pacjentów i różnice w protokołach TB-LDIR**

W latach 1930–2019 około 2 000 pacjentów zostało objętych systematycznymi i indywidualnymi badaniami klinicznymi mającymi na celu ocenę skuteczności TB-LDIR. Pacjenci z różnymi nowotworami, głównie w zaawansowanym stadium choroby, otrzymywali napromienianie całego lub połowy ciała jako leczenie pierwotne, uzupełniające lub ratunkowe. Większość pacjentów cierpiała na choroby limfoproliferacyjne, NHL oraz, w mniejszym stopniu CCL. Warto zauważyć, że NHL, stanowiący 90% wszystkich chłoniaków, często ma charakter układowy, co wymaga terapii systemowej, a nie jedynie napromieniania miejscowego [113]. Pacjentów z guzami litymi, takimi jak czerniak, mięsak oraz nowotwory jelita grubego, prostaty, płuc, jajników, wątroby i macicy, poddawano terapii LDIR rzadziej. Typowe protokoły TB-LDIR obejmowały wielokrotne ekspozycje na promieniowanie rentgenowskie lub  $\gamma$  w dawkach 0,05–0,2 Gy, 2–5 razy w tygodniu, aż do osiągnięcia sumarycznej dawki 1–4 Gy. Po 1–8 tygodniach przerwy podobne schematy były niekiedy powtarzane. Podobne podejście stosowaliśmy w badaniu przedstawionym w **Podrozdziale 6.7.7.** oraz **Publikacji nr 2 (Rozdział 7.2.)**. U pacjentów z utrzymującymi się nowotworowymi ogniskami litymi stosowano dodatkowe napromienianie regionalne, w dawkach 10–35 Gy, podawane w codziennych frakcjach.

#### **6.7.8.2. Wyniki kliniczne w różnych typach nowotworów**

TB-LDIR wykazało znaczną skuteczność u wielu pacjentów z NHL oraz u niektórych pacjentów z CLL. W zaawansowanych stadiach NHL odsetek CR (całkowitych remisji) wynosił od 25% do 95% [96-103, 106, 114-125]. Co istotne, najlepsze wyniki uzyskiwano, gdy TB-LDIR było leczeniem początkowym lub jedyną metodą terapeutyczną [98, 99, 101, 102, 115, 116, 119, 120, 122, 123]. Nawet pacjenci, u których doszło do nawrotu choroby lub niepowodzenia wcześniejszej CT, dobrze reagowali na TB-LDIR [94, 97, 99, 107, 120, 125]. Skuteczność TB-LDIR w guzach litych była natomiast mniej jednoznaczna. Choć niektóre raporty były obiecujące [94, 110-112, 126], większość badań

dotyczyła zaawansowanych nowotworów z przerzutami, co ograniczało skuteczność tej metody [92, 106, 127].

#### **6.7.8.3. Tolerancja i bezpieczeństwo TB-LDIR**

TB-LDIR na ogół nie powodowało poważnych ostrych działań niepożądanych. U niektórych pacjentów występowała przemijająca supresja szpiku kostnego, np. małopłytkowość (trombocytopenia) lub limfocytopenia, które w rzadkich przypadkach wymagały przetoczenia krwi. Inne łagodne działania niepożądane obejmowały nudności i wymioty, głównie u pacjentów poddawanych jednocześnie farmakoterapii cytostatykami [92, 118, 126, 128]. Del Regato (1974) [91] donosił, że długotrwałe napromienianie całego ciała niskimi dawkami u pacjentów z CLL skutkowało zdrowym szpikiem kostnym, z wyjątkiem nacieków białaczkowych. Występowanie wtórnej białaczki u pacjentów z NHL leczonych TB-LDIR było niskie, z wyjątkiem przypadków, gdy metoda ta była stosowana łącznie z wysokodawkową RT miejscową lub intensywnymi cyklami CT [122, 129-132]. Ogólnie rzecz biorąc CT, zwłaszcza środki alkilujące, pozostaje głównym czynnikiem ryzyka wtórnych nowotworów hematologicznych w tej grupie pacjentów [133, 134].

#### **6.7.8.4. Porównanie TB-LDIR z chemioterapią**

Badania porównujące TB-LDIR z CT wykazały kilka istotnych zalet TB-LDIR. Metoda ta była mniej toksyczna, szybciej prowadziła do zmniejszenia powiększonych narządów, była prostsza w aplikacji i łatwiejsza do kontrolowania. Ponadto okazała się skuteczna u pacjentów, którzy nie reagowali na CT lub u których doszło do nawrotu choroby [98-100, 103, 106, 107, 121, 122, 127]. Wyniki te były sprzeczne z wnioskami Paule i in. (1985), którzy na podstawie ograniczonych danych podkreślali toksyczność hematologiczną oraz powikłania infekcyjne związane z TB-LDIR [135].

#### **6.7.8.5. Wyzwania i ograniczenia w klinicznej implementacji TB-LDIR**

Pomimo obiecujących wyników, TB-LDIR nie stało się standardową metodą leczenia. Dominacja CT oraz błędne przekonania dotyczące szkodliwości promieniowania jonizującego, oparte na modelu LNT (liniowej hipotezie bezprogowej), utrudniły akceptację tej techniki [136-138].



Szczegóły modelu LNT  
(Źródło: materiały edukacyjne dostępne  
w kanale Youtube)

Radiofobia, zarówno wśród społeczeństwa, jak i pracowników wykonujących zawody medyczne, pozostaje istotną barierą, podobnie jak brak badań klinicznych wyjaśniających mechanizmy działania TB-LDIR. Dodatkowo, farmakoterapia skoncentrowana na leczeniu systemowym, prawdopodobnie wpłynęły na ograniczone badania TB-LDIR jako alternatywnej metody leczenia.

Patrząc całościowo TB-LDIR wykazało duży potencjał, szczególnie w leczeniu chorób limfoproliferacyjnych. Jednak, aby ponownie potwierdzić jego znaczenie kliniczne, konieczne są nowoczesne zaawansowane badania uwzględniające mechanizmy molekularne działania oraz spełniające aktualne standardy etyczne i metodologiczne.

### **6.8. Prawdopodobny mechanizm terapeutyczny TB-LDIR**

#### **6.8.1. Stymulacja układu odpornościowego**

Napromienianie TB-LDIR wykazało skuteczność w uzyskaniu pełnych i trwałych remisji u 80–93% pacjentów z zaawansowanym NHL [96, 97, 102, 109, 115, 120, 123, 126, 139]. Jednym z proponowanych mechanizmów terapeutycznych TB-LDIR jest stymulacja reakcji immunologicznych, które mogą pomóc przywrócić zahamowaną odporność przeciwnowotworową. Jednak mimo obiecujących wyników, status immunologiczny pacjentów poddanych TB-LDIR był rzadko badany.

Niektóre badania wykazały jednak pewne odpowiedzi immunologiczne. Frakcjonowane TB-LDIR zwiększało m.in.:

- Liczbę limfocytów T pomocniczych (CD4+) i komórek NK (natural killer) [109, 106],
- Proliferację limfocytów krwi pod wpływem mitogenów *in vitro* [125],
- Stężenia immunoglobulin w krążeniu, przywracając je z wartości subnormalnych do normy (Johnson, 1976),
- Stosunek CD4:CD8 w krwi obwodowej [140].

TB-LDIR najczęściej przynosiło najlepsze wyniki kliniczne, gdy stosowano je jako samodzielne leczenie lub przed wprowadzeniem immunosupresyjnej CT i/lub wysokodawkowej RT [98, 99, 101, 102, 114, 115, 118-120, 129, 139]. To spostrzeżenie stanowi pośredni dowód na udział układu odpornościowego w mechanizmie działania LDIR. Specht (2016) zaobserwował, że nawet gdy RT była ograniczona do miejsc objętych chorobą, połączenie miejscowej RT z CT systemową w nowoczesnym leczeniu chłoniaków skutkowało mniejszą liczbą pacjentów odnoszących korzyści z RT wraz ze wzrostem intensywności CT [141].

#### **6.8.2. Eliminacja komórek nowotworowych indukowana promieniowaniem**

Zniszczenie komórek nowotworowych indukowane promieniowaniem to drugi mechanizm leżący u podstaw terapeutycznych korzyści LDIR. Do komórek najbardziej wrażliwych na promieniowanie należą limfocyty, zwłaszcza limfoblasty. W porównaniu do swoich aktywowanych odpowiedników, spoczynkowe limfocyty są bardziej podatne na promieniowanie  $\gamma$  [142]. W przeciwieństwie do mitotycznej, starczej lub postmitotycznej martwicy oraz apoptozy obserwowanej w nowotworach nielimfoidalnych, Sellins i Cohen wykazali, że ekspozycja limfocytów na promieniowanie  $\gamma$  prowadzi do wczesnej apoptozy w fazie interfazowej [143-145]. Dodatkowo, limfocyty są bardziej wrażliwe na promieniowanie *in vivo* niż *in vitro* [146]. Ze względu na swoją zwiększoną radiowrażliwość, chłoniaki wyjątkowo dobrze reagują na RT – do miejscowego napromienienia dużych mas nowotworowych wystarcza 20–35 Gy, w porównaniu do 65 Gy lub więcej wymaganych w leczeniu wielu innych nowotworów litych, takich jak gruczolakoraki i raki płaskonabłonkowe [24].

### **6.8.3. Hiperwrażliwość na promieniowanie i nasilona apoptoza**

Kolejnym z prawdopodobnych mechanizmów nasilonej apoptozy komórek chłoniaka jest ich HRS (hiperwrażliwość na promieniowanie). Zjawisko to występuje, gdy bardzo niskie dawki promieniowania (już od 0,3 Gy) powodują większą śmierć komórek na jednostkę dawki pochłoniętej w porównaniu do wyższych dawek. Uważa się, że po ekspozycji na LDIR komórki chłoniaka nie rozpoznają uszkodzenia DNA jako istotnego, nie inicjują naprawy DNA i zamiast tego ulegają apoptozie [147, 148]. Chociaż apoptoza indukowana promieniowaniem zazwyczaj zachodzi bez wywoływania reakcji zapalnej, nie jest ona immunologicznie „cicha”. Podczas apoptozy złośliwe komórki limfoidalne eksponują na swojej powierzchni sygnały, takie jak fosfatydyloseryna i kalretikulina, co inicjuje fagocytozę oraz aktywuje komórki dendrytyczne, które następnie indukują odpowiedź immunologiczną zależną od limfocytów T i NKT (limfocyty naturalni zabójcy) [24, 149, 150].

### **6.8.4. Immunogenna śmierć komórkowa w grudkowym NHL**

Napromienianie indukuje apoptozę w komórkach chłoniaka grudkowego, jednocześnie oszczędzając makrofagi. Po ekspozycji na fosfatydyloserynę, makrofagi zostają pobudzone do usuwania komórek chłoniaka [151]. Ponadto, komórki chłoniaka grudkowego poddane napromienianiu *ex vivo* mogą zostać zaprezentowane komórkom dendrytycznym, tworząc skuteczną szczepionkę przeciwnowotworową, zwłaszcza gdy komórki chłoniaka wykazują na swojej powierzchni wysoką ekspresję kalretikuliny i HSP90 [152]. Sugeruje to, że LDIR może indukować immunogenną śmierć komórkową, co dodatkowo zwiększa terapeutyczne korzyści TB-LDIR. Podsumowując, badania wskazują na podwójną naturę LDIR:

- Z jednej strony wspomaga ono skuteczność leczenia nowotworów oraz stymuluje układ odpornościowy,
- Z drugiej strony może wiązać się z ryzykiem, takim jak wtórne choroby nowotworowe, choroby sercowo-naczyniowe oraz zmiany w funkcjonowaniu układu immunologicznego.

Odpowiedź organizmu na LDIR jest zależna od dawki oraz czasu ekspozycji. Mimo obiecujących wyników, niespójność niektórych badań oraz ograniczona liczba badań klinicznych na ludziach podkreślają konieczność dalszych badań, aby osiągnąć optymalną równowagę między korzyściami a ryzykiem.

**Tabela 2.** Badania kliniczne dotyczące TB-LDIR i HB-LDIR promieniowaniem X lub gamma u pacjentów z różnymi nowotworami.

| Pacjenci/<br>schorzenia                                                                      | Schemat terapii                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Wyniki                                                                                                                                                                                                                                                                           | Działania niepożądane                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Lit. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 13 pacjentów z chłoniakami lub białaczkami oraz 17 pacjentów z rozsianymi nowotworami litymi | <p>a) Długotrwałe ciągłe napromienianie promieniami rentgenowskimi z dawką około 0,01 Gy/h do łącznej dawki 0,38–1,9 Gy podanej w ciągu 7,5–13,9 dnia (20 pacjentów)</p> <p>b) Krótkotrwałe frakcjonowane naświetlanie promieniowaniem X z dawką około 0,3 Gy/h do łącznej dawki 7,5–10 Gy podanej w ciągu 12–24 dni (10 pacjentów)</p> | <p>a) "Wyraźna poprawa" u 2 pacjentek z rakiem piersi (z 8 pacjentów z nowotworami litymi), 1 pacjenta z białaczką limfatyczną oraz 1 pacjenta z HL;</p> <p>b) "częściowa poprawa" u 1 pacjenta z białaczką limfatyczną;</p> <p>c) CR u 3 z 9 pacjentów z nowotworami litymi</p> | <p>Powtarzane morfologie krwi i inne badania w żadnym przypadku nie wykazały żadnych konsekwentnych zmian, które można by przypisać działaniu promieniowania, z wyjątkiem białaczek, w których zaobserwowano typowe zmniejszenie liczby białych krwinek; nie odnotowano przypadków znacznego spadku liczby płytek krwi ani wystąpienia plamicy krwotocznej; przy podawaniu promieniowania w zakresie od 5 do 25% dawki wywołującej rumień na całe ciało nie zaobserwowano supresji liczby białych krwinek</p> | [88] |
| 270 pacjentów z różnymi nowotworami (chłoniaki, białaczki, szpiczak mnogi, raki, mięsaki)    | TB-LDIR promieniowaniem X w dawce 0,5–0,75 Gy, zazwyczaj po miejscowej RT promieniowaniem X                                                                                                                                                                                                                                             | Pacjenci z chłoniakami, którzy wcześniej byli poddani miejscowej terapii promieniowaniem X, mieli zarówno dłuższe przeżycie, jak i dłużej utrzymujące się remisje w porównaniu do pacjentów, którzy otrzymali wyłącznie miejscowe napromienianie promieniowaniem X               | Nie zgłaszano                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | [89] |
| 163 pacjentów z CML (Przewlekła białaczka szpikowa) i CLL                                    | TB-LDIR promieniowaniem X w dawce 0,1–0,2 Gy na ekspozycję, podawane w 6–17 indywidualnych frakcjach do łącznej dawki 0,9–3,5 Gy (23 pacjentów) lub równoważne wewnętrzne TB-LDIR poprzez dożylną iniekcję izotopu fosforu <sup>32</sup> P (140 pacjentów)                                                                              | Przeżycie pacjentów leczonych LDIR było „znacząco lepsze niż w grupie obejmującej wszystkie przypadki leczenia promieniowaniem zgłoszone w literaturze w latach 1925–1951”; nie stwierdzono istotnej różnicy między efektami promieniowania X a izotopem fosforu <sup>32</sup> P | Brak objawów odczynu popromiennego                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | [90] |

**Tabela 2.** Badania kliniczne dotyczące TB-LDIR i HB-LDIR promieniowaniem X lub gamma u pacjentów z różnymi nowotworami c.d.

| Pacjenci/<br>schorzenia                                                                                                                                                        | Schemat terapii                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Wyniki                                                                                                                                                                                                            | Działania niepożądane                                                                                                                                                                        | Lit.  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 52 pacjentów: 7 z CLL, 8 z ALL (białaczką ostrą limfoblastyczną), 15 z chłoniakiem, 16 z zaawansowanym nowotworem tkanek litych, 6 z czerwienicą prawdziwą (polycythemia vera) | Pojedyncze lub frakcjonowane TB-LDIR promieniowaniem X w dawce: 0,05–1 Gy (pacjenci z CLL i chłoniakiem), 3 Gy (pacjenci z ALL), 3–8 Gy (pacjenci z nowotworami litymi)                                                                                                                                                                                                                          | Wśród 7 pacjentów z CLL: doskonała odpowiedź (pod względem przeżycia) u 1 pacjenta, dobra odpowiedź u 2 pacjentów oraz odpowiedź niepełna u 1 pacjenta                                                            | Nudności i/lub wymioty wystąpiły u 18 pacjentów, przejściowa trombocytopenia i limfocytopenia, poza tym brak poważnych skutków ubocznych                                                     | [92]  |
| 19 pacjentów: 7 z CLL, 5 z uogólnionym chłoniakiem, 3 z ziarniniakiem grzybiastym (mycosis fungoides), 2 z ALL, 1 z chłoniakiem mieszanym, 1 z makroglobulinemią               | TBI promieniowaniem X w dawce 0,05–0,2 Gy dziennie przez kilka dni do łącznej dawki 1–4 Gy lub 0,1–0,2 Gy podawane co dwa miesiące                                                                                                                                                                                                                                                               | Zadowalająca poprawa (minimum 75% zmniejszenie klinicznie mierzalnej choroby oraz poprawa objawowa) u: 5 pacjentów z CLL, 4 pacjentów z chłoniakiem (w tym u 3 bez wcześniejszej CT lub RT) oraz 1 pacjenta z ALL | Z wyjątkiem przejściowej trombocytopenii i limfocytopenii nie stwierdzono istotnych objawów ani skutków ubocznych                                                                            | [163] |
| 27 pacjentów z nieleczonym wcześniej NHL w III i IV stadium (z zajęciem szpiku kostnego)                                                                                       | 18 pacjentów leczonych albo samym TB-LDIR (promieniowanie γ w dawce 0,1 Gy dziennie, 3–5 razy w tygodniu, do łącznej dawki 1–3 Gy), albo TB-LDIR, po którym po 3 miesiącach zastosowano całkowite napromienianie węzłów (całkowita dawka 20–35 Gy, podawana w codziennych frakcjach po 1,5–2 Gy)                                                                                                 | CR u 25 pacjentów (93%); mediana czasu trwania remisji bez leczenia podtrzymującego = 26 miesięcy                                                                                                                 | Przejściowa supresja szpiku kostnego wymagająca transfuzji krwi wystąpiła u 4 z 18 pacjentów leczonych albo samym TB-LDIR lub TBI + napromienianie węzłów chłonnych                          | [115] |
| 61 pacjentów (37 mężczyzn i 24 kobiety) z CLL                                                                                                                                  | Seria dożywnotnego naświetlania promieniowaniem X składająca się z: 1) 10 codziennych TB-LDIR w dawce 0,1 Gy, 2) 1 cotygodniowego TB-LDIR w dawce 0,05 Gy, 3) rocznego "boostera" w postaci 10 codziennych TB-LDIR w dawce 0,1 Gy, 4) miejscowego napromieniania śledziony lub węzłów chłonnych w razie potrzeby; pacjenci byli poddawani temu reżimowi przez 3–7 lat (całkowite dawki 11–28 Gy) | Średnie przeżycie: 46 miesięcy, maksymalne: 15 lat, 5-letnie przeżycie: 21% pacjentów                                                                                                                             | Przejściowa leukopenia i trombocytopenia; autopsje przeprowadzone u 1/3 pacjentów nie wykazały żadnych niepożądanych skutków promieniowania w szpiku kostnym ani innych badanych strukturach | [91]  |

**Tabela 2.** Badania kliniczne dotyczące TB-LDIR i HB-LDIR promieniowaniem X lub gamma u pacjentów z różnymi nowotworami c.d.

| Pacjenci/<br>schorzenia                                                                                                                                                                                                                     | Schemat terapii                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Wyniki                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Działania niepożądane                                                                                                                                                                                                         | Lit.  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 65 pacjentów (59 ocenianych) z chłoniakiem limfocytowym (20 w stadium III i 45 w stadium IV) losowo przydzielonych do leczenia CT lub RT: 27 ocenianych pacjentów otrzymujących skojarzoną CT oraz 32 ocenianych pacjentów otrzymujących RT | Grupa RT: tylko TB-LDIR (0,1 Gy promieniowania $\gamma$ dziennie przez 3–5 dni w tygodniu do łącznej dawki 1–5 Gy) u 21 pacjentów, tylko napromienianie węzłów (20–30 Gy w ciągu 2–4 tygodni) u 6 pacjentów, napromienianie węzłów poprzedzone TB-LDIR (w łącznej dawce 1,5 Gy) u 2 pacjentów, HB-LDIR lub napromienianie węzłów + miejscowa RT u 4 pacjentów; Grupa CT: 32 pacjentów otrzymało CVP (cyklofosfamid (400 mg/m <sup>2</sup> doustnie x 5 dni) + winkrystynę (1,4 mg/m <sup>2</sup> dożylnie w 1. dniu) + prednizon (100 mg/m <sup>2</sup> doustnie x 5 dni) – 6 cykli co 21 dni) | Grupa RT: CR u 18 pacjentów (56%) (9 pacjentów miało nawrót, mediana czasu trwania remisji = 22–31 miesięcy), PR (częściowa remisja) u 8 pacjentów (25%), brak oceny u 6 pacjentów (19%) – brak danych dotyczących remisji u pacjentów leczonych wyłącznie TB-LDIR; Grupa CT: CR u 15 pacjentów (55%) (7 pacjentów miało nawrót, mediana czasu trwania remisji >12 miesięcy), PR u 9 pacjentów (33%), brak oceny u 3 pacjentów (11%) | Toksyczność TB-LDIR opisana przez Johnsona [116]; toksyczność schematu CVP: granulocytopenia po każdym cyklu oraz trombocytopenia <100 000/mm <sup>3</sup> (rzadka w pierwszych 6 cyklach); neurotoksyczność w pewnym stopniu | [124] |
| 39 pacjentów z chłoniakiem limfocytowym dobrze zróżnicowanym (6) i słabo zróżnicowanym (23)                                                                                                                                                 | 31 pacjentów leczonych wyłącznie TB-LDIR (0,1 Gy promieniowania X lub $\gamma$ na frakcję, do łącznej dawki 1,0–1,5 Gy), 8 pacjentów leczonych TB-LDIR, a następnie napromienianie węzłów chłonnych (10 Gy do zajętych obszarów układu limfatycznego)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | CR u 68% pacjentów leczonych wyłącznie TB-LDIR oraz u 75% pacjentów leczonych TB-LDIR + napromienianie węzłów chłonnych                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Umiarkowanego stopnia i przejściowa supresja hematologiczna                                                                                                                                                                   | [113] |
| 4 pacjentów z NHL w III stadium, 2 z oporną na leczenie CLL, 2 z rozsianym ziarniniakiem grzybiastym (mycosis fungoides), 1 z nawrotowym NHL z komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego w końcowym stadium po CT                           | TB-LDIR w dawkach 0,15 Gy promieniowania $\gamma$ dziennie przez 5 dni, następnie 0,1–0,15 Gy co drugi dzień lub w dłuższych odstępach przez 5–12 tygodni do łącznej dawki 2,0–2,65 Gy                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 80%, 90% i 95% regresji węzłowej u 3 pacjentów z wcześniej nieleczonym NHL w III stadium; PR u 4. pacjenta, wcześniej leczonego CT, ale leczenie przerwano przy 1,05 Gy z powodu utrzymującej się trombocytopenii; „dramatyczna regresja” aktywnych zmian nowotworowych w całym ciele u 1 pacjenta z ziarniniakiem grzybiastym (mycosis fungoides)                                                                                   | Brak wyraźnych subiektywnych ani obiektywnych powikłań z wyjątkiem umiarkowanej i odwracalnej supresji szpiku kostnego                                                                                                        | [118] |

**Tabela 2.** Badania kliniczne dotyczące TB-LDIR i HB-LDIR promieniowaniem X lub gamma u pacjentów z różnymi nowotworami c.d.

| Pacjenci/<br>schorzenia                                                                                                                                             | Schemat terapii                                                                                                                                                                                                                                                                            | Wyniki                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Działania niepożądane                                                                                                                                                                                                                                                      | Lit.       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 51 pacjentów z chłoniakiem limfocytowym w III i IV stadium, którzy otrzymali TB-LDIR jako leczenie początkowe i jedyną terapię                                      | TB-LDIR promieniowaniem X w dawce 0,15 Gy dwa razy w tygodniu do łącznej dawki 1,5 Gy + IFRT (radioterapia ograniczonego pola) u pacjentów z utrzymującymi się guzami miejscowymi; początkowych 25 pacjentów leczonych TB-LDIR porównano z dobraną grupą pacjentów leczonych schematem CVP | CR u do 80% pacjentów leczonych TB-LDIR; mediana przeżycia >32 miesiące, szacowane przeżycie wynoszące 83% po 3 latach i 68% po 5 latach; nie stwierdzono statystycznej różnicy w przeżyciu między grupami TB-LDIR i CT, jednak „tendencja przemawiała na korzyść LDIR”                                                             | Przejściowa trombocytopenia i leukocytopenia; brak nudności, osłabienia, wypadania włosów ani złego samopoczucia                                                                                                                                                           | [119, 139] |
| 57 pacjentów z postępującą CLL: 42 pacjentów leczonych wyłącznie TB-LDIR, 14 ocenianych pacjentów leczonych TB-LDIR w połączeniu z CT                               | TB-LDIR jako jedyne leczenie (42 pacjentów): seria promieniowania $\gamma$ w dawce 0,5 Gy, podawana we frakcjach (0,05–0,1 Gy dziennie, 3–5 razy w tygodniu), z przerwami 4–8 tygodni, do łącznej dawki 1–4 Gy; TBI + CT (14 ocenianych pacjentów): 12 cykli CT                            | Pacjenci leczeni wyłącznie TB-LDIR: CR u 14 pacjentów (33%), PR u 23 pacjentów (55%), mediana przeżycia: 72 miesiące (pacjenci z chorobą w stadium I-II) oraz 63 miesiące (pacjenci z chorobą w stadium III-IV);<br>Pacjenci leczeni TB-LDIR + CT: CR u 8 pacjentów (57%), PR u 5 pacjentów (36%), mediana przeżycia: nie określona | Pacjenci leczeni wyłącznie TB-LDIR: łagodna anemia u 5% oraz łagodna trombocytopenia u 15% pacjentów, bez problemów krwotocznych; Pacjenci leczeni TB-LDIR + CT: leczenie tolerowane wyjątkowo dobrze, brak toksyczności hematologicznej wymagającej wsparcia transfuzjami | [116, 164] |
| 48 pacjentów z nieleczonym wcześniej NHL w III i IV stadium o histologii limfocytowej, limfoblastycznej i mieszanej (15 z postacią rozlaną i 33 z postacią guzkową) | TB-LDIR promieniowaniem X w dawce 0,15 Gy dwa razy w tygodniu do osiągnięcia łącznej dawki 1,5 Gy lub wystąpienia supresji hematologicznej; 25 pacjentów porównano z dobraną grupą pacjentów leczonych schematem CVP                                                                       | Ponad 70% szacowanego przeżycia u pierwszych 25 pacjentów leczonych wyłącznie TB-LDIR w porównaniu do około 31% przeżycia w grupie 25 dobranych pacjentów leczonych skojarzoną CT (CVP)                                                                                                                                             | Pacjenci leczeni TB-LDIR: brak nudności, wymiotów, wypadania włosów ani krwawień; toksyczność ograniczona do przejściowej trombocytopenii                                                                                                                                  | [165]      |
| 9 pacjentów: 7 z LL (chłoniakiem limfoblastycznym) i 2 z HL (chłoniakiem ziarniczy), u których wcześniejsza CT okazała się nieskuteczna                             | TB-LDIR dwa razy w tygodniu promieniowaniem X w dawce 0,15 Gy do łącznej dawki 1,2–1,8 Gy                                                                                                                                                                                                  | CR u 5 pacjentów (71%) z LL, progresja choroby u 1 pacjenta z LL oraz u 2 pacjentów z HL; brak oceny u 1 pacjenta z LL; odpowiedź kliniczna korelowała z przywróceniem proliferacyjnej odpowiedzi limfocytów krwi obwodowej na mitogeny                                                                                             | Nie zgłaszano                                                                                                                                                                                                                                                              | [125]      |

**Tabela 2.** Badania kliniczne dotyczące TB-LDIR i HB-LDIR promieniowaniem X lub gamma u pacjentów z różnymi nowotworami c.d.

| Pacjenci/<br>schorzenia                                                                                                                                                                                                                        | Schemat terapii                                                                                                                                                                                                          | Wyniki                                                                                                                                                                                                                                                                            | Działania niepożądane                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Lit.  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 58 wcześniej nieleczonych pacjentów z NHL w III lub IV stadium (43 pacjentów z histologią guzkową i 15 z histologią rozlaną)                                                                                                                   | TB-LDIR promieniowaniem X w dawce 0,15 Gy dwa razy w tygodniu do łącznej dawki 1,5 Gy; 24 pacjentów z utrzymującymi się miejscowymi masami nowotworowymi otrzymało dodatkowe napromienianie miejscowe w dawce 1,0–2,0 Gy | 30 pacjentów (52%) przeżyło 8 lat (57% z histologią guzkową i 42% z histologią rozlaną); 8-letnie przeżycie bez nawrotu u 8 pacjentów (14%), mediana czasu do nawrotu 21 miesięcy                                                                                                 | Trombocytopenia (u wszystkich pacjentów poza 4 powróciła do wartości zbliżonych do normy w ciągu 1 miesiąca); 2 przypadki erytroleukemii, oba leczone drugim cyklem TB-LDIR i CT przed rozwojem erytroleukemii                                                                                                     | [129] |
| 39 pacjentów z zaawansowanym NHL: 38 z LL o postaci guzkowej (30) lub rozlanej (8) oraz 1 pacjent chłoniakiem mieszanym guzkowym; wśród nich 28 pacjentów nie było wcześniej leczonych, a 11 pacjentów było w nawrocie po CT lub miejscowej RT | TB-LDIR promieniowaniem $\gamma$ w dawce 0,1 lub 0,15 Gy dwa razy w tygodniu do łącznej dawki 1,5 Gy                                                                                                                     | CR u 33 pacjentów (85%), mediana czasu trwania – 24 miesiące; PR u 6 pacjentów (15%)                                                                                                                                                                                              | Znacząca trombocytopenia (liczba płytek < 50 000/mm <sup>3</sup> ) wystąpiła u 12 pacjentów (31%), a znacząca leukopenia (< 1 500/mm <sup>3</sup> ) u 3 pacjentów (8%); perspektywicznie nie odnotowano przypadków białaczki szpikowej                                                                             | [120] |
| 30 pacjentów z NHL w III stadium (6 przypadków) i IV stadium (24 przypadki); 11 pacjentów było wcześniej leczonych miejscową RT (4), CT (6) lub oboma metodami (1)                                                                             | TB-LDIR promieniowaniem X w dawce 0,1 Gy trzy razy w tygodniu aż do osiągnięcia łącznej dawki 3,0 Gy                                                                                                                     | CR u 10 z 19 pacjentów (53%), którzy nie byli wcześniej leczeni, oraz u 10 z 13 pacjentów bez białaczki (77%), którzy również nie otrzymali wcześniejszego leczenia; dla porównania, około 40% pacjentów leczonych wielolekową CT (de Vita et al., Lancet 1975) osiągnęło remisję | Brak wymiotów ani biegunki, toksyczność ograniczona do supresji hematologicznej (ogólnie akceptowalna u pacjentów bez białaczki, ale ciężka u niektórych pacjentów białaczkowych); TB-LDIR było bardzo dobrze tolerowane w porównaniu do CT; TB-LDIR może być zastosowane, jeśli CT nie prowadzi do pełnej remisji | [98]  |
| 33 pacjentów z NHL: 30 z LL (24 z postacią rozlaną słabo zróżnicowaną i 6 z postacią guzkową dobrze zróżnicowaną) oraz 3 z chłoniakiem histiocytarnym                                                                                          | TB-LDIR promieniowaniem X w dawce 0,1 Gy 3 razy w tygodniu do łącznej dawki 1,8–2,2 Gy; 14 pacjentów dodatkowo leczonych IFRT w dawce 10–15 Gy                                                                           | CR u 25 pacjentów (83%) oraz PR u 5 pacjentów (17%) z LL; PR u 2 pacjentów oraz brak oceny u 1 pacjenta z chłoniakiem histiocytarnym                                                                                                                                              | Przejściowa pancytopenia z trombocytopenią – powrót do normy u wszystkich pacjentów poza 2 przypadkami; brak innej toksyczności ani złego samopoczucia związanego z TB-LDIR                                                                                                                                        | [96]  |

**Tabela 2.** Badania kliniczne dotyczące TB-LDIR i HB-LDIR promieniowaniem X lub gamma u pacjentów z różnymi nowotworami c.d.

| Pacjenci/<br>schorzenia                                                                                                                                                                               | Schemat terapii                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Wyniki                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Działania niepożądane                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Lit.  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 48 wcześniej nieleczonych pacjentów z NHL w stadium II-IV (63% z histologią guzkową i 36% z histologią rozlaną) oraz 15 pacjentów wcześniej leczonych miejscową RT (6 pacjentów) lub CT (9 pacjentów) | TB-LDIR promieniowaniem $\gamma$ w dawce 0,1–0,15 Gy dziennie, 2–5 razy w tygodniu, do łącznej dawki 1–1,5 Gy; następnie, po 4–6 tygodniach przerwy, kolejny cykl LDIR; 16 pacjentów z utrzymującymi się miejscowymi masami nowotworowymi otrzymało dodatkowe napromienianie miejscowe w dawce 1,0–2,0 Gy | CR wystąpiła u 80–85% pacjentów z chłoniakiem guzkowym oraz u 33–43% pacjentów z chłoniakiem rozlanym, PR została osiągnięta u 10–20% pacjentów z chłoniakiem guzkowym i u 50–100% pacjentów z chłoniakiem rozlanym, brak oceny dotyczył 2 pacjentów (4%) spośród 48 ogółem; szacowane czteroletnie przeżycie wynosiło 71% dla grupy z chłoniakiem guzkowym i 57% dla grupy z chłoniakiem rozlanym; wśród pacjentów wcześniej leczonych RT lub CT, CR uzyskano u 60%, PR u 13%, a brak oceny u 26% pacjentów; szacowane przeżycie w tej grupie wynosiło 55% po 2 latach | Trombocytopenia (<30 000 płytek/mm <sup>3</sup> ) u pacjentów z zajęciem szpikiem kostnym i powiększoną śledzioną; brak ostrych ogólnoustrojowych skutków ubocznych (tj. nudności, wymiotów, biegunki, wypadania włosów); nie odnotowano przypadków wtórnej białaczki                                          | [123] |
| 26 pacjentów z NHL w III stadium (6 przypadków) lub IV stadium (20 przypadków), wcześniej leczonych CT i/lub miejscową RT                                                                             | 20 pacjentów: TB-LDIR promieniowaniem $\gamma$ w łącznej dawce 1,5 Gy podanej w 15 frakcjach; 5 pacjentów: TB-LDIR w łącznej dawce 1,25 Gy podanej w 11 frakcjach; 1 pacjent: TB-LDIR w łącznej dawce 1,2 Gy podanej w 14 frakcjach + HB-LDIR w dawce 0,6 Gy                                              | CR wystąpiła u 6 pacjentów (23%), a PR u 11 pacjentów (42%); spodziewane przeżycie wynosiło 55% po 1 roku oraz 42% po 30 miesiącach                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Trombocytopenia i mniej wyraźna leukopenia pojawiły się 3–6 tygodni po zakończeniu TB-LDIR (najprawdopodobniej pod wpływem wcześniejszej terapii cytotoksycznej), z powrotem do normy po 3–4 tygodniach; poza minimalnym wypadaniem włosów brak innych skutków ubocznych, w tym ze strony przewodu pokarmowego | [128] |

**Tabela 2.** Badania kliniczne dotyczące TB-LDIR i HB-LDIR promieniowaniem X lub gamma u pacjentów z różnymi nowotworami c.d.

| Pacjenci/<br>schorzenia                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Schemat terapii                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Wyniki                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Działania niepożądane                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Lit.  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 37 pacjentów z zaawansowanym NHL (22 z postacią guzkową i 15 z postacią rozlaną); 31 z LL, 4 z chłoniakiem mieszanym limfocytowo-histiocytarnym oraz 2 z chłoniakiem niezróżnicowanym; wśród nich 24 pacjentów nie było wcześniej leczonych, a 13 było w nawrocie po wcześniejszej CT lub miejscowej RT                    | TB-LDIR: 1,5 Gy promieniowaniem X podana w 10 frakcjach przez 12 dni (13 pacjentów); TB-LDIR: 1,5 Gy dawka podana w 10 frakcjach dwa razy w tygodniu przez 5 tygodni (13 pacjentów); HB-LDIR: 3 Gy podane w 10 frakcjach przez 12 dni, druga połowa ciała napromieniana 6–8 tygodni później (11 pacjentów)                                                                                                           | Wśród pacjentów z chorobą guzkową CR wystąpiła u 14 pacjentów (64%), a PR u 2 pacjentów (9%); wśród pacjentów z chorobą rozlaną CR uzyskano u 6 pacjentów (40%), PR u 6 pacjentów (40%), a u 9 pacjentów nie dokonano oceny; całkowity odsetek odpowiedzi wyniósł 80% (12 z 15) dla choroby rozlanej i 73% (16 z 22) dla choroby guzkowej; HB-LDIR było bardziej skuteczne (64% CR i mediana czasu trwania odpowiedzi 16 miesięcy) w porównaniu do TB-LDIR (54% CR i mediana 10 miesięcy) oraz częściowej LDIR (38% CR i mediana 14 miesięcy) | Trombocytopenia (<50 000 płytek/mm <sup>3</sup> ) u 14 pacjentów (38%), brak poważnych krwawień                                                                                                                                                                                                                                                              | [99]  |
| 51 pacjentów z NHL w stadium III-IV                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 17 pacjentów: TB-LDIR promieniowaniem X 2–3 razy w tygodniu z tygodniową dawką 0,3 Gy do łącznej dawki 1,5 Gy, następnie „booster” 20–30 Gy w ciągu 2–3 tygodni do każdego obszaru patologicznego (z wyłączeniem szpiku kostnego); 17 pacjentów: leczenie pojedynczym środkiem alkilującym (cyklofosfamid lub chlorambucyl) codziennie do osiągnięcia CR; 17 pacjentów: kilka cykli CVP co 21–28 dni do uzyskania CR | Wśród pacjentów leczonych TB-LDIR początkową CR uzyskano u 12 pacjentów (70,1%), a trwałą CR u 6 pacjentów (35%); w grupie pacjentów leczonych pojedynczym środkiem alkilującym początkową CR osiągnęło 11 pacjentów (65%), a trwałą CR 6 pacjentów (35%); w grupie leczonej schematem CVP początkowa CR wystąpiła u 15 pacjentów (88%), a trwałą CR u 8 pacjentów (47%)                                                                                                                                                                      | Pacjenci leczeni TB-LDIR: utrzymująca się cytopenia (liczba leukocytów < 3000/mm <sup>3</sup> lub liczba płytek < 100 000/mm <sup>3</sup> przez ≥ 6 miesięcy) u 5 pacjentów (29%); przejściowa trombocytopenia (< 50 000/mm <sup>3</sup> ) i leukopenia (< 2000/mm <sup>3</sup> ) u 3 pacjentów (17,6%); brak innych poważnych dolegliwości lub toksyczności | [121] |
| 91 pacjentów z uogólnionym NHL, HL, CLL, CML, szpiczakiem mnogim, nasieniakiem lub SCLC (drobnokomórkowym rakiem płuca); większość pacjentów z NHL, wszyscy pacjenci z HL i CLL oraz 2 pacjentów ze szpiczakiem mnogim wcześniej nie odpowiedzieli na leczenie lub doznali nawrotu po wcześniejszej CT i/lub miejscowej RT | 29 pacjentów: TB-LDIR w dawce 0,1 Gy dziennie do łącznej dawki 1–5 Gy, bez osłaniania czaszki i kończyn; 62 pacjentów: frakcjonowane STBI (TB-LDIR) w dawce 0,5 Gy dziennie przez 5 dni w tygodniu do łącznej dawki 1–40 Gy, podawane jako pojedyncze lub powtarzane leczenie                                                                                                                                        | Długoterminowe remisje (czasami do 17 lat lub trwałe) obserwowano u pacjentów z NHL, HL, białaczkami, szpiczakiem mnogim oraz nasieniakiem, którzy byli leczeni TB-LDIR lub STBI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Przejściowa supresja parametrów krwi obwodowej u pacjentów otrzymujących 1–1,5 Gy w dawkach 0,1–0,15 Gy/d; poza tym niewielka lub brak objawów wywołanych leczeniem                                                                                                                                                                                          | [94]  |

**Tabela 2.** Badania kliniczne dotyczące TB-LDIR i HB-LDIR promieniowaniem X lub gamma u pacjentów z różnymi nowotworami c.d.

| Pacjenci/<br>schorzenia                                                                                                                                                                                                                                                                             | Schemat terapii                                                                                                                                                                                                                                                                           | Wyniki                                                                                                                                                                                                                                                                             | Działania niepożądane                                                                                                                                                                            | Lit.  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 14 dzieci z przerzutowym (stadium IV) neuroblastoma                                                                                                                                                                                                                                                 | TB-LDIR promieniowaniem X w dawce 1,0–1,5 Gy na cykl, podawanej w frakcjach 0,5 Gy dziennie przez 2–3 cykle, równolegle z 3-tygodniowymi cyklami standardowej CT                                                                                                                          | 4 z 12 pacjentów (29%) nie stwierdzono choroby przez ponad 12 do ponad 31 miesięcy; 2 pacjentów zmarło z powodu toksycznej supresji szpiku kostnego                                                                                                                                | Wyraźna trombocytopenia wymagająca przetoczeń płytek krwi po 2. i kolejnych cyklach leczenia; poza tym większość pacjentów pozostawała w dobrym stanie zdrowia                                   | [127] |
| 24 pacjentów z wysokiego ryzyka mięsakiem Ewinga (klinicznie reagującym na radioterapię) po 2–3 cyklach skojarzonej CT i 5 cyklach miejscowej RT                                                                                                                                                    | Po 2–3 cyklach skojarzonej CT i 5 cyklach miejscowej RT pacjenci zostali poddani TB-LDIR promieniowaniem X w dawkach frakcyjnych 0,15 Gy dwa razy w tygodniu przez 5 tygodni do łącznej dawki 1,5 Gy, a następnie intensywnej CT i autologicznemu przeszczepowi szpiku kostnego           | CR wystąpiła u 20 pacjentów (83%), jednak około 70% pacjentów doznało nawrotu choroby i zmarło                                                                                                                                                                                     | TB-LDIR było dobrze tolerowane; sporadycznie pacjent wymagał doustnego leku przeciwwymiotnego w celu kontrolowania nudności, jednak nie wystąpiły znaczące wymioty, skurcze brzucha ani biegunka | [126] |
| 108 nowo zdiagnozowanych pacjentów z: CLL – 41 przypadków, LL dobrze zróżnicowany w III i IV stadium – 21 przypadków, oraz FL (chłoniak grudkowy) w III i IV stadium – 46 przypadków                                                                                                                | 54 pacjentów poddanych TB-LDIR promieniowaniem $\gamma$ (0,15 Gy dwa razy w tygodniu do łącznej dawki 1,5 Gy) oraz 54 pacjentów leczonych CT (chlorambucyl 0,15–0,2 mg/kg doustnie dziennie do tolerancji hematologicznej + prednizon 0,5 mg/kg doustnie dziennie przez pierwszy miesiąc) | CR wyniosła 59% w grupie leczonej CT i 52% w grupie leczonej TB-LDIR, a mediana przeżycia wynosiła odpowiednio 53 i 57 miesięcy; podobne wyniki utrzymały się po stratyfikacji na CLL, LL i FL                                                                                     | Znikoma mielotoksyczność; brak przypadków ostrej białaczki w obu grupach pacjentów                                                                                                               | [103] |
| 68 pacjentów z NHL (34 z nowotworem o niskim stopniu złośliwości, 10 o pośrednim stopniu złośliwości, 19 o wysokim stopniu złośliwości); TB-LDIR było pierwszym leczeniem u 47 pacjentów, a 21 pacjentów nie zareagowało na wcześniejszą CT i/lub standardową RT przed zakwalifikowaniem do TB-LDIR | TB-LDIR promieniowaniem X w dawce 0,1 Gy na frakcję, 3 razy w tygodniu, do łącznej dawki 1,8–2,2 Gy                                                                                                                                                                                       | CR wynosił 84% dla NHL niskiego stopnia, 42% dla NHL o pośrednim stopniu złośliwości i 40% dla NHL o wysokim stopniu złośliwości; lepsze wskaźniki remisji odnotowano u pacjentów poddanych TB-LDIR jako leczeniu początkowemu niż u pacjentów wcześniej leczonych innymi metodami | Przejściowa trombocytopenia i leukopenia; brak innych skutków ubocznych, takich jak nudności, wymioty czy wypadanie włosów                                                                       | [97]  |

**Tabela 2.** Badania kliniczne dotyczące TB-LDIR i HB-LDIR promieniowaniem X lub gamma u pacjentów z różnymi nowotworami c.d.

| Pacjenci/<br>schorzenia                                                                                                                                                                       | Schemat terapii                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Wyniki                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Działania niepożądane                                                                                                                                                                                                                 | Lit.  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 60 pacjentów NHL w stadium II-IV (z wyłączeniem chłoniaka histiocytarnego rozlanego): 44 pacjentów leczonych <i>de novo</i> oraz 16 pacjentów wcześniej leczonych, u których wystąpiła wznowa | TB-LDIR promieniowaniem $\gamma$ :<br>schemat A (35 pacjentów): 0,10 Gy dziennie, 5 dni w tygodniu przez 2–3 tygodnie, następnie przerwa w leczeniu i kolejna dawka 1–2 Gy podana w ten sam sposób;<br>schemat B (9 pacjentów): 0,15 Gy 2 razy w tygodniu do łącznej dawki 1,5 Gy, bez przerwy w leczeniu; 16 pacjentów otrzymało dodatkowe miejscowe RT w dawce 2–50 Gy | Wśród pacjentów leczonych <i>de novo</i> CR wystąpiła u 20 z 26 pacjentów (77%) z korzystną histologią oraz u 6 z 17 pacjentów (35%) z niekorzystną histologią; PR została osiągnięta u 6 z 27 pacjentów (22%) z korzystną histologią oraz u 11 z 17 pacjentów (65%) z niekorzystną histologią; brak oceny dotyczył tylko 1 pacjenta; wskaźniki przeżycia wśród pacjentów <i>de novo</i> z korzystną histologią wynosiły 74% po 2 latach, 56% po 5 latach i 32% po 10 latach | Trombocytopenia (<50 000 płytek/mm <sup>3</sup> ) u 15 pacjentów (34%) leczonych <i>de novo</i> ; 4 prawdopodobne przypadki choroby mieloproliferacyjnej, które rozwinęły się 2,7–6 lat po TB-LDIR; brak przypadków wtórnej białaczki | [122] |
| 84 z NHL w stadium III lub IV                                                                                                                                                                 | 44 pacjentów: TB-LDIR promieniowaniem X w dawce 0,1 Gy na frakcję, 3 razy w tygodniu, do łącznej dawki 2,5 Gy, następnie RT powoli zmniejszających się mas nowotworowych w dawce 15–25 Gy przez 2–2,5 tygodnia<br>40 pacjentów: 8 cykli CT, a następnie miejscowa RT w dawce 25–30 Gy w frakcjach 1,5–2,0 Gy                                                             | W grupie pacjentów leczonych TB-LDIR (42 ocenianych pacjentów) CR wystąpiła u 15 pacjentów (36%), PR u 17 pacjentów (40%), a brak oceny dotyczył 7 pacjentów (17%); w grupie pacjentów leczonych CT (36 ocenianych pacjentów) CR uzyskano u 20 pacjentów (55%), PR u 5 pacjentów (14%), a brak oceny u 10 pacjentów (17%); ORR (całkowity odsetek odpowiedzi) wyniósł 76% dla pacjentów leczonych TB-LDIR i 69% dla pacjentów leczonych CT                                   | Pacjenci leczeni TB-LDIR: trombocytopenia i leukopenia zależne od dawki, które w większości przypadków ustępowały samoistnie                                                                                                          | [100] |

**Tabela 2.** Badania kliniczne dotyczące TB-LDIR i HB-LDIR promieniowaniem X lub gamma u pacjentów z różnymi nowotworami c.d.

| Pacjenci/<br>schorzenia                                                                                                                                                     | Schemat terapii                                                                                                                                                                                                                               | Wyniki                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Działania niepożądane                                                                                            | Lit.       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 40 pacjentów z CLL w stadium I-IV (15 otrzymało wcześniejszą CT lub miejscową RT) oraz 41 pacjentów z NHL niskiego stopnia w stadium III-IV (14 po wcześniejszej CT lub RT) | TB-LDIR promieniowaniem X w dawce 0,15 Gy dwa razy w tygodniu do łącznej dawki 1,5 Gy podanej w ciągu 5 tygodni, a następnie, po 2 miesiącach, 6–9 cykli CT (prednimustyna, 100 mg/m <sup>2</sup> doustnie przez 5 dni co 4 tygodnie)         | Pacjenci z CLL: ORR wyniósł 85% (91% u pacjentów powyżej 65. roku życia i 78% u pacjentów poniżej 65. roku życia); CR wystąpiła u 5 pacjentów (12,5%), a PR u 29 pacjentów (72,5%); wskaźnik odpowiedzi wynosił 55% u pacjentów bez wcześniejszego leczenia i 30% u pacjentów wcześniej leczonych;<br>Pacjenci z NHL: ORR wyniósł 83%; CR wystąpiła u 10 pacjentów (24%), a PR u 24 pacjentów (58%); wskaźnik odpowiedzi wynosił 56% u pacjentów bez wcześniejszego leczenia i 27% u pacjentów wcześniej leczonych | Odwracalna trombocytopenia, anemia i leukopenia wystąpiły u 72–73% pacjentów z CLL oraz u 50–59% pacjentów z NHL | [101]      |
| Około 200 pacjentów z NHL w stadium I i II                                                                                                                                  | TB-LDIR lub górne HB-LDIR promieniowaniem X w dawkach frakcjonowanych 0,1 Gy lub 0,15 Gy (2–3 razy w tygodniu), odpowiednio 15 lub 10 razy przez 5 tygodni, a następnie miejscowa RT w dawce 2 Gy (5 razy w tygodniu przez 6 tygodni) oraz CT | 5-letnie przeżycie wyniosło 84% u pacjentów leczonych TB/HB-LDIR, w porównaniu do 65% u pacjentów leczonych wyłącznie miejscową RT oraz 70% u pacjentów poddanych miejscowej RT w połączeniu z CT; po 9 latach wszyscy pacjenci z grupy 84% nadal żyli, podczas gdy tylko 50% pacjentów przeżyło po leczeniu samą miejscową RT                                                                                                                                                                                     | Łagodna i przejściowa trombocytopenia oraz limfopenia                                                            | [108, 109] |
| 26 wcześniej nieleczonych pacjentów z NHL niskiego stopnia w stadium I (10 przypadków) i stadium II (16 przypadków)                                                         | TB-LDIR promieniowaniem X lub γ w 2 cyklach po 0,75 Gy, podawanych w 5 frakcjach tygodniowo, z 2-tygodniową przerwą między cyklami, a następnie po 1 miesiącu miejscowa IFRT w dawce 40 Gy w 20 frakcjach                                     | Po samym TB-LDIR CR wystąpiła u 24 pacjentów (92%); po TB-LDIR + IFRT CR osiągnięto u 25 pacjentów (96%); łącznie 19 pacjentów pozostawało przy życiu po medianie 56,2 miesiąca bez oznak choroby                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Doskonała tolerancja kliniczna TB-LDIR                                                                           | [102]      |

**Tabela 2.** Badania kliniczne dotyczące TB-LDIR i HB-LDIR promieniowaniem X lub gamma u pacjentów z różnymi nowotworami c.d.

| Pacjenci/<br>schorzenia                                                                                                                            | Schemat terapii                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Wyniki                                                                                                                                                                                                                                                              | Działania niepożądane                                                                                                                              | Lit.  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 36 pacjentów z NHL o wysokim stopniu złośliwości po 6–8 cyklach standardowej CT (CHOP)                                                             | 4–6 tygodni po ostatnim cyklu CHOP TB-LDIR promieniowaniem $\gamma$ : 2 cykle po 4-dzienne frakcje po 0,2 Gy, oddzielone 2-tygodniową przerwą (łącznie dawka 1,6 Gy podana w ciągu 4 tygodni);<br>4–6 tygodni po TB-LDIR pacjenci z maszyną chorobą otrzymali IFRT do pierwotnych miejsc zajętych nowotworowo                                       | 3-letnie przeżycie wolne od choroby wyniosło $61 \pm 9\%$ , a całkowite przeżycie $87 \pm 6\%$ pacjentów                                                                                                                                                            | Prześciowa trombocytopenia i leukopenia niewymagające przetoczeń ani czynników wzrostu; przejściowe podwyższenie enzymów wątrobowych u 5 pacjentów | [106] |
| Pacjent z WM (makroglobulinemią Waldenströma) po 6-miesięcznej kuracji CT (chlorambucyl i prednizon)                                               | TB-LDIR promieniowaniem $\gamma$ w dawce 0,15 Gy/d, dwa razy w tygodniu, przez dziesięć sesji do łącznej dawki 1,5 Gy                                                                                                                                                                                                                               | Rok 2003: pacjent bezobjawowy w odniesieniu do WM                                                                                                                                                                                                                   | Poza przejściową trombocytopenią i leukopenią nie odnotowano żadnych ostrych ani późnych skutków ubocznych                                         | [140] |
| 45 pacjentów z czerniakiem przerzutowym                                                                                                            | TB-LDIR promieniowaniem $\gamma$ w dawkach frakcyjnych 0,1 Gy w dniach 1, 8, 22 i 30, w połączeniu z podskórnym IL-2; jeden cykl leczenia obejmował 5 tygodni terapii, po których następowała 2-tygodniowa przerwa                                                                                                                                  | PR wystąpiła tylko u 2 pacjentów (4%), brak oceny dotyczył 13 pacjentów (29%), a progresja choroby u 30 pacjentów (67%); mediana całkowitego przeżycia wyniosła 5,8 miesiąca                                                                                        | Łagodne nudności u 73% pacjentów, wymioty u 68%, zmęczenie u 57%, biegunka u 43% oraz hipotensja u 25% pacjentów                                   | [106] |
| 58 pacjentów z nawrotowym/opornym na leczenie NHL niskiego stopnia (45 pacjentów otrzymało $\geq 3$ cykle CT, a 40 z 58 miało zły stan sprawności) | 2 cykle TB-LDIR promieniowaniem $\gamma$ : 0,8 Gy na cykl, podawane przez 4 dni w dawce 0,2 Gy/d, z 2-tygodniową przerwą między cyklami (łącznie dawka 1,6 Gy w ciągu 4 tygodni);<br>4–6 tygodni później 20 pacjentów dodatkowo leczonych IFRT do maszynych zmian w średniej dawce $32 \pm 4$ Gy, podawanej w frakcjach 1,8–2 Gy, 5 razy w tygodniu | ORR wyniósł 69%, w tym CR u 14 pacjentów (24%), PR u 26 pacjentów (45%), stabilna choroba u 12 pacjentów (21%) oraz progresja choroby u 6 pacjentów (10%); mediana przeżycia wolnego od progresji wyniosła 14 miesięcy, a mediana całkowitego przeżycia 39 miesięcy | Leukopenia u 13 pacjentów, anemia u 11 pacjentów, trombocytopenia u 8 pacjentów, o medianie czasu trwania odpowiednio 5, 9 i 12 tygodni            | [107] |

**Tabela 2.** Badania kliniczne dotyczące TB-LDIR i HB-LDIR promieniowaniem X lub gamma u pacjentów z różnymi nowotworami c.d.

| Pacjenci/<br>schorzenia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Schemat terapii                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Wyniki                                                                                                                                                                                                              | Działania niepożądane                                                                                                                                                                      | Lit.      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2 pacjentów z rakiem prostaty: 1. przypadek – 60-letni pacjent po wycięciu prostaty; 2. przypadek – 54-letni pacjent z nieoperacyjnym, końcowym stadium raka z przerzutami do kości                                                                                                                                                                                                                                                | 1. pacjent: TB-LDIR promieniowaniem X w dawce 0,15 Gy raz w tygodniu przez 30 tygodni;<br>2. pacjent: TB-LDIR promieniowaniem X w dawce 0,15 Gy trzy razy w tygodniu przez 10 tygodni, dodatkowo materiał radonowy umieszczony pod łóżkiem na 6 godzin każdej nocy przez 10 miesięcy                                                                                                                                                       | 1. pacjent: redukcja poziomu PSA z >5 do 0,085 do 6. cyklu leczenia;<br>2. pacjent: redukcja poziomu PSA z 4,8 do 0,008 wraz z widocznym zanikiem przerzutów do kości                                               | Nie zgłaszano                                                                                                                                                                              | [110]     |
| Pacjenci z nowotworami litymi: 4 pacjentów z zaawansowanymi nowotworami jelita grubego, wątroby, płuc i macicy z przerzutami (wszyscy wcześniej leczeni CT lub miejscową RT) oraz 2 pacjentki z zaawansowanym rakiem piersi: 42-letnia kobieta z przerzutem do mózgu bez wcześniejszego leczenia oraz 47-letnia kobieta z przerzutami do kości, u której rak piersi został zdiagnozowany 5 lat wcześniej i leczony był hipertermią | Kilkutygodniowa terapia radonowa obejmująca: a) „Pokój radonowy” – ekspozycja na zewnętrzne promieniowanie $\gamma$ oraz inhalacja radonu przez 40 minut dziennie, 4 razy w tygodniu lub co drugi dzień (pacjenci z rakiem piersi, jelita grubego i macicy); b) Inhalacja radonu z aparatu $\alpha$ -Radiorespiro- $^{222}\text{Rn}$ 40 minut, 3 razy w tygodniu lub co drugi dzień (pacjenci z rakiem piersi, wątrobowokomórkowym i płuc) | CR i/lub PR i poprawa ogólnego stanu zdrowia oraz wyników badań laboratoryjnych u wszystkich pacjentów; leczenie pacjenta z rakiem wątrobowokomórkowym zakończono, gdy w obrazie PET nie było cech aktywnej choroby | Brak poważnych skutków ubocznych: nawet po 4 miesiącach inhalacji radonu (najpierw przy 1 MBq/m <sup>3</sup> , a następnie przy 6 MBq/m <sup>3</sup> ) nie wystąpiły działania niepożądane | [71, 112] |

## **7. Publikacje**

## 7.1. Publikacja nr 1

Marek K. Janiak, Mateusz Pociągiew, James S. Welsh

# **Time to rejuvenate ultra-low dose whole-body radiotherapy of cancer**

*Critical Reviews in Oncology/Hematology 2021*



## Time to rejuvenate ultra-low dose whole-body radiotherapy of cancer

Marek K. Janiak<sup>a,\*</sup>, Mateusz Pocięgiel<sup>a</sup>, James S. Welsh<sup>b</sup><sup>a</sup> Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Warsaw, Poland<sup>b</sup> Loyola University Chicago, Edward Hines Jr., VA Hospital, Stritch School of Medicine, Department of Radiation Oncology, Maywood, IL 60153, USA

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Ultra-low ionizing radiation  
Total-body exposures  
Cancer radiotherapy

## ABSTRACT

The results of clinical trials performed from the 1930s until the end of the 20th century in which total-body ultra-low level ionizing radiation (TB-LLR) was used demonstrate that this form of treatment can be equal or superior to other systemic anti-neoplastic modalities in terms of the rates of remissions, toxicity, and side effects. In this review, we provide the rationale for TB-LLR and analyze the results of reliable clinical trials in patients with predominantly lymphoproliferative disorders but also advanced solid cancers. The doses used in these trials did not exceed 0.1–0.2 Gy per fraction and cumulative totals ranged from 1 to 4 Gy. Based on the reviewed results we conclude that it is appropriate to revive interest in and resume clinical investigations of TB-LLR in order to refine and improve the effectiveness of such treatment, whether employed alone or in combination with other anticancer strategies.

## 1. Background and rationale

One of the major methods of cancer treatment is radiation therapy (radiotherapy, RT) which employs ionizing radiation delivered at doses that kill malignant cells. Currently, RT is used routinely as a standard treatment for more than 50 % of cancer patients (Delaney et al., 2005; Jaffray, 2012; Yaromina et al., 2012). Conventional high-dose radiation therapy can be curative in a number of radiosensitive neoplasms if they are localized to one major area of the body. The typical total dose (in standard 1.8 Gy–2 Gy fractions) for a solid epithelial tumor (a carcinoma) ranges from 60 to 80 Gy, while bulky lymphoma sites are irradiated at doses from 20 to 40 Gy (again in 1.8 Gy–2 Gy fractions) (Kimball and Webb, 2013). The total dose is fractionated to afford normal cells time to recover, while tumour cells are generally less efficient in repair between fractions. Fractionation also allows malignant cells that were in a relatively radio-resistant phase of the cell cycle during one treatment to move into a sensitive phase of the cycle before the next fraction is given. Similarly, tumour cells that were chronically or acutely hypoxic (and therefore more radioresistant) may reoxygenate between fractions, improving the tumour cell kill (Ang, 1998).

Over recent years much attention has been focused on yet another aspect of radiotherapy, i.e. its effects on the immune system, a crucial player in any organism's control over the development of neoplasms (Corthay, 2014). After years of controversies, the early concept of cancer

immunological surveillance, whereby specifically stimulated (adaptive) immunity wards off proliferation of neoplastically transformed cells, has now been incorporated into the modern concept of cancer immunoeediting. During the three phases of this process, both the tumour-associated immune system (TAIS) and immunogenic properties of cancer cells are being gradually 'edited.' As a result, various elements of TAIS which protect the host against the development of a malignancy during the initial 'elimination' phase (and later, during the following 'equilibrium' and particularly 'escape' phases), morph into active supporters of cancer progression and the tumour cells become more and more resistant to assaults from the TAIS. Consequently, the growing tumour not only evades immune recognition and destruction, but also actively contributes to remodeling of its microenvironment towards the immunosuppressive and pro-neoplastic state (Dunn et al., 2002, 2004; Schreiber et al., 2011). This improved understanding of the relationship between a developing neoplasm and the immune system has shed new light on the recently acknowledged complex interactions of ionizing radiation with cancer-related immunity. This, in turn, has led to the development of novel radiotherapeutic schemes based on the notion that local exposures at moderate (between 0.2 and 2.0 Gy absorbed during a short time, i.e., acute, exposures) or even higher (over 2.0 Gy) doses of radiation can, especially in combination with standard immunotherapy, stimulate various anti-neoplastic immune reactions, and/or reverse the suppressed state of TAIS. These effects are thought to result from the

\* Corresponding author at: Dept. of Radiobiology and Radiation Protection, Military Institute of Hygiene and Epidemiology, 4 Kozielska St., 01-163, Warsaw, Poland.

E-mail address: [janial269@gmail.com](mailto:janial269@gmail.com) (M.K. Janiak).

<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103286>

Received 23 July 2020; Received in revised form 11 December 2020; Accepted 27 February 2021

Available online 2 March 2021

1040-8428/© 2021 Published by Elsevier B.V.

radiation-induced 'immunogenic' cell death, inflammation, and tissue injury, all leading to the emergence of 'danger signals' which prompt anti-cancer functions of various elements of the immune system (Janiak et al., 2017; Griffin et al., 2020). It is currently believed that RT-activated immunity is responsible for regression of non-irradiated metastatic lesions outside of the irradiated field (the abscopal effect) (Yilmaz et al., 2019).

However, radiotherapy at moderate to high doses is potentially harmful to normal cells and tissues and may lead to immunosuppression and/or the development of secondary cancers (Tubiana, 2009; Gudowska et al., 2014; Casey et al., 2015; Ng and Shuryak, 2015). Nevertheless, such untoward effects are highly unlikely after exposures at low doses or dose rates (i.e., at  $\leq 0.1$  Gy absorbed acutely or at rates of  $\leq 0.1$  mGy/min applied during a protracted exposure) of low linear energy transfer (LET) ionizing radiation (X- or  $\gamma$ -rays), hereafter referred to as low-level radiation (LLR). It has been demonstrated that the effects of LLR, including modulation of the immune functions, qualitatively and quantitatively differ from those induced by moderate-to-high doses of X- or  $\gamma$ -rays (Albrecht et al., 2011; Yu et al., 2013; Wodarz et al., 2014; Yang et al., 2016). Notably, single or multiple exposures to LLR (delivered over many weeks and totaling 1–4 Gy) can be safely applied to hemi-body or whole-body, making it a good treatment of choice for patients with systemic neoplasms such as lymphomas and leukaemias or solid tumours with multiple metastases. Indeed, as evidenced by results of many epidemiological and experimental studies, including our own, total-body exposures to LLR (TB-LLR) can inhibit or retard the development of both primary and metastatic cancers in various oncological settings (Janiak et al., 2017; Yang et al., 2016). The possible mechanisms by which such protective effects are mediated involve LLR-induced scavenging of reactive oxygen intermediates, stimulation of the repair of the DNA damage (including that caused by normal metabolism and proliferation of a cell), mitigation of inflammation, triggering of selective apoptosis and/or senescence of aberrant cells and, last but not least, triggering and amplifying the function of the immune system (Bauer, 2007; Scott, 2008, 2014; Feinendegen et al., 2012; Cui et al., 2017). In fact, it has been repeatedly demonstrated that whole-body exposures of mice and rats to LLR stimulate both the innate and adaptive arms of anti-cancer immunity including the activity of various subsets of T, B and NK lymphocytes, macrophages, dendritic cells, neutrophils, mast cells, and other elements of the immune system (Janiak et al., 2017; Yang et al., 2016; Cui et al., 2017). Arguably, stimulation of anti-neoplastic immunity has been responsible for the effectiveness of whole- and half-body irradiations at low doses of X- or gamma-rays of oncological patients performed for over one hundred years (see the data below and in Table 1).

## 2. Methods

For the purpose of this review we conducted a PubMed search as a starting point but we also searched other databases such as Cochrane Library, Medline, and Google Scholar. In all the search queries we covered the period from the beginning of the 20th century until 2020. As a search strategy, a combination of terms such as low level or low dose total/whole-body radiation with cancer/malignancy treatment and radiotherapy was employed. The selected articles were classified according to the presupposed criteria of the ultra-low doses, i.e., those which for the short-term exposures did not markedly exceed 0.1 Gy per fraction delivered to either a whole or half of the patient's body. This way, many papers with titles or abstracts alluding to "low" doses which did not meet these criteria were disregarded. In the great majority of the cases only references for which full texts could be obtained were reviewed.

As experts in the field, we are aware of several references that are not routinely carried in the popular search engines. Many of the older papers have been overlooked so we have resurrected them from other papers and included them in this review. We did not restrict ourselves

exclusively to prospective randomized clinical trials but we also included reliable single-institution series, retrospective reviews, phase I/II studies, and case reports to make this review as comprehensive as possible. The results of the search have been presented in Table 1, which is composed of the most important and relevant findings including patients' characteristics, treatment schemes and results and side effects thereof, with special emphasis on the comparison of these with the effects of systemic chemotherapy and/or local high-dose radiotherapy. The extended description of the results of the critical trials has been included in chronological order in the main text of the review.

## 3. The past and present of clinical trials

The concept of total-body irradiations (TBI) with X-rays is an old idea. In fact, in view of the early recognized widespread nature of many human malignancies the idea was hit upon soon after the Roentgen's discovery and already in 1905 first arrangement of three low voltage X-ray tubes distributed around a room to achieve uniform irradiation of a centrally placed patient was designed in Germany. This set-up was soon used by Friedrich Dessauer to treat human patients (Dessauer, 1905). The results of that first reported clinical trial were encouraging, but the initial enthusiasm was abated by the discovery of suppressive effects on the haematopoietic system. A little later, in the early 1920s, Chaoul and Lange reported in Berlin on the effects of *teleroengenotherapy* of patients with advanced Hodgkin's disease. All twelve patients so treated showed 'restoration to their full working capacity' and ten of them remained free from recurrence for 2.5 years on average (Chaoul and Lange, 1923). In the second half of the 1920s, Werner Teschendorf treated patients with leukemias, lymphomas, and polycythemia using one X-ray tube to deliver 200–250 R (roughly equivalent to 2–2.5 Gy) to the patients' whole bodies. The author noted 'greater remission periods in these diseases then by using small ports in the ordinary way' (Teschendorf, 1927). On the turn of 1920s and 1930s Schwartz obtained 'excellent results' in patients with slowly developing Hodgkin's disease after eight to ten exposures to 'small protracted roentgen-ray dosage' given within 14 days (Schwartz, 1930). Also, Frimann-Dahl and Forsberg, who exposed the entire bodies of patients with leukemias to 'interrupted dosage' of X-rays at about 0.75–6 Gy delivered daily over the period from four days to five weeks, concluded that 'general irradiation (meaning TBI) is superior to local roentgenotherapy because it is more lenient, enabling the patient to keep up his work longer' (Frimann-Dahl and Forsberg, 1931). The encouraging results of these trials prompted physicians in other European countries, such as Norway, France, Austria, Belgium, and Italy, to use subtotal- and total-body X-ray irradiations of patients with various haematological malignancies (Dale, 1931; Devois, 1931; Sluys, 1931; Pulsford, 1932; Palmieri, 1933; Mallet, 1936; Sgalitzer, 1936; Jacob, 1939; Marqués and Betoulhières, 1949).

In the USA, the first systematic clinical trials with total-body exposures to ionizing radiation were conducted in the early 1930s by Arthur C. Heublein. For these trials patients at the Memorial Hospital of New York were placed in beds in a specially built 'lead-lined radiation ward' and irradiated either continuously or intermittently from a Coolidge therapy tube. Altogether, 13 patients with lymphomas or leukemias and 17 patients with disseminated solid cancers were exposed to X-rays at dose-rates of approximately 0.01 Gy/h (continuous irradiation) and 0.3 Gy/h (intermittent irradiation) up to the total absorbed doses of about 0.4–1.9 Gy and 7.5–10 Gy, respectively (Heublein, 1932). As reported by the author 'definite regressions have been noted in the radiosensitive group of cases' including both haematological and solid cancer patients who showed 'no depression in the number of white cells' after 'administration of amounts of radiation ranging from 5 to 25 per cent of an erythema dose (i.e., about 7.5 Gy) to the entire body.' In summary, Heublein wrote that although the number of cases in both groups of the patients was too small to permit any definite conclusions 'the evidence accumulated thus far fully warrants the continuation of the experiment with increasing dosage, within safe limits.' Unfortunately, these trials

**Table 1**

Reported reliable clinical trials with total- or hemi-body irradiations with X- or gamma-rays in patients with various malignancies.

| Patients/diseases                                                                                                                                                                               | Treatment                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Results                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Side effects                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Ref.                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 13 patients with lymphomas or leukemias and 17 patients with disseminated solid cancers                                                                                                         | a) long distance continuous irradiation with X-rays at dose rate of approx. 0.01 Gy/h up to total of 0.38–1.9 Gy delivered over 7.5–13.9 days (20 patients); b) short distance (intermittent irradiation with X-rays at dose rate of approx. 0.3 Gy/h up to total of 7.5–10 Gy delivered over 12–24 days (10 patients)                                                                                                                                                  | a) "distinct improvement" in 2 breast ca cases (out of 8 solid cancer patients), in 1 lymphatic leukemia and 1 HD patient; "partial improvement" in 1 case of lymphatic leukemia b) CR in 3 out of 9 patients with solid cancer.                                                                                                                       | "repeated blood counts and other tests have, in all instances, failed to show any consistent change that could be ascribed to radiation effect, except in the leukemias, in which the usual decrease in the number of white cells has occurred. There has been no instance of marked drop in blood platelets nor has purpura hemorrhagica occurred in any case; with the administration of amounts of radiation ranging from 5 to 25 per cent of an erythema dose to the entire body, there has been no depression in the number of white cells." | (Heublein, 1932)            |
| 270 patients with a variety of tumours (lymphomas, leukemias, multiple myelomas, carcinomas, sarcomas)                                                                                          | TBI with X-rays at 0.5–0.75 Gy ("Heublein technique") usu. after local X-ray therapy                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | patients with lymphomas exposed earlier to local X-ray therapy had both longer survival and longer-lasting remissions than patients who received only local X-ray irradiation.                                                                                                                                                                         | NR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | (Medinger and Craver, 1942) |
| 163 patients with granulocytic and lymphocytic CL                                                                                                                                               | TBI with X-rays at 0.1–0.2 Gy/exposure given in 6–17 individual exposures to total doses of 0.9–3.5 Gy (23 patients) or equivalent internal TBI by iv injection of $P^{32}$ (140 patients)                                                                                                                                                                                                                                                                              | survival of the low-level radiation-treated patients "significantly better than that for a collected series including all radiation treated cases reported in the literature from 1925 to 1951"; no significant difference between the effects of X-rays and $P^{32}$                                                                                  | "no radiation sickness"                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | (Osgood et al., 1955)       |
| 52 patients: 7 with CL, 8 with AL, 15 with lymphoma, 16 with advanced solid tissue cancer, 6 with polycythemia vera                                                                             | single or fractionated TBI with X-rays at 0.05 to 1 Gy (CL and lymphoma patients), 3 Gy (AL patients), 3–8 Gy solid cancer patients)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | among the 7 CL patients: excellent response (in terms of survival) in 1 patient, good response in 2 patients and questionable response in 1 patient                                                                                                                                                                                                    | nausea and/or vomiting in 18 patients, transient TCP and lymphocytopenia, otherwise no serious side effects                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | (Jacobs and Maraso, 1965)   |
| 19 patients: 7 with CLL, 5 with generalized lymphoma, 3 with mycosis fungoides, 2 with AL, 1 with mixed lymphoma, 1 with macroglobulinaemia                                                     | TBI with X-rays at 0.05–0.2 Gy/ daily for several days to total of 1–4 Gy or 0.1–0.2 Gy given bimonthly                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | "satisfactory improvement" (a minimum decrease of 75 % in clinically measurable disease + symptomatic improvement) in 5 CLL patients, 4 lymphoma patients (in 3 without prior CT or RT) and 1 AL patient                                                                                                                                               | except for transient TCP and lymphocytopenia no significant symptoms or side effects                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | (Johnson, 1966)             |
| 27 patients with stage III and IV (marrow) previously untreated NHL                                                                                                                             | 18 patients treated with either TBI alone (γ-rays at 0.1 Gy daily 3–5 times/ wk to total of 1–3 Gy) or with TBI followed 3 mos. later by TNI (at total of 20–35 Gy applied in daily fractions of 1.5–2 Gy)                                                                                                                                                                                                                                                              | CR in 25 (93 %) patients; median duration of unmaintained remission = 26 months                                                                                                                                                                                                                                                                        | transient bone marrow depression requiring blood transfusion in 4 of the 18 patients treated with either TBI alone or with TBI + TNI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | (Johnson, 1972)             |
| 61 patients (37 males and 24 females) with CLL                                                                                                                                                  | a "life-time" series of X-ray irradiations consisting of: 1) 10 daily TBI at 0.1 Gy, 2) 1 weekly TBI at 0.05 Gy, 3) an annual "booster" of 10 daily TBI at 0.1 Gy, and 4) regional irradiation of spleen or lymph nodes as required. Patients kept on this regimen for 3–7 y (total doses of 11–28 Gy)                                                                                                                                                                  | average survival 46 mo, with a maximum of 15 y, a 5-y survival of 21% of patients                                                                                                                                                                                                                                                                      | transient leukopenia and TCP; autopsies performed in 1/3 of the patients revealed "no instance of untoward radiation effects in BM or other structures examined."                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | (Del Regato, 1974)          |
| 65 (59 evaluable) patients with lymphocytic lymphoma (20 stage III and 45 stage IV) randomized to treatment with CT or RT; 27 evaluable combined (CVP) CT patients and 32 evaluable RT patients | RT group: only TBI (0.1 Gy of γ-rays daily for 3–5 days/wk to total of 1–5 Gy) in 21 patients; only TNI (20–30 Gy within 2–4 weeks) in 6 patients; TNI preceded by TBI (at a total dose of 1.5 Gy) in 2 patients; either HBI or TNI + localized irradiation in 4 patients; CT group: 32 patients given cytosan (400 mg/m <sup>2</sup> x 5 p.o.) + vincristine (1.4 mg/m <sup>2</sup> i.v. on day 1) + prednisone (100 mg/m <sup>2</sup> x 5 p.o.) – 6 times every 21 d. | RT group: CR in 18 (56 %) patients (9 relapsed with a median duration of remission = 22–31 mos), PR in 8 (25%) patients, NE in 6 (19%) patients – no data on CR and PR in patients treated solely with TBI; CT group: CR in 15 (55%) patients (7 relapsed with a median duration of remission >12 mos), PR in 9 (33%) patients, NE in 3 (11%) patients | toxicity of TBI as described above by Johnson 1972; toxicity of the CVP regimen: granulocytopenia following each cycle and TCP < 100,000 mm <sup>3</sup> (rare in the first 6 cycles); neurotoxicity of some degree                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | (Canebos et al., 1975)      |
| 39 patients with well (6) and poorly differentiated (23) lymphocytic lymphoma                                                                                                                   | 31 patients treated only with TBI (0.1 Gy of X- or γ-rays/ fraction to a total of 1.0–1.5 Gy), 8 patients treated with TBI followed by TNI (10 Gy to involved lymphatic areas)                                                                                                                                                                                                                                                                                          | CR in 68 % of TBI-only patients and in 75 % of TBI + TNI patients                                                                                                                                                                                                                                                                                      | "moderate-degree and transient hematological depression" induced by TBI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | (Johnson, 1975)             |

(Kazem, 1975)

(continued on next page)

Table 1 (continued)

| Patients/diseases                                                                                                                                                                              | Treatment                                                                                                                                                                                                                                                               | Results                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Side effects                                                                                                                                                                                                                                                 | Ref.                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 4 patients with stage III NHL: 2 with refractory CLL, 2 with disseminated mycosis fungoides, 1 with post-CT relapsed end-stage reticulum cell sarcoma                                          | TBI at doses 0.15 Gy of $\gamma$ -rays daily for 5 d, then at 0.1–0.15 Gy every other d, or at longer intervals over 5–12 wk to total doses of 2.0–2.65 Gy                                                                                                              | 80 %, 90 %, and 95 % “nodal regression” in 3 patients with previously untreated stage III NHL; PR in 4 <sup>th</sup> patient previously treated with CT, but the treatment stopped at 1.05 Gy due to persistent TCP; “dramatic regression” of active lesions all over the body of 1 patient with mycosis fungoides                                 | “no obvious subjective or objective complications” except for “moderate and reversible BM depression”                                                                                                                                                        |                                                |
| 51 patients with stage III and IV lymphocytic lymphoma who received TBI as the initial and only therapy                                                                                        | TBI with X-rays at 0.15 Gy twice weekly to 1.5 Gy total dose + IFRT in patients with persistent local tumours; initial 25 TBI-treated patients were compared to a matched group of patients treated with CVP                                                            | CR up to 80 % of the TBI-treated patients; with a median survival >32 mos and 83% and 68% actuarial survival at 3 y and 5-y, respectively; no statistical difference between the TBI and CT groups in terms of survival, but “the trend favored irradiation”                                                                                       | transient thrombocytopenia and leukocytopenia; no nausea, weakness, hair loss, or malaise                                                                                                                                                                    | (Chaffley et al., 1976; Chaffley et al., 1977) |
| 57 patients with progressive CLL: 42 patients treated only with TBI, 14 evaluable patients treated with TBI + CT                                                                               | TBI alone (42 patients): series of irradiations with 0.5 Gy of $\gamma$ -rays given in fractions (0.05–0.1 Gy daily, 3–5 times/week) separated by 4–8-wk intervals up to total doses of 1–4 Gy; TBI + CT (14 evaluable patients): 12 courses of CP and prednisone daily | TBI alone patients: CR in 14 (33 %) patients, PR in 23 (55 %) patients; median survival: 72 mo (patients with stage I-II disease) and 63 mo (patients with stage III-IV disease); TBI + CT patients: CR in 8 (57 %) patients, PR in 5 (36%) patients; median survival: not determined yet                                                          | TBI alone patients: modest anemia in 5% and modest thrombocytopenia in 15 % of the patients, no hemorrhagic problems; TBI + CT patients: “treatment tolerated extremely well, no hematologic toxicity requiring transfusion support”                         | (Johnson, 1976, 1979)                          |
| 48 patients with previously untreated stage III and IV lymphocytic, lymphoblastic, and mixed histology NHLs (15 with diffuse and 33 with nodular disease)                                      | TBI with X-rays at 0.15 Gy twice a week until 1.5 Gy or a hematologic depression; 25 patients were compared to a matched group of patients treated with CVP                                                                                                             | > 70 % actuarial survival of the first 25 patients treated with TBI alone vs. approx. 31 % survival of the matched 25 patients treated with combined CT (CVP)                                                                                                                                                                                      | in TBI patients: no nausea, vomiting, hair loss, or bleeding; toxicity limited to transient TCP                                                                                                                                                              | (Geffman et al., 1977)                         |
| 9 NHL patients: 7 with LL and 2 with HL who had previously failed on CT                                                                                                                        | TBI twice a week at 0.15 Gy of X-rays to a total dose of 1.2–1.8 Gy                                                                                                                                                                                                     | CR in 5 patients (71 %) with LL, PD in 1 patient with LL and in 2 patients with HL; NE in 1 patient with LL; clinical response correlated with restoration of mitogen proliferative responsiveness of circulating blood lymphocytes                                                                                                                | NR                                                                                                                                                                                                                                                           | (Vorinsky et al., 1978)                        |
| 58 previously untreated patients with stage III or IV NHL (43 patients with nodular and 15 with diffuse histology)                                                                             | TBI at 0.15 Gy of X-rays twice a week to a total of 1.5 Gy; (24 patients with persistent localized masses received additional local irradiation at 1.0–2.0 Gy)                                                                                                          | 30 patients (52 %) survived 8 y (57 % with nodular and 42 % with diffuse histology); 8-y relapse-free survival in 8 (14 %) patients (median time to relapse – 21 mos)                                                                                                                                                                              | thrombocytopenia (in all but 4 patients rebounded to near normal values within 1 mo); 2 cases of erythroleukemia (EL), both treated with a 2 <sup>nd</sup> course of TBI and combined CT before the development of EL                                        | (Carabelli et al., 1979)                       |
| 39 patients with advanced NHL: 38 with nodular (30) or diffuse (8) LL and 1 with nodular ML (28 patients with no previous treatment, 11 patients in relapse after CT or local RT)              | TBI at 0.10 or 0.15 Gy of $\gamma$ -rays twice a week to a total of 1.5 Gy                                                                                                                                                                                              | CR in 33 (85 %) patients with median duration 24 mos, PR in 6 (15%) patients                                                                                                                                                                                                                                                                       | significant thrombocytopenia (platelet count < 50,000 /mm <sup>3</sup> ) in 12 (31%) patients and significant leukopenia (WBC < 1,500/mm <sup>3</sup> ) in 3 (8%) patients; “no cases of myelogenous leukemia to date”                                       | (Choi et al., 1979)                            |
| 30 patients with stage III (6 cases) and IV NHL (24 cases); 11 patients had previous local RT (4), CT (6) or both (1)                                                                          | TBI with X-rays at 0.1 Gy 3 times a week until the total dose of 3.0 Gy;                                                                                                                                                                                                | CR in 10 of 19 (53 %)* of patients who had no previous treatment, but in 10 of 13 (77 %) non-leukaemic patients with no previous treatment *compared to ca. 40% treated with polyCT (de Vito et al. Lancet 1975)                                                                                                                                   | no vomiting or diarrhea, toxicity confined to hematological depression (generally acceptable in non-leukaemic patients, but severe in some leukaemic patients) TBI very well tolerated compared to CT; TBI may be applied if CT does not give full remission | (van Dijk-Mulder, 1979)                        |
| 33 patients with NHL: 30 with lymphocytic lymphoma (24 with poorly differentiated diffuse type and 6 with well-differentiated nodular type) and 3 with histiocytic lymphoma                    | TBI at 0.1 Gy of X-rays 3 times per week to total dose 1.8–2.2 Gy; 14 patients additionally treated with IFRT at 10–15 Gy                                                                                                                                               | CR in 25 (83 %) patients and PR in 5 (17 %) patients with lymphocytic lymphoma; 2 PR in 2 patients and NE in 1 patient with histiocytic lymphoma                                                                                                                                                                                                   | transient pancytopenia with thrombocytopenia – recovery in all but 2 cases; no other toxicity or malaise associated with TBI                                                                                                                                 | (Quinn, 1979)                                  |
| 48 previously untreated patients with stage II-IV NHL (63 % with nodular and 36 % with diffuse histology) and 15 patients previously treated with localized RT (6 patients) or CT (9 patients) | TBI at 0.1–0.15 Gy/d of $\gamma$ -rays 2–5 times per week to a total of 1–1.5 Gy; then after a 4–6-week split another course of TBI (16 patients with persistent localized masses received additional local irradiation at 1.0–2.0 Gy)                                  | CR in 80–85% of patients with nodular lymphoma and in 33–43% of patients with diffuse lymphoma; PR in 10–20% of patients with nodular and in 50–100% of patients with diffuse lymphoma; NE in 2 (4%) of all 48 patients (the 4-y actuarial survival was 71% for the nodular group and 57% for the diffuse group); patients previously treated with | TCP (<30,000 platelets/mm <sup>3</sup> ) in patients with both a positive BM and an enlarged spleen; no acute systemic side effects (i.e., nausea, vomiting, diarrhea, hair loss); no secondary leukemia seen                                                | (Thar et al., 1979)                            |

(continued on next page)

Table 1 (continued)

| Patients/diseases                                                                                                                                                                                                                                                                | Treatment                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Results                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Side effects                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Ref.                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 26 patients with stage III (6 cases) or stage IV (20 cases) NHL previously treated with CT and/or local RT                                                                                                                                                                       | 20 patients: TBI with $\gamma$ -rays at a total dose of 1.5 Gy given in 15 fractions, 5 patients: TBI at a total dose of 1.25 Gy given in 11 fractions; 1 patient TBI at a total dose of 1.2 Gy given in 14 fractions + HBI at 0.6 Gy                                                                                                      | RT or CT: CR in 60%, PR in 13%, NE in 26% of the patients (actuarial survival = 55% at 2 y) CR in 6 (23 %) and PR in 11 (42 %) of the patients; actuarial survival = 55 % at 1 y and 42 % at 30 mos                                                                                                                                                                                                                                                             | TCP and less pronounced leukopenia 3–6 wks after completion of TBI ("apparently influenced by previous cytotoxic therapy") with return to normal 3–4 wks later; apart from some minimal hair loss no other side effects, including no GIT; "no serious sequelae"                                                                                    | (Rees et al., 1980)       |
| 37 patients with advanced NHL (22 with nodular and 15 with diffuse type); 31 with lymphocytic lymphoma, 4 with mixed lymphocytic-histiocytic lymphoma and 2 with undifferentiated lymphoma; 24 patients without previous therapy and 13 in relapse after previous CT or local RT | TBI at 1.5 Gy of X-rays in mid-plane dose given in 10 fractions over 12 d (13 patients); PTBI at 1.5 Gy mid-plane dose in 10 fractions twice weekly for 5 wk (13 patients); HBI* at 3 Gy in 10 fractions for 12 d, other half 6–8 wks later (11 patients)                                                                                  | in patients with nodular disease: CR in 14 (64 %) and PR in 2 (9%) patients; in patients with diffuse disease: CR in 6 (40 %) and PR in 6 (40 %) patients, NE in 9 of all the patients; overall response rates: 80 % (12 of 15) for the diffuse and 73% (16 of 22); HBI more effective (64% CR and 16 mos median duration of response) compared to TBI (54% CR and 10 mos median duration of response) and PTBI (38% CR and 14 mos median duration of response) | TCP (<50,000 platelets/mm <sup>3</sup> ) in 14 (38%) patients, no serious bleedings                                                                                                                                                                                                                                                                 | (Dobbs et al., 1981)      |
| 51 patients with "favourable histology" stage III-IV NHL                                                                                                                                                                                                                         | 17 patients: TBI with X-rays (2–3 times/wk with a weekly dose of 0.3 Gy to a total of 1.5 Gy followed by a "boost" of 20–30 Gy in 2–3 wk to each site of pathologic involvement excluding BM); 17 patients: single alkylating (SA) agent (CY or chlorambucil) daily until CR; 17 patients: several cycles of CVP every 21–28 days until CR | TBI patients: initial CR (ICR) in 12 (70.1 %) patients; continuous CR (cCR) in 6 (35 %) patients; SA patients: ICR in 11 (65 %) and cCR in 6 (35 %) patients; CVP patients: ICR in 15 (88%) and cCR in 8 (47%) patients;                                                                                                                                                                                                                                        | in TBI with a "boost" patients: persistent cytopenia (either WBC count <3000/mm <sup>3</sup> or platelet count <100,000/mm <sup>3</sup> for $\geq$ 6 mo) in 5 (29%) patients; transient TCP (platelet count <50,000 mm <sup>3</sup> ) and leukopenia (WBC count <2000 mm <sup>3</sup> ) in 3 (17.6%) patients; no other serious maladies/toxicities | (Jørgensen et al., 1981)  |
| 91 patients with generalized NHL, HD, CLL, CML, myelomas, seminomas or SCLC (most of the NHL patients, all patients with HD and CLL and 2 of myeloma patients previously failed to respond to or recurred after previous CT and/or local RT)                                     | 29 patients given TBI (0.1 Gy daily to a total doses of 1–5 Gy without shielding of the skull and extremities); 62 patients given fractionated STBI (0.5 Gy daily for 5 d/wk up to the total of 1–40 Gy given as a single or repeated treatment)                                                                                           | long-term ("occasionally up to 17-y or permanent") remissions in patients with NHL, HD, leukemias, myelomas and seminomas treated with TBI or STBI                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | transient depression of peripheral blood counts in patients receiving 1–1.5 Gy at 0.1–0.15 Gy/d; otherwise "little or no treatment-induced symptomatology"                                                                                                                                                                                          | (Loeffler, 1981)          |
| 14 children with metastatic (stage IV) neuroblastoma                                                                                                                                                                                                                             | TBI with X-rays at 1.0–1.5 Gy/cycle in 0.5 Gy daily fractions delivered in 2–3 cycles along with 3-wk cycles of standard CT (vincristine, DTIC, cyclophosphamide)                                                                                                                                                                          | 4 of 12 (29 %) patients free of disease for 12+ to 31+ mo; 2 patients died of BM toxicity                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | pronounced TCP requiring platelet transfusions after the 2 <sup>nd</sup> and subsequent cycles of treatment; otherwise "most patients remained in good health"                                                                                                                                                                                      | (D'Angio and Evans, 1983) |
| 24 patients with high-risk Ewing's sarcoma (clinically radioresponsive)                                                                                                                                                                                                          | after 2–3 cycles of combined CT and 5 cycles of local RT patients were exposed to TBI at 0.15 Gy fractions of X-rays twice a week for 5 weeks to a total dose of 1.5 Gy followed by intensive CT and autologous BM transplant                                                                                                              | CR in 20 (83 %) patients (approx. 70 % of the patients relapsed and died)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | "TBI was well tolerated. An occasional patient required an oral antiemetic to control nausea, but no significant vomiting, abdominal cramping or diarrhea occurred."                                                                                                                                                                                | (Kinsella et al., 1983)   |
| 108 patients newly diagnosed with indolent lymphoproliferative diseases: CLL (41 cases), stage III and IV well-differentiated LL (21 cases), and stage III and IV PL (46 cases)                                                                                                  | 54 patients exposed to TBI with $\gamma$ -rays (0.15 Gy 2x/wk to total of 1.5 Gy) and 54 patients treated with CT (chlorambucil 0.15–0.2 mg/kg orally/d to hematologic tolerance + prednisone 0.5 mg/kg orally/d for the 1 <sup>st</sup> mo)                                                                                               | CR of 59 % and 52 % and median survival of 53 and 57 mo in CT and TBI patients, respectively; the equivalent outcomes remained after stratification into CLL, LL, and PL                                                                                                                                                                                                                                                                                        | negligible morbidity (myelotoxicity); no cases of acute leukemia in both groups of patients                                                                                                                                                                                                                                                         | (Jacobs and King, 1987)   |
| 68 NHL patients (34 with low, 10 with intermediate, and 19 with high grade malignancy); TBI the first treatment for 47 patients, 21 patients failed on CT or/and standard RT before being accepted for TBI                                                                       | TBI at 0.1 Gy of X-rays/fraction 3 times/wk., to total doses of 1.8–2.2 Gy                                                                                                                                                                                                                                                                 | 84 %, 42 %, and 40 % CR rates for low, intermediate, and high-grade NHL, respectively; better remission rates in patients exposed to TBI as the initial treatment than in the earlier pretreated patients                                                                                                                                                                                                                                                       | transient TCP and leukopenia; no other side effects such as nausea, vomiting, or hair loss                                                                                                                                                                                                                                                          | (Lybeert et al., 1987)    |
| 60 patients with stage II-IV NHL (excluding diffuse histiocytic lymphoma): 44 patients treated de novo (DN) and 16 treated previously and relapsed (PT)                                                                                                                          | TBI at 0.10 Gy of $\gamma$ -rays/d, five days/wk, for 2–3 wks followed by a treatment split and another 1–2 Gy delivered in the same manner (regimen A, 35 patients) or 0.15 Gy 2x/wk to a total of 1.5 Gy without a treatment split (regimen B, 9 patients); 16 patients additionally                                                     | DN patients: CR in 20 of 26 (77 %) and in 6 of 17 (35 %) patients with favourable (FH) and unfavourable (UH) histology, respectively; PR in 6 of 27 (22 %) and in 11 of 17 (65 %) patients with FH and UH, respectively; NE in only 1 patient; survival rates at 2-, 5-, and 10-y for                                                                                                                                                                           | TCP (< 50,000 platelets/mm <sup>3</sup> ) in 15 (34%) DN patients; 4 "probable cases" of MPD (developed 2.7–6 y after TBI); no secondary leukemia cases!                                                                                                                                                                                            | (Mendenhall et al., 1989) |

(continued on next page)

Table 1 (continued)

| Patients/diseases                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Treatment                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Results                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Side effects                                                                                                                                                                 | Ref.                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| patients with stage III or IV NHL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | treated with local "boost" RT at 2–50 Gy<br>44 patients: TBI at 0.1 Gy of X-rays/fraction 3 times/ wk., to a total of 2.5 Gy + booster RT to slowly re-gressing masses (15–25 Gy in 2–2.5 wks); 40 patients: 8 courses of CHVP followed by local RT (25–30 Gy in 1.5–2.0 Gy fractions)                                                                             | DN FH patients were 74%, 56%, and 32%, respectively;<br>TBI (42 evaluable patients): CR in 15 (36 %), PR in 17 (40 %), NE in 7 (17 %) patients; CT (36 evaluable patients): CR in 20 (55 %), PR in 5 (14 %), NE in 10 (17 %) patients; ORR: 76 % for TBI and 69 % for CT patients                                                                                                                                                                | in TBI patients: dose-dependent TCP and leukopenia, which recovered spontaneously in the majority of cases                                                                   | (Meerwaldt et al., 1991)                |
| 40 patients with stage I–IV CLL (15 received prior CT or local RT) and 41 patients with stage III–IV low grade NHL (14 with prior CT or RT)                                                                                                                                                                                                            | TBI with X-rays at 0.15 Gy 2x/wk to a total of 1.5 Gy given over 5 wk followed 2 mo later by 6–9 courses of CT (prednisone, 100 mg/m <sup>2</sup> orally for 5 d every 4 wk)                                                                                                                                                                                       | CLL patients: overall response rate = 85 % (91 % and 78 % in patients above and below 65 years of age, respectively); CR in 5 (12.5%) and PR in 29 (72.5%) patients (55% and 30% response rates in patients without and with previous treatment, respectively); NHL patients: overall response rate = 83% (CR in 10 (24%) and PR in 24 (58%) patients (56% and 27% response rates in patients without and with previous treatment, respectively) | reversible TCP, anemia and leukopenia in 72–73% and in 50–59% of the CLL and NHL patients, respectively                                                                      | (Boncadin et al., 1994)                 |
| about 200 patients with stage I and II NHL                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | TBI or upper HBI at 0.1 Gy or 0.15 Gy fractions of X-rays (2–3 times/wk) 15 or 10 times for 5 wk, respectively, followed by local RT at 2 Gy (5 times/wk for 6 wks) and CT ("in most cases")                                                                                                                                                                       | 5-y survival of 84 % patients treated with TBI/HBI compared to 65 % and 70 % surviving patients treated only with local RT and with local RT combined with CT, respectively; at 9 y all 84 % patients still alive while only 50 % patients alive after local RT alone                                                                                                                                                                            | mild and transient TCP and lymphopenia;                                                                                                                                      | (Sakamoto et al., 1997; Sakamoto, 2004) |
| 26 previously untreated patients with stage I (10 cases) and stage II (16 cases) low grade follicular NHL                                                                                                                                                                                                                                              | TBI with X- or γ-rays in 2 courses of 0.75 Gy in 5 fractions/wk separated by 2-wk rest followed 1 mo later by IFRT at 40 Gy in 20 fractions                                                                                                                                                                                                                        | after TBI only: CR in 24 (92 %) patients; after TBI + IFRT: CR in 25 (96 %) patients; 19 alive after a median of 56.2 mos with no evidence of disease                                                                                                                                                                                                                                                                                            | "excellent clinical tolerance" of TBI                                                                                                                                        | (Richard et al., 1998)                  |
| 36 patients with high grade NHL in CR after 6–8 cycles of standard CT (CHOP)                                                                                                                                                                                                                                                                           | 4–6 wk after the last CHOP course TBI with γ-rays: 2 courses of 4 daily fractions of 0.2 Gy separated by 2 wks of rest (a total dose of 1.6 Gy given over 4 weeks); 4–6 wks after TBI patients with bulky disease received IFRT to initial bulky sites                                                                                                             | 3-y DFS in 61 ± 9% patients and OS in 87 ± 6% patients                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | transient TCP and leukopenia requiring no transfusions or growth factors; transient elevation of liver enzymes in 5 patients                                                 | (Safwat et al., 2004)                   |
| a patient with Waldenström's macroglobulinemia (WM) after a 6-mo course of CT (chlorambucil and prednisone)                                                                                                                                                                                                                                            | Sept 1999: TBI with γ-rays at 0.15 Gy/d twice weekly for ten sessions to total dose of 1.5 Gy                                                                                                                                                                                                                                                                      | year 2003: patient asymptomatic with regards to WM                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | "other than transient TCP and leukopenia no acute or late side effects were noted"                                                                                           | (Welch, 2004)                           |
| 45 patients with metastatic melanoma                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | TBI at 0.1 Gy fractions of γ-rays on days 1, 8, 22, and 30; with subcutaneous IL-2; one treatment cycle included 5 weeks of treatment followed by a 2-wk break                                                                                                                                                                                                     | PR in only 2 (4%), patients NE in 13 (29 %) patients, PD in 30 (67%) patients; median OS = 5.8 mos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | low grade nausea in 73 %, vomiting in 68 %, fatigue in 57%, diarrhea in 43% and hypotension in 25% of patients                                                               | (Safwat et al., 2005)                   |
| 58 patients with relapsed/refractory low-grade NHL (45 patients had ≥ 3 courses of CT and 40 out of 58 had "bad performance status")                                                                                                                                                                                                                   | 2 cycles of TBI with γ-rays: 0.8 Gy/cycle given over 4 d at 0.2 Gy/d; the cycles separated by 2-w rest (total dose of 1.6 Gy over 4 w); 4–6 wks later 20 patients additionally treated with IFRT to bulky sites at mean dose of 32 ± 4 Gy given at 1.8–2 Gy/fraction, 5 times/wk                                                                                   | ORR = 69 %; CR in 14 (24 %), PR in 26 (45 %), SD in 12 (21 %) and PD in 6 (10 %) patients; median PFS = 14 mo, median OS = 39 mo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | leukopenia in 13 patients, anemia in 11 patients, TCP in 8 patients of median duration of 5, 9, and 12 wk, respectively                                                      | (Ohyoshi and Radwan, 2015)              |
| 2 patients with prostate cancer: 1 <sup>st</sup> case – a 60-y-old after extirpation of the prostate; 2 <sup>nd</sup> case – a 54-y-old with inoperable end-stage cancer with bone metastases                                                                                                                                                          | 1 <sup>st</sup> patient: TBI with X-rays at 0.15 Gy once a week for 30 weeks; 2 <sup>nd</sup> patient: TBI with X-rays at 0.15 Gy 3 times a week for 10 weeks + "radon sheet" placed under the bed for 6 h/night for 10 months                                                                                                                                     | 1 <sup>st</sup> patient: reduction of PSA level from >5 to 0.085 by the 6 <sup>th</sup> treatment; 2 <sup>nd</sup> patient: reduction of PSA level from 4.8 to 0.008 with apparent disappearance of bone metastases                                                                                                                                                                                                                              | NR                                                                                                                                                                           | (Kojima et al., 2017)                   |
| patients with solid tumours: 4 patients with advanced colorectal, liver, lung, and uterine cancers with metastases (all patients pretreated with CT or local RT) and 2 patients with advanced breast cancer (a 42-year-old woman with a brain metastases without earlier treatment, and a 47-year-old woman with bone metastases diagnosed with breast | the several-week radon therapy using: a) the "radon room" <sup>2</sup> exposure to external γ-rays and inhalation of radon for 40 min. daily or 4 times/wk or every 2 <sup>nd</sup> day (patients with breast, colorectal and uterine cancer); b) inhalation of radon from the α-Radiorepiro-Rn apparatus: 40 min. 3 times/wk or every 2 <sup>nd</sup> d (patients | "regression of the disease" and/or "efficient improvement" of general conditions and laboratory tests in all patients; treatment of the patient with the hepatocellular carcinoma stopped when the cancer was "not seen even on the PET image"                                                                                                                                                                                                   | no serious side effects: even after 4 mo of radon inhalation (first at 1 MBq/m <sup>3</sup> and then at 6 MBq/m <sup>3</sup> ) "not even minor adverse side effects emerged" | (Kojima et al., 2018, 2019)             |

(continued on next page)

Table 1 (continued)

| Patients/diseases                                     | Treatment                                    | Results | Side effects | Ref. |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------|--------------|------|
| cancer 5 years earlier and treated with hyperthermia) | with breast, hepatocellular and lung cancer) |         |              |      |

Legend: AL – acute leukemia, BM – bone marrow, CHOP – cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin, oncovin, and prednisone; CL – chronic leukemia, CLL – chronic lymphocytic leukemia, CML – chronic myelocytic leukemia; CNL – comprehensive lymph node irradiation; CR – complete remission (complete disappearance of all clinical, radiological, and laboratory evidence of disease); CT – chemotherapy; CHVP – cyclophosphamide, hydroxyrubicin, Vm26, prednisone; CVP – cyclophosphamide, vincristine and prednisone; d – day(s); DFS – disease-free survival; FFP – freedom from progression; FL – follicular lymphoma; GIT – gastrointestinal toxicity; HBI – half/hemi-body irradiation; HD – Hodgkin's disease; HL – histiocytic lymphoma; i.v. – intravenous; IFRT – involved-field radiotherapy; LL – lymphocytic lymphoma; ML – mixed lymphocytic-histiocytic lymphoma; mo – month/months; MPD – myelodysplastic/myeloproliferative disorder; NE – no effect; NHL – non-Hodgkin lymphoma; NR – not reported; ORR – overall remission rate; OS – overall survival; p.o. – orally; PR – partial remission; PD – progressive disease; PSA – prostate specific antigen; PTBI – protracted TBI; RT – radiotherapy; SCLC – small cell lung carcinoma; SD – stable disease; STBI – subtotal (i.e., with shielding of the skull, eyes and extremities) body irradiation; TBI – total-body irradiation; TCP – thrombocytopenia; TNI – total nodal irradiation (regional irradiation of all major lymph node areas at total doses of 20–35 Gy in daily fractions of 1.5–2 Gy for 2–4 weeks); WBC – white blood cell; wk – week/weeks; wky – weekly; <sup>1</sup> “radon sheet” – a silicone sheet containing monazite and emitting radiation at about 37 µGy/h; <sup>2</sup> “radon room” – a small room with walls containing natural uranium ore emitting γ-rays at 11 µGy/h and radon at the average concentration of 200 kBq/m<sup>3</sup>; <sup>3</sup> α-Radiospiro-Rn apparatus – the radon generator emitting radon at 2–6 MBq/m<sup>3</sup> which can be taken directly to the lungs through a suction tube.

were discontinued after the untimely death of Heublein who had become an active advocate of this type of treatment. Other investigators, however, continued testing the low-level whole-body exposures to X rays using larger numbers of patients. The results of one of such trial performed between 1931 and 1933 on 270 patients with lymphoproliferative diseases led to the conclusion that subjects who, shortly after completion of the local RT with X-rays, received between 0.5 and 0.75 Gy of whole-body X-rays irradiation – the Heublein technique – survived longer and had longer periods of remission than did patients who received only localized radiotherapy (Medinger and Craver, 1942). Between January 1941 and July 1951, Osgood, Seaman and Tivey treated 163 patients with chronic granulocytic and lymphocytic leukemia by ‘titrated, regularly spaced’ TBI applied in two different ways: some of the patients were given several ‘spray’ irradiations (i.e., spread over the entire body) from an external X-ray source at the dose of 0.1–0.2 Gy per exposure and others were internally irradiated at comparable doses from the intravenously injected radioactive phosphorus (<sup>32</sup>P). The authors noted that survival of the TB-LLR-treated patients from both groups was ‘significantly better than that for a collected series including all radiation treated cases reported in the literature from 1925 to 1951.’ Interestingly, no difference between the clinical response to external X-ray irradiation and internal contamination with <sup>32</sup>P was noted (Osgood et al., 1955). Between 1943 and 1969 Juan Angel del Regato and co-workers, first at the Ellis Fischel Cancer Hospital of Columbia, Missouri, and then at the Penrose Cancer Hospital of Colorado Springs, for 3–7 years treated 61 patients with chronic lymphogenous leukemia to low daily doses of total-body X-rays accompanied, when required, by regional irradiation of spleen or lymph nodes (actually, del Regato had already performed a series of similar studies at the Warwick Cancer Clinic in Washington, D.C. in the late 1930s, but no reports from these studies were published due to the loss of the patients’ records). The results obtained over a period from 1943 to 1969, presented for the first time by del Regato during his Janeway Lecture in 1973, indicate that a ‘life-time’ series of low-level X-ray irradiations resulting in the total doses ranging from 11 to 28 Gy increased the average survival of the patients to 46 months, with a maximum survival of 15 years and a 5-year survival of 21 % of the patients. Notably, ‘patients who had received TBI for several years had rather healthy appearing bone marrows except for the present leukaemic infiltrates’ (Del Regato, 1974).

In the 1960s several clinical programmes of TB-LLR were initiated in a number of medical institutes in the USA. One of the first was the City of Hope Medical Centre in Duarte, California, which employed a specially designed chamber to deliver whole-body irradiations with X-rays. More than fifty patients with acute and chronic leukemia, lymphoma, polycythemia vera and various types of advanced solid cancers were treated in this chamber to doses from 0.05 to 8 Gy. In this series the only group of patients in whom ‘whole body irradiation was a useful adjunct’ in terms of a markedly prolonged survival were the chronic leukemia

patients who were irradiated at single or fractionated doses between 0.1 and 1 Gy. It is noteworthy that apart from ‘some nausea or vomiting during or immediately after irradiation’ at doses ≥0.4 Gy, there were ‘no serious complications of the treatment program’ (Jacobs and Marasso, 1965). Based on these results (as well as the parallel experience of investigators at the Medical Division of the Oak Ridge Institute of Nuclear Studies who obtained ‘regression of lymphadenopathy and spleen size’ in patients with lymphosarcoma and chronic lymphocytic leukemia exposed to single TBI with γ-rays at ‘not-really-low’ doses of 0.5–1.0 Gy) (Andrews et al., 1962), Jacobs and Marasso concluded that TBI ‘has some usefulness’ and declared that ‘this study will be continued’ (Jacobs and Marasso, 1965). Meanwhile, from 1961 to 1979 over ninety patients with various haematological and solid tissue neoplasms were exposed at the Northeast Ohio Conjoint Radiation Center (NEORAD) in Hartsville, Ohio, to either fractionated TBI (0.1 Gy daily to a total of 1–5 Gy) or subtotal body irradiation (STBI; 0.5 Gy daily to a total of 1–40 Gy). The results were promising: many patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas, chronic leukemias, myelomas, and seminomas had long-term (‘up to 17 years or permanent’) remissions of their disease. Kenneth Loeffler, the author of the review of these studies, concluded that ‘STBI and TBI are useful therapeutic modalities for many of these malignancies.’ (Loeffler, 1981).

In Europe, large-scale trials with TBI began in the early 1970s at the Rotterdamisch Radio-Therapeutisch Instituut (RRTI) in Rotterdam, the Netherlands (Qasim, 1975). Preliminary results obtained in stage III and IV non-Hodgkin lymphoma (NHL) patients with generalized lymphadenopathy showed that ‘fractionated total body irradiation can be used safely in the management of lymphocytic lymphoma’ and that this form of therapy may be ‘a preferable first line method of treatment of patients with lymphocytic lymphoma’ (Qasim, 1975, 1979). Hence, between 1973 and 1979, 68 patients with low to high grade NHL were treated at the RRTI with repeated low-dose TBI and the results were very encouraging: complete remissions were seen in 84 %, 42 %, and 40 % of patients with low, intermediate, and high-grade NHL, respectively. The remission rates were better in patients in whom TBI was the initial treatment than in those pretreated earlier with chemotherapy or/and standard RT (Lybeert et al., 1987). In 1975 another study was initiated in the Netherlands, this time at the Department of Radiotherapy of the University of Utrecht. In the study 30 patients with stage III and IV NHL were exposed to TBI with X-rays at 0.1 Gy per day, 3 times a week until the total dose of 3.0 Gy was reached. The best results were obtained in the 19 patients who had no previous treatment such as local RT or chemotherapy: complete remissions were seen in 53 % of such pretreated patients but as high as 77 % of the non-leukemic patients without any previous treatment (van Dijk-Milatz, 1979). At about the same time (1973–1977), 37 patients with advanced NHL, of whom 24 received no previous therapy, were treated by TBI at the Royal Marsden Hospital in Sutton, Surrey, UK. The patients were exposed ten times to

low doses of X-rays to the entire body either over 12 days (TBI) or 5 weeks (protracted TBI), or first to the most involved half of the body and 6–8 weeks later to the other half (hemibody irradiation, HBI). The overall response rate was 80 % for patients with diffuse NHL and 73 % for those with nodular lymphomas and the duration of the complete responses ranged from two to 41 months (median 12 months). HBI appeared to be the most effective and the least myelosuppressive form of treatment and the authors indicated that although their response rates were 'similar to that reported with chemotherapy' no serious toxicity was associated with HBI (Dobbs et al., 1981). Between July 1980 and November 1985 the Lymphoma Cooperative Group of the European Organization on Research and Treatment of Cancer (EORTC) conducted a randomized prospective clinical study performed in over 90 patients with stage III or IV NHL to compare the effects of low-dose TBI with those of multidrug chemotherapy combined with consolidation local RT: the overall remission rates were similar with both treatment modalities and the authors concluded that 'alternative approaches such as the use of immune response modifiers (e.g.  $\alpha 2$  interferon) might be the next beneficial step to include in the treatment of non-Hodgkin's lymphomas.' (Meerwaldt et al., 1991). Between January 1984 and September 1992 in Italy, Mario Roncadin and his group at the Cancer Centre (Centro di Riferimento Oncologico) in Aviano repeatedly treated 40 patients with stage I-IV chronic lymphocytic leukemia (CLL) and 41 patients with stage III-IV low grade NHL with low doses of radiation from a 6 MV linear accelerator with excellent results: the overall response rates in the whole group of the CLL patients were 85 % (91 % and 78 % in patients above and below 65 years of age, respectively) and 83 % in the NHL group of patients (Roncadin et al., 1994). In France, Pierre Richaud and colleagues, based on the results of their earlier examination of over 100 patients with stage III and IV low-grade lymphoma who were successfully (83 % response rate) treated with low-dose TBI, from January 1986 to October 1994 evaluated the results of a similar exposure of 26 previously untreated patients with stage III and IV low-grade follicular NHL and detected complete response in 24 (92 %) of them (Richaud et al., 1998).

Similar trials were also performed in Africa. Indeed, reliable data were reported by Peter Jacobs and Helen S. King from the University of Cape Town and Groote Schuur Hospital, Cape Town, South Africa, who in the 1980s randomly assigned 108 patients newly diagnosed with indolent lymphoproliferative diseases such as chronic lymphocytic leukemia, stage III and IV well-differentiated lymphocytic lymphoma and stage III and IV follicular lymphoma to receive either low-dose TBI with  $\gamma$ -rays or a two-agent chemotherapy. Although both treatment types gave comparable results in terms of complete remission rates and median survival time (59 % and 52 % and 53 and 57 months in the chemotherapy- and the TBI-treated patients, respectively), the authors highlighted two 'apparent attractions' of TBI: compared to chemotherapy, TBI led to faster ('often dramatic') resolution of the superficial lymphadenopathy and did not require as frequent monitoring of blood counts as well as the concern about failure to take medication (Jacobs and King, 1987). In view of the unsatisfactory results achieved in aggressive NHL with the standard chemotherapy (CHOP: cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, and prednisone) and based on the earlier encouraging outcomes of a combining CHOP with TBI (Leimert et al., 1979; Weick et al., 1983) on the other side of the African continent, Akmal Safwat, Yasser Bayoumi and colleagues at the National Cancer Institute of the Cairo University aimed at testing the therapeutic efficacy of TB-LLR as an adjuvant treatment. Between September 1999 and September 2001 36 patients with high grade NHL who achieved complete remission after several cycles of CHOP were later (4–6 weeks) subjected to two courses of TB-LLR separated by two weeks of rest. The 3-year disease-free survival was  $61 \pm 9\%$  and overall survival was  $87 \pm 6\%$ . The authors concluded that the use of adjuvant TB-LLR in patients with aggressive NHL in complete remission after standard chemotherapy is 'a feasible, non-toxic treatment that is worthy of testing in a future phase III trial' (Safwat et al., 2004). More extensive retrospective

analysis of patients treated by TB-LLR (according to the above described regimen) at the Cairo University from 1997 to 2006 was presented by Yasser Bayoumi and Aida Radwan. In their study 58 patients with relapsed or refractory low-grade NHL were analysed (45 of these patients had  $\geq 3$  courses of standard chemotherapy and 40 had 'bad performance status'). The overall response rate was 69 %, but complete responses were seen in only 24 % and partial responses in 45 % of the patients; the median duration of progression-free survival was 14 months and the median overall survival was 39 months. The investigators concluded that the use of TB-LLR in patients with relapsed low-grade NHL is 'a feasible, effective, and tolerable treatment' worthy of further testing in combination with chemotherapy and/or targeted therapy based on specifically designed monoclonal antibodies (Bayoumi and Radwan, 2015).

In Japan, Professor Kiyohiko Sakamoto and his colleagues at the Tohoku Radiological Science Center of the Tohoku University, prompted by the results of their extensive preclinical studies carried out in the 1980s and 1990s in normal and tumour-bearing mice, initiated first clinical trials in two patients with advanced (i.e., metastasizing) tumours, one with ovarian cancer and the other with colon cancer. The tumours of the two women were surgically removed and conventional RT was locally applied. Because the diseases progressed, repeated low-dose (0.1 Gy) whole- and half-body irradiations with X-rays were also added in the first and the second women, respectively. These treatments inhibited progression of the disease in both patients (as indicated by the reduced spread of metastases) and improved their general conditions for several months. After receiving similar results in a number of other patients with advanced tumours in various organs, Sakamoto and his team embarked on a larger clinical trial in patients with NHL, a disease chosen by the investigators because of its widespread nature (i.e., neoplastic infiltration of extralymphatic sites such as bone marrow and the liver) already at the time of diagnosis. The patients were subjected to multiple half- or total-body irradiations at low-doses of X-rays followed by fractionated local RT at up to 60 Gy total dose and 'often' by chemotherapy. In about 200 patients so treated, five-year survival was 84 %. This compared favorably to 65 % and 70 % for patients treated only with local RT and with local RT combined with chemotherapy, respectively. In addition, nine years after completion of the adjuvant half- or total-body irradiations all 84 % patients were still alive compared to only 50 % patients treated only with local RT and CT (Sakamoto et al., 1997; Sakamoto, 2004). The most recent Japanese trials with TB-LLR were conducted by Shuji Kojima and his colleagues at the Tokyo University of Science in Noda-Shi, Japan. Initially, they exposed two patients with either a surgically removed or an inoperable end-stage prostate cancer with bone metastases. The first patient was whole-body exposed at low doses to X-rays 'according to the method of Sakamoto' and the second patient received similar whole-body exposures followed by a long-term 'radon sheet' treatment (for details see Table 1). Both treatments normalized the markedly elevated PSA levels in the two patients and, in the second patient, led to the apparent disappearance of multiple bone metastases (Kojima et al., 2017). In another series of experiments, Kojima and co-workers tested the effectiveness of a several-week 'radon therapy' in six patients with a breast, colorectal, lung, uterine, and hepatocellular carcinomas using a specially designed 'radon hormesis room' or the  $\alpha$ -Radiospire-Rn apparatus (for details see Table 1). The disease regressed and the general condition and laboratory tests 'efficiently improved' in all the patients; in one case (hepatocellular carcinoma) the treatment was stopped when the cancer was no longer detectable 'even on the PET image.' Based on these results the authors concluded that 'radon therapy appears to be a promising treatment modality for different kinds of cancer, either as a primary therapy or as an adjuvant therapy for conventional chemotherapy and/or local high-dose radiotherapy' (Kojima et al., 2018, 2019).

#### 4. Lessons learned

Most of the traceable/available and reliable clinical trials performed thus far which employed ultra-low dose whole-body irradiations with X- or  $\gamma$ -rays are reviewed in Table 1. It is clear that the design and execution of many of these trials, especially those performed in the 1940s, 1950s, and 1960s lacked the modern criteria of clinical research in terms of precise diagnosis and allocation of patients, randomization and control, blindness, clinical equipoise and other ethical issues including informed consent from and the prolonged follow-on of the patients. However, it is also clear that the amassed data from the studies performed between 1930s and 2019 provide important information which can and should be used as an encouraging foundation for future clinical trials compatible with modern criteria in which TB-LLR will be employed as a primary or additional treatment modality in hematopoietic and other malignancies. To this end, the following lessons can be learned from the hitherto performed trials:

- 1 Overall, from the early 1930s to the end of 2019 almost 2,000 patients were tested in systematic and individual clinical trials for the efficiency of TB-LLR. Patients with a number of different malignancies, most often advanced, were exposed to whole or half-body irradiations either as an initial (and only) treatment, as an adjuvant therapy, or as a salvage therapy. In the great majority of the trials the irradiated patients presented with lymphoproliferative diseases, predominantly non-Hodgkin lymphomas and, to a lesser extent, chronic lymphocytic leukemias. In fact, NHLs constitute about 90 % of all lymphomas and, in contrast to Hodgkin disease, their generalized character is usually present from the onset of the disease. Hence, systemic therapy rather than local irradiation of enlarged lymph nodes should be the preferred form of treatment for the majority of patients diagnosed with NHL (Johnson, 1975). Markedly less frequently were tested patients with solid tumours such as melanoma, sarcoma and colon, prostate, lung, ovarian, liver, and uterine cancers. In most cases, the radiotherapeutic protocols consisted in repeated exposures of the whole or, less frequently, half of the patient's body to X- or  $\gamma$ -rays administered daily at doses between 0.05 to 0.2 Gy, 2–5 times per week until a cumulative doses of 1–4 Gy have been achieved. Occasionally, after a 1–8-week rest, a similar TBI or HBI regimen was repeated. Additionally, patients with persistent nodular masses were given regional 'boost' irradiation to involved areas at total doses of 10–35 Gy applied in several daily fractions.
- 2 In many trials, especially in patients with NHL and in some CLL patients, exposures to low-level TBI were very encouraging. Thus, in patients with advanced stage NHL curative effects and complete remissions (CR) were obtained in 25–95 % of the cases (Qasim, 1979; Lybeert et al., 1987; van Dijk-Milatz, 1979; Dobbs et al., 1981; Meerwaldt et al., 1991; Roncadin et al., 1994; Richaud et al., 1998; Jacobs and King, 1987; Safwat et al., 2004; Johnson, 1970; Johnson et al., 1970; Johnson, 1972, 1976; Johnson, 1977; Canellos et al., 1975; Kazem, 1975; Chaffey et al., 1976; Yonkosky et al., 1978; Choi et al., 1979; Thar et al., 1979; Hoppe et al., 1981; Mendenhall et al., 1989). Intriguingly, in many of the trials best results were achieved when TB-LLR was the only or initial treatment (van Dijk-Milatz, 1979; Dobbs et al., 1981; Roncadin et al., 1994; Richaud et al., 1998; Johnson, 1972, 1976; Chaffey et al., 1976; Choi et al., 1979; Thar et al., 1979; Mendenhall et al., 1989; Chaffey et al., 1977; Carabell et al., 1979). Such exposures were also effective in patients who previously failed on or relapsed from chemotherapy (Loeffler, 1981; Lybeert et al., 1987; Dobbs et al., 1981; Bayoumi and Radwan, 2015; Yonkosky et al., 1978; Choi et al., 1979). Notably, complete remissions occurred in more than 50–60 % of the NHL patients and the less frequent, lower CR rates were detected either in patients with 'unfavorable histology' lymphomas (Mendenhall et al., 1989) or in patients previously treated with standard chemotherapy or local RT

at high doses (Roncadin et al., 1994). Generally, the efficacy of treatment was less spectacular in patients with solid cancers: while a few reports showed encouraging results (Loeffler, 1981; Kojima et al., 2017, 2018; Kojima et al., 2019; Kinsella et al., 1983) other outcomes of low-level TBI were unsatisfactory (Jacobs and Marasso, 1965; D'Angio and Evans, 1983; Safwat et al., 2005). However, most of these neoplasms were already in advanced, highly disseminated stages of growth when both the primary tumors and their metastases likely grew refractory to anti-cancer immune reactions and/or these reactions were markedly suppressed and could not be revived by low-dose irradiations.

- 3 In most of the trials no serious acute side effects were provoked by TB-LLR. In a minority of the cases transient 'bone marrow depression' was manifested by moderate and transient thrombocytopenia and/or lymphocytopenia and only a fraction of the patients required blood transfusion. Such outcomes were sometimes accompanied by mild and manageable nausea and vomiting occurring mostly in patients who were treated with cytotoxic therapy such as intensive chemotherapy or local high-dose RT (Jacobs and Marasso, 1965; Kazem, 1975; Kinsella et al., 1983; Rees et al., 1980). Interestingly, as reported by del Regato from his 'life-time series of X-ray irradiations' patients with CLL who received low-level whole-body irradiations for several years 'had rather healthy appearing bone marrows except for the present leukaemic infiltrates' (Del Regato, 1974). Indeed, the early studies demonstrated that absorption by the whole body of up to 25 % of a full 'erythema dose', i.e., about 7.5 Gy, delivered at the rate of approximately 5 mGy per minute is not associated with a depression in the number of white cells or an 'instance of marked drop in blood platelets' (Heublein, 1932). Likewise, two subsequent exposures of the whole bodies of patients with melanoma at 0.5–1.5 Gy of X-rays was accompanied by only 'short-lived and easily controlled' nausea and vomiting and 'a temporary leukopenia' (Holder, 1965).

Among the late complications of TB-LLR of special concern is acute leukemia, a prototypical radiogenic cancer (Modan and Lubin, 1974) the increased incidence of which has been demonstrated following treatment of various lymphoproliferative malignancies (Pedersen-Bjergaard, 1988). However, as shown in Table 1, in most of the trials no cases of secondary leukemia was detected in the followed-on NHL patients exposed earlier to repeated whole-body irradiations at low doses (Jacobs and Marasso, 1965; Lybeert et al., 1987; Choi et al., 1979; Thar et al., 1979; Hoppe et al., 1981; Mendenhall et al., 1989; Holder, 1965). Notably, even in patients exposed twice to the relatively high doses (0.5–1.5 Gy) of X-rays 'no secondary complications' were detected (Holder, 1965). Even though a few studies reported that the rates of secondary leukemias or myelodysplastic/myeloproliferative syndromes ranged from 0.5 to 8.2% among the TBI-treated NHL patients (Mendenhall et al., 1989; Carabell et al., 1979; O'Donnell et al., 1979; Greene et al., 1983; Travis et al., 1996), in all of these cases the secondary diseases developed in patients who, in addition to TB-LLR, had been exposed to high-dose local RT and/or intensive chemotherapy regimens. Noticeably, in a study where the highest (8.2 %) rate of secondary hematological malignancies (four cases of acute nonlymphocytic leukemia and one case of myelodysplastic syndrome) was diagnosed during the 15-year follow-up of the two-year NHL survivors these diseases were detected in patients who, in addition to whole-body exposures to 0.15 Gy of X rays (twice a week until the total of 1.5 Gy), received either a salvage chemotherapy with alkylating agents (1 case) or a salvage chemotherapy and localized irradiation of bulky tumour masses which delivered a median dose to the active bone marrow of 5.2 Gy (Travis et al., 1996). Indeed, excess leukemia is unlikely in populations exposed only to ionizing radiation, but it can be rather high following intense chemotherapy (O'Donnell et al., 1979; Travis et al., 1996; Gomez et al., 1982; Pedersen-Bjergaard et al., 1985). In fact, as indicated by extensive reviews of the data, prior treatment with chemotherapeutic agents

seems to be the most important risk factor for the development of secondary acute myeloid leukemias in NHL patients (Ellis and Lishner, 1993; Kollmannsberger et al., 1998; Leone et al., 1999).

4 Compared to the effects of chemotherapy, which after 1948 became the accepted modality for the treatment of metastatic malignancies (Loeffler and Puterbaugh, 1975), the therapeutic effectiveness of TB-LLR appeared to be similar or better and the latter therapy has a few distinct additional advantages. During one of the first comparisons of the two modalities conducted in 1951 at the NEORAD Center patients with various solid cancers in advanced stage were either exposed once to whole-body irradiation with X-rays at 0.4–1.5 Gy or were given a single dose of nitrogen mustard or triethylenemelamine (TEM), the two agents considered at that time as alternatives for standard radiotherapy in the treatment of cancer. The results demonstrated ‘higher tolerance levels of total body irradiation’ which ‘may well prove of value in the management of diseases currently being treated routinely with nitrogen mustard and its derivatives.’ Indeed, ‘all patients receiving nitrogen mustard or TEM developed malaise of varying severity’, but none of the patients receiving total-body irradiations reported any worsening of their condition (Loeffler et al., 1953). In August 1964, a pilot study was initiated at the Radiation Branch of the National Cancer Institute in Bethesda, MD. During the next ten years the TB-LLR treatment of patients with NHLs and chronic lymphocytic leukemia was investigated as an alternative to chemotherapy (Johnson, 1975; Johnson et al., 1970; Johnson, 1972; Canellos et al., 1975; Johnson, 1966, 1979; Young et al., 1977). The highly encouraging results of these trials (up to 93 % CRs in patients with advanced NHL and no clinically serious side effects) prompted further studies along this line. In November 1969, a group at the Harvard Medical School embarked on a programme of therapy of advanced lymphocytic lymphoma by fractionated total body exposures to X-rays (Chaffey et al., 1976; Carabell et al., 1979; Hellman et al., 1977). Complete remissions seen in 80 % of the primary treated patients, the results in substantial agreement with those obtained by Johnson et al. (1970) (Johnson et al., 1970), led the authors to opine that TBI is ‘a useful alternative to combination chemotherapy since it produces comparable survival with decreased morbidity and toxicity’ (Chaffey et al., 1976). Other authors who conducted similar studies in the same period of time were even more definitive by claiming that ‘in terms of simplicity of treatments and morbidity, fractionated whole body irradiation is much better than combination chemotherapy’ (Choi et al., 1979). A number of other tests comparing the clinical outcomes of TB-LLR with those of chemotherapy also demonstrated that the effects of the two modalities were at least equivalent and that the former treatment appeared to be less toxic, faster to resolve organ enlargement, was easier to apply and control (e.g., the need for close patient follow-up was less stringent), and less likely to compromise ‘the ability to tolerate future therapy’; furthermore, TB-LLR proved to be effective in patients who did not obtain remission with, or relapsed after, standard chemotherapy (van Dijk-Milatz, 1979; Dobbs et al., 1981; Meerwaldt et al., 1991; Jacobs and King, 1987; Safwat et al., 2004; Bayoumi and Radwan, 2015; Hoppe et al., 1981; Mendenhall et al., 1989; D’Angio and Evans, 1983; Hellman et al., 1977; Rostom and Peckham, 1977). These multiple results sharply contrast with the claim of Paule et al. (1985) who, based on two publications by Johnson (1979) and Rubin et al. (1981), concluded that low-dose total body irradiation ‘did not appear to be superior to chemotherapy in most trials’ (authors’ emphasis) and that it was associated with ‘significant haematological toxicity’ and ‘a number of infectious complications.’

5 In view of the encouraging and, especially in case of the NHL patients, even impressive results of the TB-LLR-based therapy, it is puzzling why this form of treatment has not become the standard anti-cancer strategy. The explanation is manifold. First, the

alternative modality, i.e., chemotherapy, gained ground in the late 1940s when the horrific effects of using “radiation” in the form of nuclear weapons were already well known. This has led to the adoption in the mid-1950s of the scientifically unfounded assumption that all exposures to ionizing radiation, no matter how small, are harmful and should be avoided (Calabrese, 2015, 2020; Marcus, 2015). This assumption, called the linear no-threshold (LNT) hypothesis has become the basis of radiation regulations and as such has since been inculcated into radiology and radiotherapy course participants as a binding “rule of thumb” and has significantly contributed to spreading of radiophobia not only between the general public but also among physicians and medical physicists. Indeed, to this day many medical professionals are reluctant to accept the accumulated over the last several years reliable evidence that ultra-low level irradiations are not only harmless but can also improve health (Janiak et al., 2017). It may be speculated that this reluctance is shrewdly capitalized on by pharmaceutical companies responsible for the production and supply of the many anticancer medications which more or less actively prompt systemic chemo-, immuno-, vaccine-based-, and molecular targeted therapies at the expense of generally nontoxic and less costly TB-LLR. Second, although many different mechanistic explanations of the anti-neoplastic effects of TB-LLR have been elucidated in a number of reliable experimental and pre-clinical studies, few clinical trials have thus far been aimed at similar elucidations. Consequently, most radiation oncologists refrain from pursuing such trials which in their opinion are not sufficiently scientifically justified.

## 5. Possible mechanisms

What are the mechanisms of the therapeutic effects of TBI which, especially in lymphoproliferative diseases, have been reported to produce complete and/or durable remissions in 80–93 % of the patients with advanced-stage NHL? (Qasim, 1979; Lybeert et al., 1987; Richaud et al., 1998; Sakamoto et al., 1997; Johnson, 1972; Choi et al., 1979; Thar et al., 1979; Chaffey et al., 1977; Kinsella et al., 1983). As demonstrated by the many pre-clinical studies including our own experiments performed in radiosensitive and radioresistant mice which have been outlined in a few recent reviews (Janiak et al., 2017; Yang et al., 2016; Cui et al., 2017) stimulation of immune reactions, possibly involving a reversal of the suppressed anti-neoplastic immunity, is likely to play a critical role. Unfortunately, the immune status of patients exposed to TBI has rarely been examined, although in a few instances (see Table 1) it was demonstrated that fractionated TBI resulted in recovery of the circulating immunoglobulin levels from subnormal to normal (Johnson, 1976), stimulated the mitogen-induced proliferation of blood lymphocytes in vitro (Yonkosky et al., 1978), increased the numbers of helper/helper-inducer T (Sakamoto et al., 1997) and NK cells (Safwat et al., 2005) and up-regulated the CD4:CD8 T cell ratio in peripheral blood (Welsh, 2004). Indirect evidence of the involvement of the immune system is provided by the earlier discussed observation that the best clinical effects of TB-LLR were seen when multiple whole-body exposures to X- or  $\gamma$ -rays were either the only or the first form of therapy (van Dijk-Milatz, 1979; Dobbs et al., 1981; Roncadin et al., 1994; Richaud et al., 1998; Johnson et al., 1970; Johnson, 1972, 1976; Kazem, 1975; Chaffey et al., 1976; Choi et al., 1979; Thar et al., 1979; Mendenhall et al., 1989; Chaffey et al., 1977; Carabell et al., 1979) (i.e., applied either without or before introduction of immunosuppressive, intensive chemotherapy and/or high dose radiotherapy). Indeed, as indicated by Specht in her review of the modern treatment of lymphomas, which relies on the combination of local RT with systemic CT, ‘the more intensive the chemotherapy regimen, the fewer patients benefit from radiotherapy,’ even if the latter refers to irradiation of only the involved sites (Specht, 2016).

Another plausible mechanism of action of TB-LLR in patients with lymphoproliferative diseases is the low-level radiation-induced

elimination of the malignant cells (Chen and Sakai, 2004). Indeed, lymphoblasts and lymphocytes belong to the most radiosensitive cell types and, in contrast to most other somatic cells, resting lymphocytes are more sensitive to  $\gamma$ -radiation than their activated counterparts (Sellins and Cohen, 1987). In fact, exposure of lymphocytes to  $\gamma$ -rays causes an early interphase apoptotic cell death which is distinct from the mitotic, senescent, or postmitotic necrosis or apoptosis that accounts for radiation-induced cell death in most non-lymphoid malignancies (Dewey et al., 1995; Forrester et al., 2000). Intriguingly, lymphocytes are more sensitive to radiation in vivo than in vitro (Sharma et al., 2010). Consequently, lymphomas are particularly radiosensitive cancers: curative regimens of local irradiation of bulky neoplastic masses incorporate only 20–35 Gy, compared to 65 or more Gy of radiation required for definitive treatment of many solid tumours such as squamous cell carcinomas and adenocarcinomas (Kimball and Webb, 2013).

One likely mechanism responsible for enhanced apoptosis of lymphoma cells is their hyper-radiosensitivity (HRS), a phenomenon by which radiation doses  $\leq 0.3$  Gy actually cause increased cell kill per gray, compared to higher doses (Short et al., 2001; Seth et al., 2015). Presumably, after such a low dose exposure malignant cells do not recognize the ensuing DNA damage as significant, do not initiate DNA repair, and instead choose to die an apoptotic death (Marples et al., 2004). Notably, although orderly removal of dying cells by phagocytes occurs without eliciting an inflammatory response (Fadok et al., 2001), radiation-induced apoptosis is not immunologically 'silent'. In fact, in the course of radiation-induced apoptotic death, malignant lymphoid cells express on their surface the 'eat-me' signals, such as phosphatidylserine or calreticulin, which stimulate phagocytosis of these cells and boost dendritic cells to trigger the T and NKT cell-mediated immune responses (Kimball and Webb, 2013; Fadok et al., 2001). In case of follicular lymphoma cells, irradiation induces apoptosis in these cells, while sparing macrophages, which are then activated by phosphatidylserine exposure to clear the lymphoma (Knoops et al., 2007). In fact, a patient's follicular lymphoma cells treated ex vivo with  $\gamma$ -radiation and loaded into dendritic cells were most effective as a cancer vaccine when high levels of calreticulin and heat shock protein 90 were expressed on the surface of the lymphoma cells (Zappasodi et al., 2010). Thus, yet another possible mechanism is the LLR-induced immunogenic cell death.

## 6. Conclusions and the way ahead

Results of controlled clinical trials with ultra-low dose whole- or half body irradiations with X- or  $\gamma$ -rays of patients with non-Hodgkin lymphomas performed from the 1960s until the late 1990s are highly encouraging: complete and durable remissions occurred in at least 50–60 % of the patients and, in some cases, the rate of remissions exceeded 90 %. Importantly, in many patients optimal results were seen when TB-LLR exposures were the only, or the initial, form of therapy. Except for moderate and transient thrombocytopenia and/or lymphocytopenia no severe acute 'toxic' effects were instigated by such treatments. Likewise, in the great majority of the trials no secondary cancers were detected in the followed NHL patients even with repeated TB-LLRs. Indeed, the few patients who developed secondary leukemia or a myelodysplastic syndrome were also treated with salvage chemotherapy and/or localized irradiation delivering high doses to the active bone marrow. Notably, the therapeutic effectiveness of low-level total-body irradiations appears to be at least similar to that of chemotherapy, the standard treatment of generalized malignancies, but surpasses the latter in lower morbidity and toxicity, faster resolution of organ tumour infiltrations, ease of application and follow-up in the immediate post-treatment period, as well as better tolerance of additional therapy. Moreover, in many cases TB-LLR proved to be effective in patients who did not obtain remission or relapsed after standard chemotherapy. Hence, as also concluded by others (Cutler et al., 2000; Pollycove, 2007; Oakley, 2015; Block et al., 2017), ultra-low dose irradiations with X- or

$\gamma$ -rays applied as a stand-alone or adjuvant treatment is likely to be superior to all the current anti-cancer modalities as it is capable of producing durable remissions with no significant side effects (Table 2).

It seems advisable, therefore, that further large scale clinical trials consistent with modern criteria are performed in patients with hematopoietic and also other systemic malignancies including, or particularly, those who are in early stages of the disease. It is critical that designs of new trials using whole- or half-body exposures to ultra-low doses of low-LET radiation envisage performing of as many as possible tests and assays aimed at elucidation of the underlying mechanisms (e. g., immunological, radiobiological, biochemical, physical etc.) of both anti-neoplastic and general condition-improving as well as conceivable untoward outcomes of such exposures. Such clinical plans will undoubtedly deepen our understanding of the biomedical effects of low-level radiation and provide evidence-based grounds for the establishment of TD-LLR as a standard anti-cancer modality.

Although combination of TB-LLR with other types of the currently used anti-cancer modalities seems a natural way ahead we are reluctant to strongly support this option. First, we are unaware of any indication from pre-clinical experiments that the effects of such a combination are superior to the effects of a single modality, especially of the sole treatment with TB-LLR. Indeed, our preliminary results indicate that concomitant whole-body irradiations with ultra-low doses of X-rays and blockade of the function of one or two immune checkpoints (with anti-CTLA-4 and/or anti-PD-1 antibodies) leads to a less, rather than more, pronounced inhibition of the growth of subcutaneously transplanted lung cancer cells than does the TB-LLR treatment used alone (unpublished). Second, as indicated by the results of many in-depth analyses all of the modern anticancer modalities, i.e., systemic chemotherapy, local radiotherapy, immunotherapy (particularly inhibition of immune checkpoints), and molecular targeted therapy are associated with a number of often serious side effects (Spain et al., 2016; Palmieri et al., 2018; Zarifa et al., 2019; Gutierrez et al., 2021). In view of the fact that there are no pre-clinical or clinical indications that ultra-low dose irradiations could protect against, reverse, or mitigate such side effects advocacy of combining TB-LLR with any of the currently used or trialed anti-neoplastic therapies seems unfounded. On the other hand, however, since low-level whole-body exposure to low-LET radiation is not likely to exacerbate untoward complications of conventional chemo- and radiotherapy, nor of any form of immunomodulatory or molecular targeted therapy, prospective recognition of plausible synergistic or additive effects of the combination of the latter with the former should not be discouraged. Specifically, addition of TB-LLR to treatment modalities that are known to bolster anti-cancer immunity, including various schemes of modern low-dose local radiotherapy (Rückert et al., 2018; Menon et al., 2019), anti-cancer vaccine-based therapy (Vermaelen, 2019) or systemic chemotherapy (Galluzzi et al., 2020) can be recommended. When combining TB-LLR with modern checkpoint inhibitors or other immunotherapies, it might be reasonable to consider the total dose selected. If, for example, we are seeking T cell mediated effects, perhaps

**Table 2**

Comparison of the effects of moderate and high vs. ultra-low-level exposures to ionizing radiation.

| INTERMEDIATE to HIGH DOSES                              | ULTRA-LOW DOSES                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Induce death of normal cells and damage healthy tissues | Do not induce death of normal cells and do not damage healthy tissues                                                                      |
| May induce inflammation                                 | Attenuate (chronic) inflammation                                                                                                           |
| May suppress haematopoiesis and immune functions        | Stimulate various functions of the immune system                                                                                           |
| May induce secondary cancers                            | Do not induce secondary cancers                                                                                                            |
| Can be used only locally                                | As whole body exposures can be the therapy of choice for systemic or metastatic cancer                                                     |
|                                                         | Anti-neoplastic effects of whole body exposures similar to or better than those of systemic chemotherapy with lower toxicity and morbidity |

the whole-body dose should be optimized to allow adequate numbers of effector cells to remain and effectively carry out the task. Similarly, the combination of low dose TBI could supplement high-dose focal therapies such as SBRT. It remains possible that such a combination of high-dose local therapy coupled with immune-stimulating TB-LLR could enhance intrinsic anti-cancer immunity but this hypothesis remains to be tested rigorously. Finally, boosting of anti-cancer immune function following removal of a bulk tumor mass by surgery seems to be a reasonable option.

In conclusion, we believe that the time is ripe for the revival of interest in and resumption of full-scale oncological applications of ultra-low level whole-body exposures to low-LET radiation in order to, as phrased by Ralph Johnson, one of the most experienced investigators in the field, “dispel the pessimism of decades over failure of treatment to alter the natural history of chronic lymphocytic leukemia” and other malignancies. Certainly, well designed and conducted randomized clinical trials with TB-LLR will likely refine and improve the efficiency of such a therapy and allow for a reliable comparison of its effects with the state-of-the-art forms of anti-cancer modalities. Indeed, it is the aim of this review to provide evidence-based grounds to allow Ethical committees to issue their approval of and encourage clinical oncologists to embark on such trials.

## Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## CRediT authorship contribution statement

**Marek K. Janiak:** Conceptualization, Investigation, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Mateusz Pocięgiel:** Investigation, Writing - review & editing. **James S. Welsh:** Conceptualization, Investigation, Writing - review & editing.

## Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

## References

- Albrecht, H., Durbin-Johnson, B., Yunis, R., Kalanetra, K.M., Wu, S., Chen, R., et al., 2011. Transcriptional response of ex vivo human skin to ionizing radiation: comparison between low- and high-dose effects. *Radiat. Res.* 177, 69–83. <https://doi.org/10.1667/RR2524.1>.
- Andrews, G.A., Sitterson, B.W., White, D.A., Kniesley, R.M., Comas, F.V., 1962. Summary of Clinical Total-Body Irradiation Program. Oak Ridge Institute of Nuclear Studies, Medical Division, Research Report, pp. 1–2.
- Arg, K.K., 1998. Altered fractionation trials in head and neck cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* 8, 230–236. [https://doi.org/10.1016/S1053-4296\(98\)80020-9](https://doi.org/10.1016/S1053-4296(98)80020-9).
- Bauer, G., 2007. Low dose radiation and intercellular induction of apoptosis: potential implications for the control of oncogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 83, 873–888. <https://doi.org/10.1080/09553000701727523>.
- Bayarri, Y., Radwan, A., 2015. Low dose total body irradiation for relapsed low grade non-Hodgkin's lymphoma: experience of National Cancer Institute. *Cairo. J. Cancer Ther.* 6, 25–33. <https://doi.org/10.4236/jct.2015.61004>.
- Block, A.M., Silva, S.R., Welsh, J.S., 2017. Low-dose total body irradiation: an overlooked cancer immunotherapy technique. *J. Radiat. Oncol.* 6, 109–115. <https://doi.org/10.1007/s13566-017-0303-x>.
- Calabrese, E.J., 2015. An abuse of risk assessment: how regulatory agencies improperly adopted LNT for cancer risk assessment. *Arch. Toxicol.* 89, 647–648. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1454-4>.
- Calabrese, E.J., 2020. The Muller-Neel dispute and the fate of cancer risk assessment. *Environ. Res.* 190, 109961. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109961>.
- Castillo, G.P., DeVita, V.T., Young, R.C., Chabner, B.A., Schein, P.S., Johnson, R.E., 1975. Therapy of advanced lymphocytic lymphoma. A preliminary report of a randomized trial between combination chemotherapy (CVP) and intensive radiotherapy. *Br. J. Cancer* 31 (Suppl. II), 474–480. PMID: 1101933; PMCID: PMC2149565.
- Carabell, S.C., Chaffey, J.T., Rosenthal, D.S., Moloney, W.C., Hellman, S., 1979. Results of total body irradiation in the treatment of advanced non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* 43 (3), 994–1000. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197903\)43:3<994::aid-cncr2820430331>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197903)43:3<994::aid-cncr2820430331>3.0.co;2-o).
- Casey, D.L., Friedman, D.N., Moskowitz, C.S., Hilden, P.D., Sklar, C.A., Weder, L.H., et al., 2015. Second cancer risk in childhood cancer survivors treated with intensity-modulated radiation therapy (IMRT). *Pediatr. Blood Cancer* 62, 311–316. <https://doi.org/10.1002/pbc.25285>.
- Chaffey, J.T., Rosenthal, D.S., Moloney, W.C., Hellman, S., 1976. Total body irradiation as treatment for lymphosarcoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1, 399–405. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(76\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0360-3016(76)90004-3).
- Chaffey, J.T., Hellman, S., Rosenthal, D.S., Moloney, W.C., 1977. Total-body irradiation in the treatment of lymphocytic lymphoma. *Cancer Treat. Rep.* 61 (8), 1149–1152. PMID: 323248.
- Chand, H., Lange, K., 1923. Über Lymphogranulomatose und ihre Behandlung mit Röntgenstrahlen. *Munch. Med. Wchnschr.* 70, 725–727.
- Chen, Z., Sakai, K., 2004. Enhancement of radiation-induced apoptosis by preirradiation with low-dose X-rays in human leukemia MOLT-4 cells. *J. Radiat. Res.* 45 (2), 239–243. <https://doi.org/10.1269/jrr.45.239>.
- Choi, N.C., Timothy, A.R., Kaufman, S.D., Carey, R.W., Aisenberg, A.C., 1979. Low dose fractionated whole body irradiation in the treatment of advanced non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 43, 1636–1642. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197905\)43:5<1636::AID-CNCR2820430512>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197905)43:5<1636::AID-CNCR2820430512>3.0.CO;2-E).
- Corbary, A., 2014. Does the immune system naturally protect against cancer? *Front. Immunol.* 5 (197). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00197>.
- Cui, J., Yang, G., Pan, Z., Zhao, Y., Liang, X., Li, W., et al., 2017. Hormetic response to low-dose radiation: focus on the immune system and its clinical implications. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2), 280. <https://doi.org/10.3390/ijms18020280>.
- Cutler, J.M., Pollock, M., Welsh, J.S., 2000. Application of low doses of radiation for curing Cancer. *Can. Nucl. Soc. Bull.* 21, 45–50. <https://doi.org/10.4236/jct.2015.67065>.
- D'Angio, G.J., Evans, A.E., 1983. Cyclic, low-dose total body irradiation for metastatic neuroblastoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 9 (12), 1961–1965. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(83\)90369-3](https://doi.org/10.1016/0360-3016(83)90369-3).
- Dale, T., 1931. Eine neue Methode der Röntgenbestrahlung von Leukämie. *Acta Radiol.* 12, 263–285. <https://doi.org/10.3109/00016923109132249>.
- Del Regato, J.A., 1974. Proceedings: Total body irradiation in the treatment of chronic lymphogenous leukemia. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* 120 (3), 504–520.
- Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., Barton, M., 2005. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* 104, 1129–1137. <https://doi.org/10.1002/cncr.21324>.
- Desautels, F., 1905. Eine neue Anordnung zur Röntgenbestrahlung. *Arch. Phys. Med. Med. Tech.* 2, 218–223.
- Devis, A., 1931. La téléroentgénothérapie totale du corps humain. *J. Belge Radiol.* 20, 269–270.
- Dewey, W.C., Ling, C.C., Meyers, R.E., 1995. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 33 (4), 781–796. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(95\)00214-8](https://doi.org/10.1016/0360-3016(95)00214-8).
- Dobbs, H.J., Barrett, A., Rostom, A.Y., Peckham, M.J., 1981. Total-body irradiation in advanced non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Radiol.* 54 (646), 878–881. <https://doi.org/10.1259/0007-1226-54-646-878>.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2002. Cancer immunosurveillance: from immunosurveillance to tumour escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998. <https://doi.org/10.1038/nri102991>.
- Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2004. The three Es of cancer immunosurveillance. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 329–360. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>.
- Ellis, M., Lishner, M., 1993. Second malignancies following treatment in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 9 (4–5), 337–342. <https://doi.org/10.3109/10428199309148531>.
- Fadek, V.A., Bratton, D.L., Henson, P.M., 2001. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J. Clin. Invest.* 108 (7), 957–962. <https://doi.org/10.1172/JCI14122>.
- Feinendegen, L.E., Pollock, M., Neumann, R.D., 2012. Hormesis by low dose radiation effects: Low-dose cancer risk modeling must recognize up-regulation of protection. In: Berlin, Springer, Baum, R.P. (Eds.), *Therapeutic Nuclear Medicine*, pp. 789–805. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9122-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9122-6_6).
- Forrester, H.B., Albright, N., Ling, C.C., Dewey, W.C., 2000. Computerized video time-lapse analysis of apoptosis of REC-myc cells X-irradiated in different phases of the cell cycle. *Radiat. Res.* 154 (6), 625–639. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)154\[0625:CVTLAD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)154[0625:CVTLAD]2.0.CO;2).
- Frimann-Dahl, J., Forsberg, R., 1931. Xanthomatosis with defects in the cranial bones. *Acta radiol.* 12, 254–262. <https://doi.org/10.3109/00016923109132248>.
- Galluzzi, L., Humeau, J., Baqué, A., Laurence, Z.L., Kroemer, G., 2020. Immunostimulation with chemotherapy in the era of immune checkpoint inhibitors. *Nature Rev. Clin. Oncol.* 17, 725–741. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0413-z>.
- Gomez, G.A., Aggarwal, K.K., Han, T.L., 1982. Post-therapeutic acute malignant myeloproliferative syndrome and acute nonlymphocytic leukemia in non-Hodgkin's lymphoma. Correlation with intensity of treatment. *Cancer* 50, 2285–2288.
- Greene, N.H., Young, R.C., Merrill, J.M., DeVita, V.T., 1983. Evidence of a treatment dose response in acute nonlymphocytic leukemias which occur after therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* 43, 1891–1898. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.1983.43.1891>.
- Griffith, R.J., Ahmed, M.M., Amendola, B., Belyakov, O., Bentzen, S.M., Butterworth, K.T., et al., 2020. Understanding high-dose, ultra-high dose-rate and spatially fractionated radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 107 (4), 766–778. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.03.028>.
- Gudowska, I., Ardenfors, O., Toma-Dasu, I., Dasu, A., 2014. Radiation burden from secondary doses to patients undergoing radiation therapy with photons and light

- ions and radiation doses from imaging modalities. *Radiat Prot Dosim* 161, 357–362. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncz335>.
- Gutierrez, C., Rajendram, P., Pastores, S.M., 2021. Toxicities associated with immunotherapy and approach to cardiotoxicity with novel Cancer therapies. *Crit. Care Clin.* 37 (1), 47–67. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2020.08.003>.
- Hellman, S., Chaffey, J.T., Rosenthal, D.S., Moloney, W.C., Canellos, G.P., Skarin, A.T., 1977. The place of radiation therapy in the treatment of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* 39 (2 Suppl.), 843–851. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197702\)39:2<843::aid-cncr2820390720>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197702)39:2<843::aid-cncr2820390720>3.0.co;2-f).
- Heublein, A.C., 1932. A preliminary report on continuous irradiation of the entire body. *Radiology* 18, 1051–1060. <https://doi.org/10.1148/18.6.1051>.
- Holder, D.L., 1965. Total body irradiation in multiple myeloma. *Radiology* 84, 82–86. <https://doi.org/10.1148/84.1.82>.
- Hoppe, R.T., Kishlan, P., Kaplan, H.S., Rosenberg, S.A., Brown, B.W., 1981. The treatment of advanced stage favorable histology non-Hodgkin's lymphoma: a preliminary report of a randomized trial comparing single agent chemotherapy, combination chemotherapy, and whole-body irradiation. *Blood* 58 (3), 592–598. <https://doi.org/10.1182/blood.V58.3.592.592>.
- Janak, P., 1939. Essais d'une nouvelle technique de téléroentgénothérapie (cinéroentgénothérapie). *Bull. Mem. Soc. d'Electrodiol. Méd. de France* 27, 218–222.
- Jacobs, P., King, H.S., 1987. A randomized prospective comparison of chemotherapy to total body irradiation as initial treatment for the indolent lymphoproliferative diseases. *Blood* 69 (6), 1642–1646. <https://doi.org/10.1182/blood.V69.6.1642.1642>.
- Jacobs, M.L., Maramba, F.J., 1965. A four-year experience with total-body irradiation. *Radiology* 84, 452–456.
- Jaffray, D.A., 2012. Image-guided radiotherapy: from current concept to future perspectives. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9, 688–699. <https://doi.org/10.1038/nrclonc.2012.194>.
- Janiak, M.K., Wincenciak, M., Cheda, A., Nowosielska, E.M., Calabrese, E.J., 2017. Cancer immunotherapy: how low-level ionizing radiation can play a key role. *Cancer Immunol. Immunother.* 66, 819–832. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-1993-z>.
- Johnson, R.E., 1966. Evaluation of fractionated total-body irradiation in patients with leukemia and disseminated lymphomas. *Radiology* 86, 1085–1089. <https://doi.org/10.1148/86.6.1085>.
- Johnson, R.E., 1970. Total body irradiation of chronic lymphocytic leukemia: incidence and duration of remission. *Cancer* 25 (3), 523–530. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197003\)25:3<523::aid-cncr2820250305>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197003)25:3<523::aid-cncr2820250305>3.0.co;2-e).
- Johnson, R.E., 1972. Remission induction and remission duration with primary radiotherapy in advanced lymphosarcoma. *Cancer* 29 (6), 1473–1476. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197206\)29:6<1473::aid-cncr2820290609>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197206)29:6<1473::aid-cncr2820290609>3.0.co;2-3).
- Johnson, R.E., 1975. Management of generalized malignant lymphomata with "systemic" radiotherapy. *Br. J. Cancer* 31 (Suppl. II), 450–455.
- Johnson, R.E., 1976. Total body irradiation of chronic lymphocytic leukemia. Relationship between therapeutic response and prognosis. *Cancer* 37 (6), 2691–2696. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197606\)37:6<2691::aid-cncr2820370618>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197606)37:6<2691::aid-cncr2820370618>3.0.co;2-v).
- Johnson, R.E., 1977. Radiotherapy as primary treatment for chronic lymphocytic leukaemia. *Clin. Haematol.* 6 (1), 237–244.
- Johnson, R.E., 1979. Treatment of chronic lymphocytic leukemia by total body irradiation alone and combined with chemotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 5, 159–164. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(79\)90714-4](https://doi.org/10.1016/0360-3016(79)90714-4).
- Johnson, R.E., O'Connor, G.T., Levin, D., 1970. Primary management of advanced lymphosarcoma with radiotherapy. *Cancer* 25 (4), 787–791. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197004\)25:4<787::aid-cncr2820250407>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197004)25:4<787::aid-cncr2820250407>3.0.co;2-e).
- Kazem, I., 1975. Total body irradiation in the management of malignant lymphoma. *Radiol. Clin.* 44, 457–463. PMID: 1108102.
- Kimball, A.S., Webb, T.J., 2013. The roles of radiotherapy and immunotherapy for the treatment of lymphoma. *Mol. Cell. Pharmacol.* 5 (1), 27–38. PMID: 24648864. PMID: PMC3955882.
- Kinsella, T.J., Glaubiger, D., Diesseroth, A., Makuch, R., Waller, B., Pizzo, P., et al., 1983. Intensive combined modality therapy including low-dose TBI in high-risk Ewing's Sarcoma Patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 9 (12), 1955–1960. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(83\)90368-1](https://doi.org/10.1016/0360-3016(83)90368-1).
- Knoops, L., Haas, R., de Kemp, S., Majoor, D., Broeks, A., Eldering, E., et al., 2007. In vivo p53 response and immune reaction underlie highly effective low-dose radiotherapy in follicular lymphoma. *Blood* 110, 1116–1122. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-067579>.
- Kojima, S., Tsukimoto, M., Shimura, N., Koga, H., Murata, A., Takara, T., 2017. Treatment of cancer and inflammation with low-dose ionizing radiation: three case reports. *Dose Resp.* 15 (1) <https://doi.org/10.1177/1559325817697531>.
- Kojima, S., Cutler, J.M., Shimura, N., Koga, H., Murata, A., Kawashima, A., 2018. Present and future prospects of radiation therapy using  $\alpha$ -emitting nuclides. *Dose Resp.* 16 (1) <https://doi.org/10.1177/1559325817747387>.
- Kojima, S., Cutler, J.M., Inoguchi, K., Yorozu, K., Horii, T., Shimura, N., et al., 2019. Radon therapy is very promising as a primary or an adjuvant treatment for different types of cancers: 4 case reports. *Dose Resp.* 17 (2) <https://doi.org/10.1177/1559325819853163>.
- Kollmannsberger, C., Hartmann, J.T., Kanz, L., Bokemeyer, C., 1998. Risk of secondary myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome following standard-dose chemotherapy or high-dose chemotherapy with stem cell support in patients with potentially curable malignancies. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 124 (3–4), 207–214. <https://doi.org/10.1007/s004320050156>.
- Leimert, J.T., Corder, M.P., Tewfik, H.H., Guthrie, R., Maguire, L.C., Gingrich, R.D., 1979. Total body irradiation and cyclophosphamide, vincristine, and prednisone in the treatment of favorable prognosis non-Hodgkin's lymphomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 5, 1479–1483. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(79\)90753-3](https://doi.org/10.1016/0360-3016(79)90753-3).
- Leone, G., Mele, L., Pulsoni, A., Equitani, F., Pagano, L., 1999. The incidence of secondary leukemias. *Hematologica* 84 (10), 937–945. MID: 10509043.
- Loeffler, R.K., 1981. Therapeutic use of fractionated total body and subtotal body irradiation. *Cancer* 47 (9), 2253–2258. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(198109\)47:9<2253::aid-cncr2820470925>3.0.co;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-0142(198109)47:9<2253::aid-cncr2820470925>3.0.co;2-A).
- Loeffler, R.K., Pinterbaugh, M.R., 1975. The therapeutic use of fractionated subtotal body irradiation. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* 123 (1), 170–178.
- Loeffler, R.K., Collins, V.P., Hyman, G.A., 1953. Comparative effects of total body radiation, nitrogen mustard, and triethylene melamine on the hematopoietic system of terminal cancer patients. *Science* 118 (3058), 161–163. <https://doi.org/10.1126/science.118.3058.161-a>.
- Lybeert, M.L., Meerwaldt, J.H., Deneve, W., 1987. Long-term results of low dose total body irradiation for advanced non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 13 (8), 1167–1172.
- Mallet, L., 1936. Téléroentgénothérapie à doses faibles et prolongées des cancers généralisés. *Arch. d'Electric. Méd.* 44, 24–34.
- Marcus, C.S., 2015. Time to reject the linear-no threshold hypothesis and accept thresholds and hormesis: a petition to the U.S. Nuclear Regulatory Commission. *Clin. Nucl. Med.* 40, 617–619. <https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000835>.
- Marple, B., Wouters, B.G., Collins, S.J., Chalmers, A.J., Joiner, M.C., 2004. Low-dose hyper-radiosensitivity: a consequence of ineffective cell cycle arrest of radiation-damaged G2-phase cells. *Radiat. Res.* 161 (3), 247–255. <https://doi.org/10.1667/RR3130>.
- Marquis, P., Betoulou, P., 1949. Les leucémies (position actuelle de la radiothérapie). *J. Radiol. Electrol.* 30, 417–446.
- Medinger, F.G., Craver, L.F., 1942. Total body irradiation with review of cases. *Am. J. Roentgenol. Radiat. Therapy* 48, 651–671.
- Meerwaldt, J.H., Garde, P., Burgers, J.M., Moncondult, M., Thomas, J., Somers, R., et al., 1991. Low-dose total body irradiation versus combination chemotherapy for lymphomas with follicular growth pattern. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 21 (5), 1167–1172. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(91\)90272-6](https://doi.org/10.1016/0360-3016(91)90272-6).
- Mendeshall, N.P., Noyes, W.D., Million, R.R., 1989. Total body irradiation for stage II-IV non-Hodgkin's lymphoma: ten-year follow-up. *J. Clin. Oncol.* 7 (1), 67–74. <https://doi.org/10.1200/JCO.1989.7.1.67>.
- Menon, H., Dawei, C.D., Ramaprasad, R., Verma, V., Barsoumian, H.B., Cushman, T.R., et al., 2019. Influence of low-dose radiation on allopurinol responses in patients receiving high-dose radiation and immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* 7 (1), 237. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0718-6>.
- Mindes, B., Lubin, E., 1974. Radiation-induced leukemia in man. *Semin. Hematol.* 7, 192–210.
- Ng, J., Shuryak, I., 2015. Minimizing second cancer risk following radiotherapy: current perspectives. *Cancer Manag. Res.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S47220>.
- O'Donnell, J.F., Brereton, H.D., Greco, F.A., Gralnick, H.R., Johnson, R.E., 1979. Acute nonlymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia syndrome following radiation therapy for non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: clinical studies. *Cancer* 44 (5), 1930–1938. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197911\)44:5<1930::aid-cncr2820440556>3.0.co;2-E](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197911)44:5<1930::aid-cncr2820440556>3.0.co;2-E).
- Oakley, F.A., 2015. Is use of radiation hormesis the missing link to a better cancer treatment? *J. Cancer Ther.* 6, 601–605. <https://doi.org/10.4236/jct.2015.67065>.
- Osgood, E.E., Seaman, A.J., Tivey, H., 1955. Comparative survival times of X-ray treated versus P32 treated patients with chronic leukemias under the program of titrated, regularly spaced total-body irradiation. *Radiology* 64, 373–380. <https://doi.org/10.1148/64.3.373>.
- Palmieri, G.G., 1933. *Intorno alla telepneumirradiazione ed alla super-téléroentgénothérapie*. *Radiol. Med.* 20, 416–418.
- Palmieri, D.J., Matteo, S., Carlini, M.S., 2018. Immune checkpoint inhibitor toxicity. *Curr. Oncol. Rep.* 20 (9), 72. <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0718-6>.
- Pauls, B., Cosset, J.M., Le Bourgeois, J.P., 1985. The possible role of radiotherapy in chronic lymphocytic leukaemia: a critical review. *Radiother. Oncol.* 4 (1), 45–54. [https://doi.org/10.1016/0167-8140\(85\)90061-x](https://doi.org/10.1016/0167-8140(85)90061-x).
- Pedersen-Bjergaard, J., 1988. Therapy-related acute nonlymphocytic leukemia: clinical aspects. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.* 5, 207–209. <https://doi.org/10.1007/BF03003186>.
- Pedersen-Bjergaard, J., Ensbjell, J., Sorensen, H.M., Niles, K., Larsen, S.O., Philip, P., 1985. Risk of acute nonlymphocytic leukemia and preleukemia in patients treated with cyclophosphamide for non-Hodgkin's lymphoma. *Ann. Intern. Med.* 103, 195–200. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-103-2-195>.
- Pollycove, M., 2007. Radiobiological basis of low-dose irradiation in prevention and therapy of cancer. *Dose. 5*, 26–38. <https://doi.org/10.2203/dose-response.06-112.Pollycove>.
- Pulford, G.W.J., 1932. *De la roentgénothérapie totale* (Thèse Fac. Med. Paris). Vigot Frères, Paris.
- Qasim, M.M., 1975. Total body irradiation in non-Hodgkin lymphoma. *Strahlentherapie* 149, 364–367.
- Qasim, M.M., 1979. Total body irradiation as a primary therapy in non-Hodgkin lymphoma. *Clin. Radiol.* 30 (3), 287–289. [https://doi.org/10.1016/S0009-9260\(79\)80077-X](https://doi.org/10.1016/S0009-9260(79)80077-X).
- Rees, G.J., Ballmore, J.A., Lever, J.V., Pizey, N.C., 1980. Total body irradiation as a secondary therapy in non-Hodgkin's lymphoma. *Clin. Radiol.* 31 (4), 437–439. [https://doi.org/10.1016/S0009-9260\(80\)80185-1](https://doi.org/10.1016/S0009-9260(80)80185-1).
- Richard, P.M., Soubeyran, P., Eghball, H., Chacon, B., Marit, G., Broustet, A., et al., 1998. Place of low-dose total body irradiation in the treatment of localized follicular non-Hodgkin's lymphoma: results of a pilot study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 40, 387–390. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(97\)00222-0](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(97)00222-0).

- Roncadin, M., Arcicosa, M., Zagonel, V., Bortolus, R., Valeri, P., Pinto, A., et al., 1994. Total body irradiation and prednisone in chronic lymphocytic leukemia and low grade non-Hodgkin's lymphomas. A 9-year experience at a single institution. *Cancer* 74 (3), 978–984. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19940801\)74:3<978::aid-cncr2620740330>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19940801)74:3<978::aid-cncr2620740330>3.0.co;2-b).
- Rostom, A.Y., Peckham, M.J., 1977. Total body irradiation in advanced non-Hodgkin's lymphoma. *Eur. J. Cancer* 13 (11), 1241–1249. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(77\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0014-2964(77)90031-7).
- Rubin, P., Bernier, J.M., Begg, C., Bozdech, M.J., Silber, R., 1981. The comparison of total body irradiation vs chlorambucil and prednisone for remission induction of active chronic lymphocytic leukemia: an EOC study. I. Total body irradiation - response and toxicity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 7, 1623–1632. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(81\)90183-8](https://doi.org/10.1016/0360-3016(81)90183-8).
- Rückert, M., Deloch, L., Fietkau, R., Frey, B., Hecht, M., Galpi, U.S., 2018. Immune modulatory effects of radiotherapy as basis for well-reasoned radioimmunotherapies. *Strahlenther. Onkol.* 194 (6), 509–519. <https://doi.org/10.1007/s00066-018-1287-1>.
- Safwat, A., Aggerholm, N., Roitt, I., Overgaard, J., Høklund, M., 2004. Tumour burden and interleukin-2 dose affect the interaction between low-dose total body irradiation and interleukin-2. *Eur. J. Cancer* 40, 1412–1417. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.01.037>.
- Safwat, A., Schmidt, H., Baitholt, L., Fode, K., Larsen, S., Aggerholm, N., et al., 2005. A phase II trial of low-dose total body irradiation and subcutaneous interleukin-2 in metastatic melanoma. *Radiother. Oncol.* 77 (2), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2005.09.008>.
- Sakamoto, K., 2004. Radiobiological basis for cancer therapy by total or half-body irradiation. *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* 2, 293–316. <https://doi.org/10.1080/15401420490900254>.
- Sakamoto, K., Myojin, M., Hosoi, Y., Ogawa, Y., Nemoto, K., Takai, Y., et al., 1997. Fundamental and clinical studies on cancer control with total or upper half body irradiation. *J. Jpn. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 9, 161–175. <https://doi.org/10.11182/jstiro.1999.9.161>.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J., 2011. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>.
- Schwartz, G., 1990. Über die theoretischen und praktischen Grundlagen einer Lang-Schwach-Bestrahlungsmethode. *Strahlentherapie* 37, 709–718.
- Scott, B.R., 2008. Low-dose-radiation stimulated natural chemical and biological protection against lung cancer. *Dose Resp.* 6, 299–318. <https://doi.org/10.2203/dose-response.07-025.Scott>.
- Scott, B.R., 2014. Radiation-hormesis phenotypes, the related mechanisms and implications for disease prevention and therapy. *J. Cell Commun. Signal.* 8, 341–352. <https://doi.org/10.1007/s12079-014-0250-x>.
- Selina, K.S., Cohen, J.J., 1987. Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J. Immunol.* 139, 3199–3206. PMID: 3680944.
- Seth, I., Joiner, M.C., Tucker, J.D., 2013. Cytogenetic low-dose hypersensitivity is observed in human peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 91 (1), 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.09.020>.
- Spaltzner, M., 1936. Praktische Anwendung der Röntgenbestrahlung bei Polyzystämie und chronischen Leukämien. *Strahlentherapie* 56, 341–350.
- Sharma, D., Sandur, S.K., Rashmi, R., Maurya, D.K., Suryavanshi, S., Checker, R., et al., 2010. Differential activation of NF-kappaB and nitric oxide in lymphocytes regulates in vitro and in vivo radiosensitivity. *Mutat. Res.* 703, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.08.010>.
- Short, S.C., Kelly, J., Mayes, C.R., Woodcock, M., Joiner, M.C., 2001. Low-dose hypersensitivity after fractionated low-dose irradiation in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* 77 (6), 655–664. <https://doi.org/10.1080/09553000110041326>.
- Shoy, P., 1931. La roentgentherapie totale par champs séparés et la téléroentgentherapie dans la lymphogranulomatose. *Ann. Anat. Pathol.* 8, 926–929.
- Spain, L., Diem, S., Larkin, J., 2016. Management of toxicities of immune checkpoint inhibitors. *Cancer Treat. Rev.* 44, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.02.001>.
- Specht, L., 2016. Does radiation have a role in advanced stage Hodgkin's or non-Hodgkin lymphoma? *Curr. Treat. Options Oncol.* 17 (1), 4. <https://doi.org/10.1007/s11864-015-0377-x>.
- Teschendorf, W., 1927. Über Bestrahlungen des ganzen menschlichen Körpers bei Blutkrankheiten. *Strahlentherapie* 26, 720–728.
- Thar, T.L., Million, R.R., Noyes, W.D., 1979. Total body irradiation in non-Hodgkin's lymphoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 5 (2), 171–176. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(79\)90161-8](https://doi.org/10.1016/0360-3016(79)90161-8).
- Travis, L.B., Weeks, J., Curtis, R.E., Chaffey, J.T., Stovall, M., Banks, P.M., et al., 1996. Leukemia following low-dose total body irradiation and chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 14 (2), 565–571. <https://doi.org/10.1200/JCO.1996.14.2.565>.
- Tubiana, M., 2009. Can we reduce the incidence of second primary malignancies occurring after radiotherapy? A critical review. *Radiother. Oncol.* 91, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2008.12.016>.
- van Dijk-Mulder, A., 1979. Total-body irradiation in advanced lymphosarcoma. *Br. J. Radiol.* 52 (619), 568–570. <https://doi.org/10.1259/0007-1226-52-619-568>.
- Vermaelen, K., 2019. Vaccine strategies to improve anti-cancer cellular immune responses. *Front. Immunol.* 10, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00008>.
- Weick, J.K., Antunes, A., Kraus, T.A., Fahian, C.J., Dixon, D., 1983. The combined modality therapy of diffuse histology non-Hodgkin's lymphoma with cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, prednisone (CHOP) and total body irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 9 (8), 1205–1207. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(83\)90181-5](https://doi.org/10.1016/0360-3016(83)90181-5).
- Welsh, J.S., 2004. Waldenström's macroglobulinemia treated with fractionated low-dose total body irradiation. *Case Rep Clin Pract Rev* 5, 425–431. <http://www.ccr-pr-online.com/pub/case/vol5/5638.pdf>.
- Wodan, D., Sorace, R., Komarova, N.L., 2014. Dynamics of cellular responses to radiation. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003513. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003513>.
- Yang, G., Li, W., Jiang, H., Liang, X., Zhao, Y., Yu, D., et al., 2016. Low-dose radiation may be a novel approach to enhance the effectiveness of cancer therapeutics. *Int. J. Cancer* 139, 2157–2168. <https://doi.org/10.1002/ijc.30235>.
- Yaromina, A., Krause, M., Baumann, M., 2012. Individualization of cancer treatment from radiotherapy perspective. *Mol. Oncol.* 6 (2), 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.007>.
- Yilmaz, M.T., Elmali, A., Yazici, G., 2019. Abscopal Effect, From Myth to Reality: From Radiation Oncologists' Perspective. *Cureus* 11 (1), e3860. <https://doi.org/10.7759/cureus.3860>.
- Yonkosky, D.M., Feldman, M.I., Cathcart, E.S., Kim, S., 1978. Improvement of in vitro mitogen proliferative responses in non-Hodgkin's lymphoma patients exposed to fractionated total body irradiation. *Cancer* 42 (3), 1204–1210. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197809\)42:3<1204::aid-cncr2820420325>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197809)42:3<1204::aid-cncr2820420325>3.0.co;2-4).
- Young, R.C., Johnson, R.E., Canellos, G.P., Chabner, B.A., Brenner, H.D., Bernard, C.W., et al., 1977. Advanced lymphocytic lymphoma: randomized comparisons of chemotherapy and radiotherapy, alone or in combination. *Cancer Treat. Rep.* 61 (6), 1153–1159.
- Yu, H., Liu, N., Wang, H., Shang, Q., Jiang, P., Zhang, Y., 2013. Different responses of tumor and normal cells to low-dose radiation. *Contemp. Oncol. (Pozna.)* 17, 356–362. <https://doi.org/10.5114/wo.2013.35289>.
- Zappasodi, R., Papa, S.M., Ghedini, G.C., Borgarzone, I., Magni, M., Cabrera, A.D., et al., 2016. Improved clinical outcome in indolent B-cell lymphoma patients vaccinated with autologous tumor cells experiencing immunogenic death. *Cancer Res.* 76 (22), 9062–9072. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.ccr-16-1825>.
- Zarif, A., Albitar, A., Kim, P.Y., Hassan, S., Palaskas, N., Iliescu, C., et al., 2019. Cardiac toxicities of anticancer treatments: chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy. *Curr. Opin. Cardiol.* 34 (4), 441–450. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000641>.

**Prof. Marek Krzysztof Janiak, M.D., Ph.D.**, is a radiobiologist, immunologist, and experimental oncologist, former head of the Dept. of Radiobiology and Radiation Protection at the Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Warsaw, Poland, past President of the Polish Radiation Research Society, a member of the Board of the European Radiation Research Society, member of the Polish delegation to UNSCEAR, and member of the Nuclear Safety and Radiation Protection Board at the Polish National Atomic Energy Agency.

**Mateusz Pociąg, M.Sc.**, is a radiochemist, head of the Laboratory of Radiation Dose Control at the Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Warsaw, Poland. He has completed post-graduate studies at the Clinical Research of Medicinal Products, Collegium Medicum of the Jagiellonian University, Krakow, Poland. Currently, he is a Ph.D. student at the National Center for Nuclear Research and a student of medical studies.

**James S. Welsh, M.S., M.D.**, is a radiation oncologist, research physicist and biologist at Loyola University Stritch School of Medicine and Edward Hines Jr VA Hospital in Chicago, IL, USA. He is the Director of Translational Research in the Dept. of Radiation Oncology at the Stritch School of Medicine and is Chief of Radiation Oncology at the Hines VA Hospital. He is a Past President of the American College of Radiation Oncology and former member of the Advisory Committee on the Medical Uses of Isotopes (ACMUI) for the United States Nuclear Regulatory Commission.

Ewa M. Nowosielska., Aneta Cheda, Mateusz Pocięgiel, Łukasz Cheda,  
Paweł Szymański, Antoni Więdłocha

**Effects of a Unique Combination of the  
Whole-Body Low Dose Radiotherapy with  
Inactivation of Two Immune Checkpoints  
and/or a Heat Shock Protein on the  
Transplantable Lung Cancer in Mice**

*International Journal of Molecular Science 2021*



Article

# Effects of a Unique Combination of the Whole-Body Low Dose Radiotherapy with Inactivation of Two Immune Checkpoints and/or a Heat Shock Protein on the Transplantable Lung Cancer in Mice

Ewa M. Nowosielska <sup>1,\*</sup>, Aneta Cheda <sup>1,†</sup>, Mateusz Pociąg <sup>2</sup>, Lukasz Cheda <sup>3</sup>, Paweł Szymański <sup>1,4</sup> and Antoni Wiedlocha <sup>1,5,6</sup>



**Citation:** Nowosielska, E.M.; Cheda, A.; Pociąg, M.; Cheda, L.; Szymański, P.; Wiedlocha, A. Effects of a Unique Combination of the Whole-Body Low Dose Radiotherapy with Inactivation of Two Immune Checkpoints and/or a Heat Shock Protein on the Transplantable Lung Cancer in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6309. <https://doi.org/10.3390/ijms22126309>

Academic Editor: Philippe Moreau

Received: 24 May 2021

Accepted: 10 June 2021

Published: 11 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Department of Radiobiology and Radiation Protection, Military Institute of Hygiene and Epidemiology, 4 Kozielska St., 01-163 Warsaw, Poland; aneta.cheda@wihe.pl (A.C.); pawel.szymanski@wihe.pl (P.S.); antoni.wiedlocha@ous-research.no (A.W.)
  - <sup>2</sup> National Centre for Nuclear Research Radioisotope Centre POLATOM, 7A Soltana St., 05-400 Otwock, Poland; mateusz.pociag@ncbj.gov.pl
  - <sup>3</sup> Faculty of Chemistry, Biological and Chemical Research Centre, University of Warsaw, 101 Żwirki i Wigury St., 02-089 Warsaw, Poland; lcheda@chem.uw.edu.pl
  - <sup>4</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry, Drug Analyses and Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, 1 Muszyńskiego St., 90-151 Lodz, Poland
  - <sup>5</sup> Department of Molecular Cell Biology, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo University Hospital, Montebello, 0379 Oslo, Norway
  - <sup>6</sup> Centre for Cancer Reprogramming, Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, University of Oslo, Montebello, 0379 Oslo, Norway
- \* Correspondence: ewa.nowosielska@wihe.pl; Tel.: +48-261853066
- † These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Non-small cell lung cancer (NSCLC) continues to be the leading cause of cancer death worldwide. Recently, targeting molecules whose functions are associated with tumorigenesis has become a game changing adjunct to standard anti-cancer therapy. As evidenced by the results of preclinical and clinical investigations, whole-body irradiations (WBI) with X-rays at less than 0.1–0.2 Gy per fraction can induce remissions of various neoplasms without inciting adverse side effects of conventional chemo- and radiotherapy. In the present study, a murine model of human NSCLC was employed to evaluate for the first time the anti-neoplastic efficacy of WBI combined with inactivation of CTLA-4, PD-1, and/or HSP90. The results indicate that WBI alone and in conjunction with the inhibition of the function of the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) and the programmed death-1 (PD-1) receptor immune checkpoints (ICs) and/or heat shock protein 90 (HSP90) markedly reduced tumorigenesis in mice implanted by three different routes with the syngeneic Lewis lung cancer cells and suppressed clonogenic potential of Lewis lung carcinoma (LLC1) cells in vitro. These results were associated with the relevant changes in the profile of pro- and anti-neoplastic immune cells recruited to the growing tumors and the circulating anti- and pro-inflammatory cytokines. In contrast, inhibition of the tested molecular targets used either separately or in combination with each other did not exert notable anti-neoplastic effects. Moreover, no significant synergistic effects were detected when the inhibitors were applied concurrently with WBI. The obtained results supplemented with further mechanistic explanations provided by future investigations will help design the effective strategies of treatment of lung and other cancers based on inactivation of the immune checkpoint and/or heat shock molecules combined with low-dose radiotherapy.

**Keywords:** low dose irradiation; immune checkpoints; anti HSP90 chaperone; lung tumor; mice

## 1. Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality in men aged  $\geq 40$  years and women aged  $\geq 60$  years, causing far more deaths than other dominant cancers of men

and women [1]. The great majority (80–85%) of newly diagnosed cases of lung cancer are non-small cell carcinomas (NSCLC) [2]. Currently, patients with NSCLC are treated with all the three conventional therapeutic methods, i.e., surgery, chemotherapy, and radiotherapy. In the latter case, localized irradiations of the tumor with large doses of X- or gamma rays, which are divided into smaller fractions applied over several days or weeks, are used [3]. Such irradiations, often combined with chemotherapy, can lead to more or less durable remissions [4,5]. Generally, however, the prognosis for NSCLC patients, which are often diagnosed at an advanced stage of the disease, remains poor [2,6].

In contrast to local irradiations of the tumor with doses in the range of 1–2 Gy per fraction, exposures of the whole body of patients at low doses, i.e., not exceeding 0.1–0.2 Gy per fraction [7], do not kill or injure normal cells and are devoid of such adverse effects of the high-dose irradiations as inflammation, immunosuppression, and secondary cancers (reviewed in [8,9]). Indeed, as evidenced by the results of numerous animal studies including our own (reviewed in [8]) and, especially, of more than forty reliable clinical trials performed since the early 1930s having documented that fractionated whole-body irradiations (WBI) improve long-term overall survival and cure rates in patients with advanced hematological and solid neoplasms (reviewed in [9]). Arguably, a crucial underlying mechanism of such effects is up-regulation of the function of the immune system, the organism's most important guardian against cancer (reviewed in [8,10,11]).

However, the WBI-induced immunostimulation may also possibly trigger the activity of immune checkpoints (ICs), which dampen T cell activation and thereby allow tumors to escape the elimination by cytotoxic lymphocytes. Consequently, in the last decade, inhibition of the function of ICs has become an important novel form of therapy of patients with malignancies, including lung cancer (reviewed in [12–19]). As demonstrated by the accumulated evidence, application of monoclonal antibodies against the two best characterized ICs, the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) and the programmed death-1 (PD-1) receptor, constitutes a major breakthrough in experimental and clinical oncology and demonstrates the potential of immune-mediated therapies in achieving durable cancer remissions [13,16,20–23]. Along these advances, effects of the inhibition of ICs combined with radiotherapy have been investigated in both pre-clinical and clinical settings. The results demonstrate that the immune checkpoint blockade in conjunction with localized irradiations of a bulk tumor mass is more efficient than standard chemo- and/or radiotherapy [18,22,24–30]. Thus far, however, no experimental or clinical studies have been designed to evaluate the effects of the combined application of WBI and anti-immune checkpoint(s) molecules.

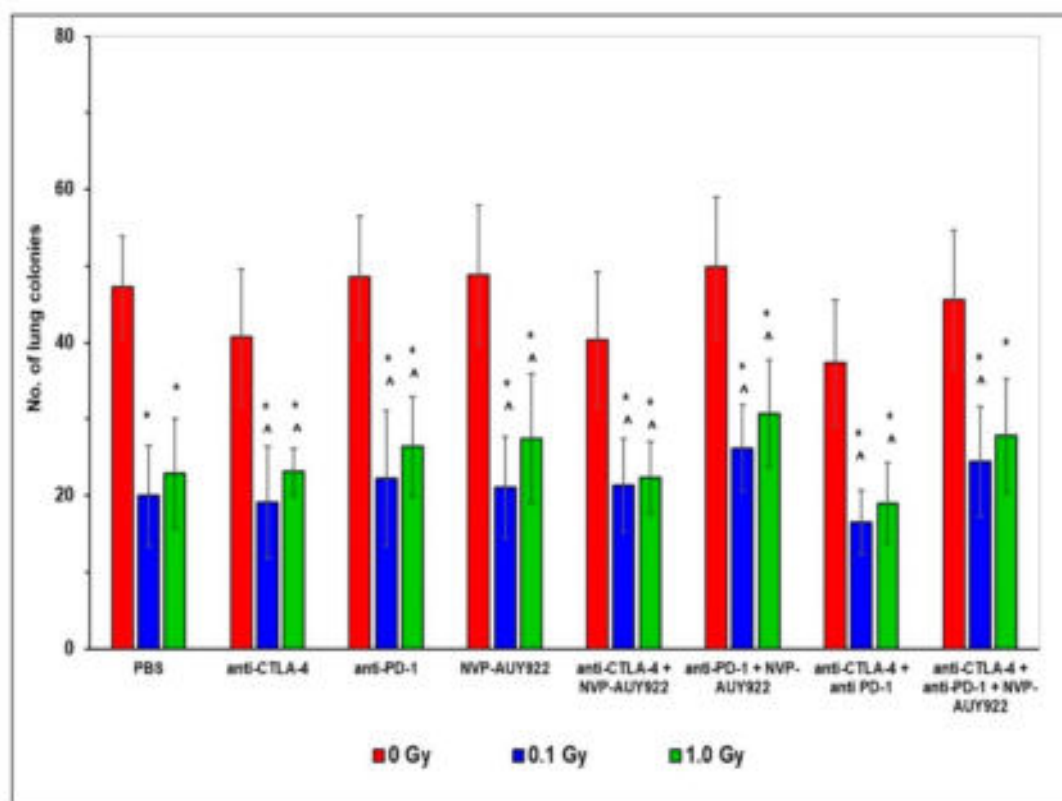
In addition to stimulation of the anti-neoplastic immunity, blockade of intracellular molecules that promote cancer progression has been tested in preclinical models as a potential anti-cancer treatment. Among the molecular targets of such treatment are heat shock proteins (HSPs), such as HSP90, which facilitate the function of oncoproteins (reviewed in [31–33]) and have been considered as co-factors for the development and progression of the malignant phenotype [24,34,35]. Indeed, poor prognosis in patients with multiple tumors, including lung cancer, has been coupled to overexpression of HSP90 [36,37]. Consequently, the results of both preclinical and clinical studies have demonstrated that inhibition of the function of HSP90 can stifle progression of lung carcinoma and other malignancies [33,38–42].

Hence, the aim of the present investigation was to evaluate the therapeutic efficacy of WBI of the lung tumor-bearing mice combined with the blockade of the function of one or two ICs and/or the HSP90 chaperone. To this end, we employed syngeneic Lewis lung carcinoma (LLC1) cells injected into C57BL/6 mice via three different routes: (a) intravenously (i.v.), to assess the development of the induced tumor colonies in the lungs, spleen, and liver; (b) orthotopically (o.t.), to evaluate the growth of a primary tumor in the injected lung and its possible metastases in other organs; and (c) subcutaneously (s.c.), to follow the development of a measurable primary tumor and the occurrence of its possible metastases to internal organs. Clonogenic potential *in vitro* of the tumor cells obtained from the mice

injected with the LLC1 cells was also estimated. In addition, given the importance of immune cells in the tumor microenvironment (reviewed in [43–45]), the tumor-infiltrating T lymphocytes (TILs) and natural killer (NK) lymphocytes as well as tumor-associated macrophages (TAMs) were quantified in the pulmonary and subcutaneously growing tumors in mice injected with LLC1 cells. Additionally, the levels of the selected pro- and anti-inflammatory cytokines involved in immune surveillance were estimated.

## 2. Results

As shown in Figure 1, fractionated WBI at total doses of 0.1 and 1.0 Gy led to the significant reduction in the number of tumor colonies developing in the lungs of the C57BL/6 mice after the i.v. injection of the LLC1 cells. In contrast, neither of the inhibitors of the function of CTLA-4, PD-1, or HSP90 applied separately or in combination with each other appeared to significantly suppress the development of the tumor colonies. Moreover, application of these inhibitors together with WBI did not significantly affect the anti-neoplastic effect of the latter, although the number of tumors in the lungs tended to be lower in mice irradiated at total doses of 0.1 or 1.0 Gy and concurrently treated with the anti-CTLA-4 and anti-PD-1 molecules. Noticeably, the use of WBI with any of the tested blockers, applied alone or in combination, was significantly more efficient in suppressing the development of tumor colonies than either of the inhibitors used alone. This effect tended to be more pronounced when the animals were irradiated at the smaller total dose of 0.1 Gy (Figure 1).



**Figure 1.** Tumor colonies in the lungs of C57BL/6 mice intravenously (i.v.) injected with Lewis lung carcinoma (LLC1) cells and treated with blockers of the immune checkpoints and/or heat shock protein 90 (HSP90) combined with whole-body irradiations (WBI) at total doses of 0.1 and 1.0 Gy. Mean values  $\pm$  SD obtained from experiments conducted on ten mice per group are presented. \* indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with PBS; Δ indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with the same inhibitory molecules.

In this set of experiments, no macroscopic tumor metastases were observed in the spleens and livers of mice i.v. injected with the LLC1 cells.

As demonstrated by the data presented in Table 1, the in vitro clonogenic capacity (CC) of the tumor cells obtained from the lungs of mice i.v. injected with the LLC1 cells was markedly suppressed by WBI at both total doses. Compared to the effects of the inhibitors of the function of CTLA-4, PD-1, and/or HSP90 used alone or in combination with each other, additional treatment with WBI appeared to be clearly more efficient in suppressing the CC of the lung-derived tumor cells. This latter effect was apparently more pronounced when the mice were irradiated at 0.1 Gy rather than 1.0 Gy of the total dose (Table 1).

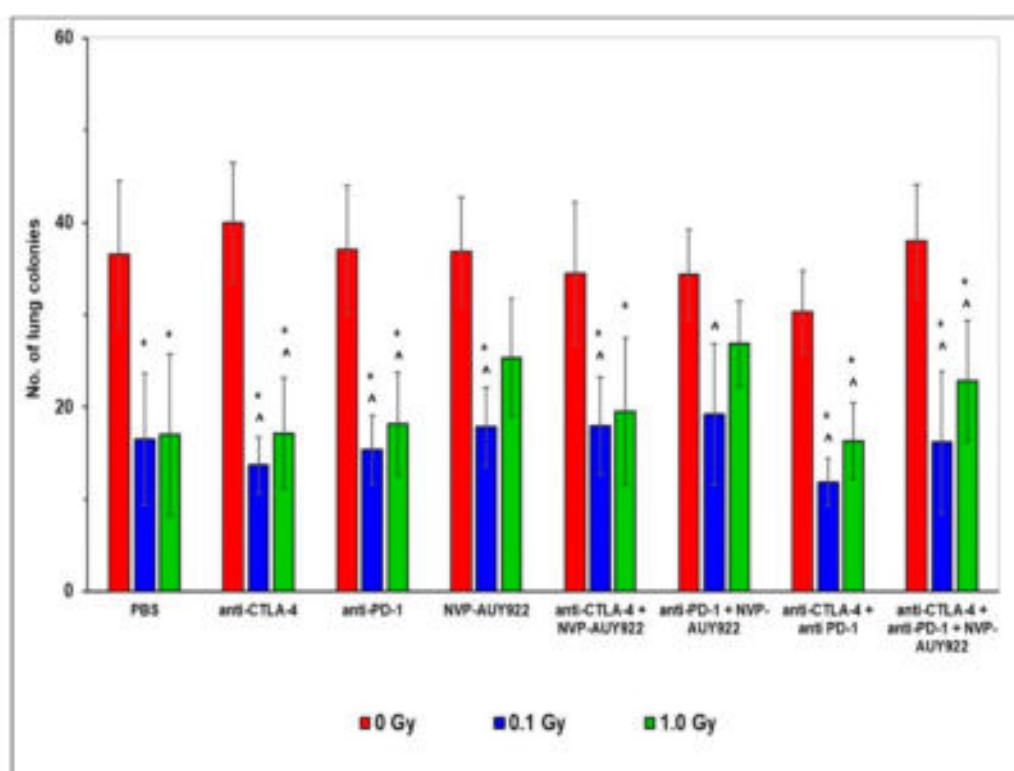
**Table 1.** Clonogenic capacity (CC) in vitro of tumor cells obtained from the lungs of C57BL/6 mice (intravenously) i.v. injected with LLC1 cells and treated with blockers of the immune checkpoints and/or heat shock protein 90 (HSP90) combined with whole-body irradiations (WBI) at total doses of 0.1 and 1.0 Gy. Results are expressed as percentages of the control value (100%).

| Groups                               | 0 Gy   | 0.1 Gy  | 1.0 Gy  |
|--------------------------------------|--------|---------|---------|
| PBS                                  | 100.0  | 65.1 *  | 72.8 *  |
| anti-CTLA-4                          | 80.4   | 50.6 ** | 61.9 ** |
| anti-PD-1                            | 90.2   | 60.9 ** | 69.8 ** |
| NVP-AUY922                           | 91.9   | 62.1 ** | 69.4 ** |
| anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 81.3   | 53.2 ** | 62.1 ** |
| anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 103.0  | 70.6 ** | 79.6 *  |
| anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 67.2 * | 43.4 ** | 50.7 ** |
| anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 95.3   | 66.8 ** | 81.3    |

The results obtained from experiments conducted on six mice per group are presented. \* indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with PBS; \* indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with the same molecule or combination of the molecules.

In this set of experiments, no tumor cell colonies (clones) developed in vitro when the plates were seeded with cell suspensions obtained from the spleens or livers of the LLC1 cells-injected mice from all the experimental and control groups.

After o.t. injection of the LLC1 cells, not only the primary tumor, but also metastatic colonies were expected to develop in the lungs, liver, and spleen. Hence, total numbers of macroscopic tumor hotbeds were counted in these organs. As shown in Figure 2, similar to the results presented in Figure 1, fractionated WBI at total doses of 0.1 and 1.0 Gy led to the significant reduction in the number of tumors developing in the lungs of the C57BL/6 mice o.t. injected with the LLC1 cells. In contrast, neither of the inhibitors of CTLA-4, PD-1, and/or HSP90 applied solely or in combination with each other appeared to suppress the development of the lung tumors. Moreover, addition of the inhibitors to WBI did not appear to synergistically impact the tumoricidal effect of the latter, although exposure at the smaller total dose of WBI along with application of the anti-CTLA-4 molecules, especially when combined with the anti-PD-1 but not with the anti-HSP90 molecules, was clearly more efficient in this regard. Notably, the anti-neoplastic effect of WBI used together with any of the tested blockers, applied both alone and in combination, was significantly more pronounced than the effect of the inhibitors used separately or with one another. Again, combination with WBI at the smaller total dose tended to be more efficient in this regard (Figure 2).



**Figure 2.** Tumor colonies in the lungs of C57BL/6 mice orthotopically (o.t.) injected with LLC1 cells and treated with blockers of the immune checkpoints and/or HSP90 combined with WBI at total doses of 0.1 and 1.0 Gy. Mean values  $\pm$  SD obtained from experiments conducted on ten mice per group are presented. \* indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with PBS;  $\Delta$  indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with the same molecule or combination of the molecules.

As in the case of the standard lung colony assay, no macroscopic tumor metastases were detected in the spleens and livers of mice orthotopically injected with LLC1 cells.

Similar to the results shown in Table 1, CC in vitro of the tumor cells obtained from the lungs directly implanted with the LLC1 cells was suppressed by WBI at both total doses, although the effect was significant only after exposure at 0.1 Gy total dose (Table 2). In contrast, in the majority of cases, sole application of any of the anti-CTLA-4, anti-PD-1, and/or anti-HSP90 molecules used either alone or in combination with each other did not affect the clonogenic potential of the lung-derived tumor cells. The only exception was the combined application of the anti-CTLA-4 and the anti-PD-1 molecules which significantly thwarted the growth of the tumor clones in vitro. Compared to the effects of the molecular inhibitors used alone, additional treatment with WBI appeared to be clearly more efficient in suppressing the CC of the lung-derived tumor cells. This latter effect was noticeably more pronounced when mice were irradiated at 0.1 Gy rather than 1.0 Gy of the total dose (Table 2). Moreover, combined blockade of the function of CTLA-4 and PD-1 applied concurrently with WBI resulted in the synergistic reduction of the clonogenic potential of the lung-derived tumor cells, the effect being more pronounced in mice exposed at 0.1 Gy total dose.

As in the case of the standard lung colony assay, in all the experimental and control groups, no tumor cell colonies (clones) developed in vitro when the plates were seeded with cell suspensions obtained from the spleens or livers of mice whose left lung was o.t. injected with the LLC1 cells.

**Table 2.** Clonogenic capacity (CC) in vitro of tumor cells obtained from the lungs of C57BL/6 mice orthotopically (o.t.) injected with LLC1 cells and treated with blockers of the immune checkpoints and/or HSP90 combined with WBI at total doses of 0.1 and 1.0 Gy. Results are expressed as percentages of the control value (100%).

| Groups                               | 0 Gy   | 0.1 Gy  | 1.0 Gy  |
|--------------------------------------|--------|---------|---------|
| PBS                                  | 100.0  | 70.5 *  | 81.1    |
| anti-CTLA-4                          | 92.1   | 56.8 *  | 66.2 *  |
| anti-PD-1                            | 98.6   | 64.0 *  | 77.7 *  |
| NVP-AUY922                           | 90.6   | 61.9 *  | 71.7 *  |
| anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 86.8   | 69.1 *  | 74.1 *  |
| anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 103.6  | 70.5 *  | 78.4    |
| anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 63.5 * | 47.2 ** | 54.0 ** |
| anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 102.2  | 72.7 *  | 85.6    |

The results obtained from experiments conducted on six mice per group are presented. All abbreviations are explained in Materials and Methods.

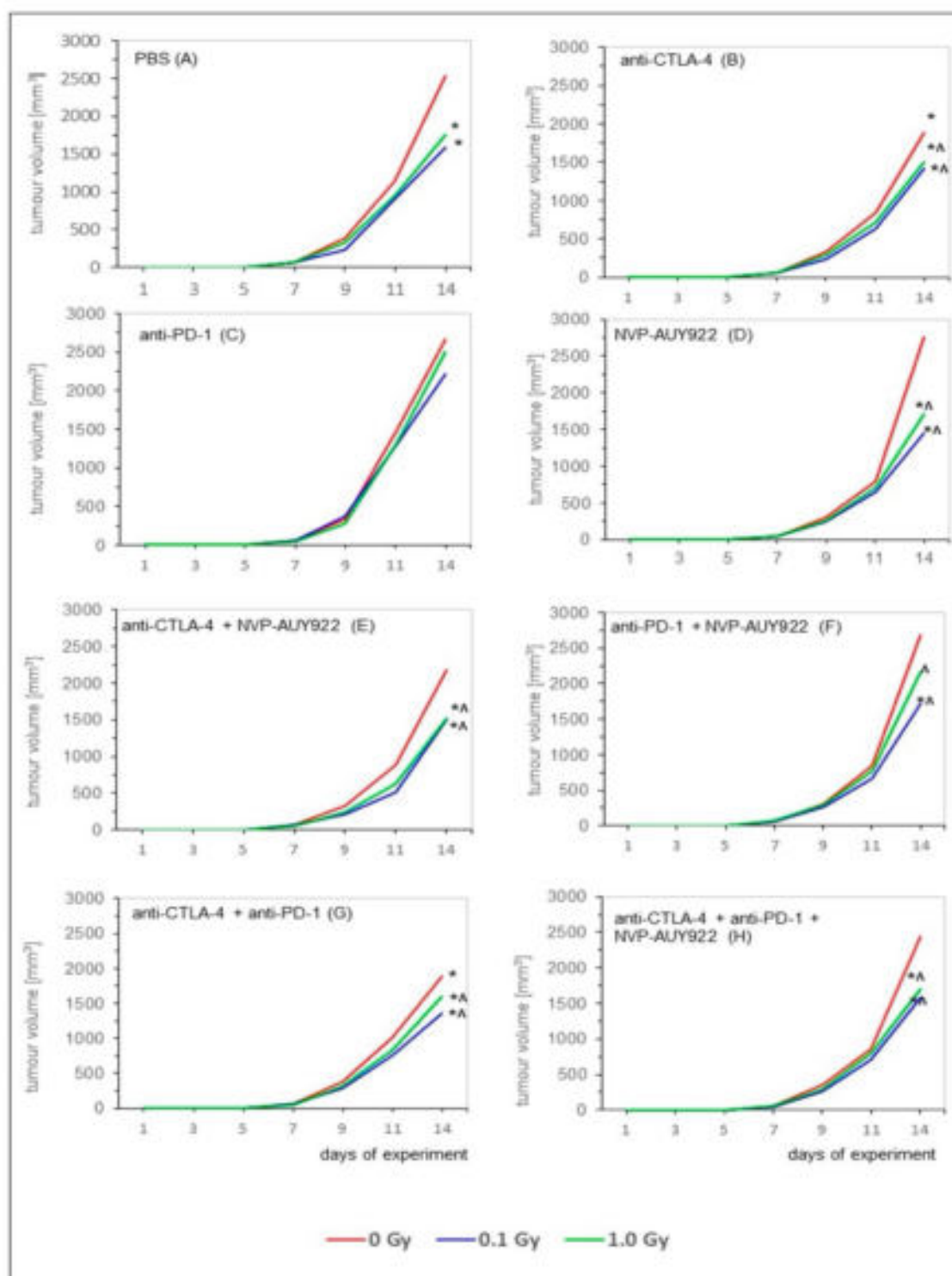
\* indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with PBS; \* indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with the same molecule or combination of the molecules;

# indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in mice injected with PBS and exposed to the respective WBI.

Finally, as indicated in Figure 3, WBI at both 0.1 and 1.0 Gy total doses administered in five daily fractions exhibited the significant anti-neoplastic activity as judged by the reduced volume of the s.c. growing tumors developing from the implanted LLC1 cells (Figure 3A). Comparable effect was detected after inhibition of the function of CTLA-4 used alone and in combination with the blockade of the PD-1 receptor or HSP90 protein. Noticeably, in most of the cases (the only exception being combination with the anti-PD-1 molecules), concurrent use of WBI at both total doses and the inhibitors exerted the markedly more pronounced anti-neoplastic effect than either combination of the inhibitory molecules used alone. Once again, combination of these molecules with WBI at the smaller total dose tended to be more efficient in this regard (Figure 3).

No macroscopic tumor colonies in the lungs, spleens, and livers nor the clones of the LLC1 cells of mice, which had been subcutaneously implanted with the LLC1 cells, were detected.

As shown in Table 3, the CD4+/CD8+ T lymphocytes ratio among the cells obtained from the lungs of mice i.v. or o.t. injected with the LLC1 cells was markedly decreased after WBI at both total doses. The effect was also significant when irradiation was accompanied by application of anti-CTLA-4 alone or in combination with anti-PD-1 or anti-HSP90 molecules. In contrast, the sole application of any of the inhibitory molecules used either alone or in combination with each other did not affect the CD4+/CD8+ ratios. Similarly, the CD4+/CD8+ ratios determined among the cells obtained from the subcutaneously implanted tumors were not affected by the treatment with any of the anti-CTLA-4, anti-PD-1, and/or anti-HSP90 molecules used either alone or in combination with each other. The only exception was the combined use of the anti-CTLA-4 and the anti-PD-1 molecules which significantly decreased the CD4+/CD8+ ratio which was further significantly reduced by WBI at 1 Gy total dose. The latter reduction was also noted when WBIs accompanied the application of any of the anti-CTLA-4, anti-PD-1, and/or anti-HSP90 molecules used either alone or in combination with each other, but the CD4+/CD8+ ratios were still somewhat higher than the one detected after the sole irradiation at 1.0 total dose.



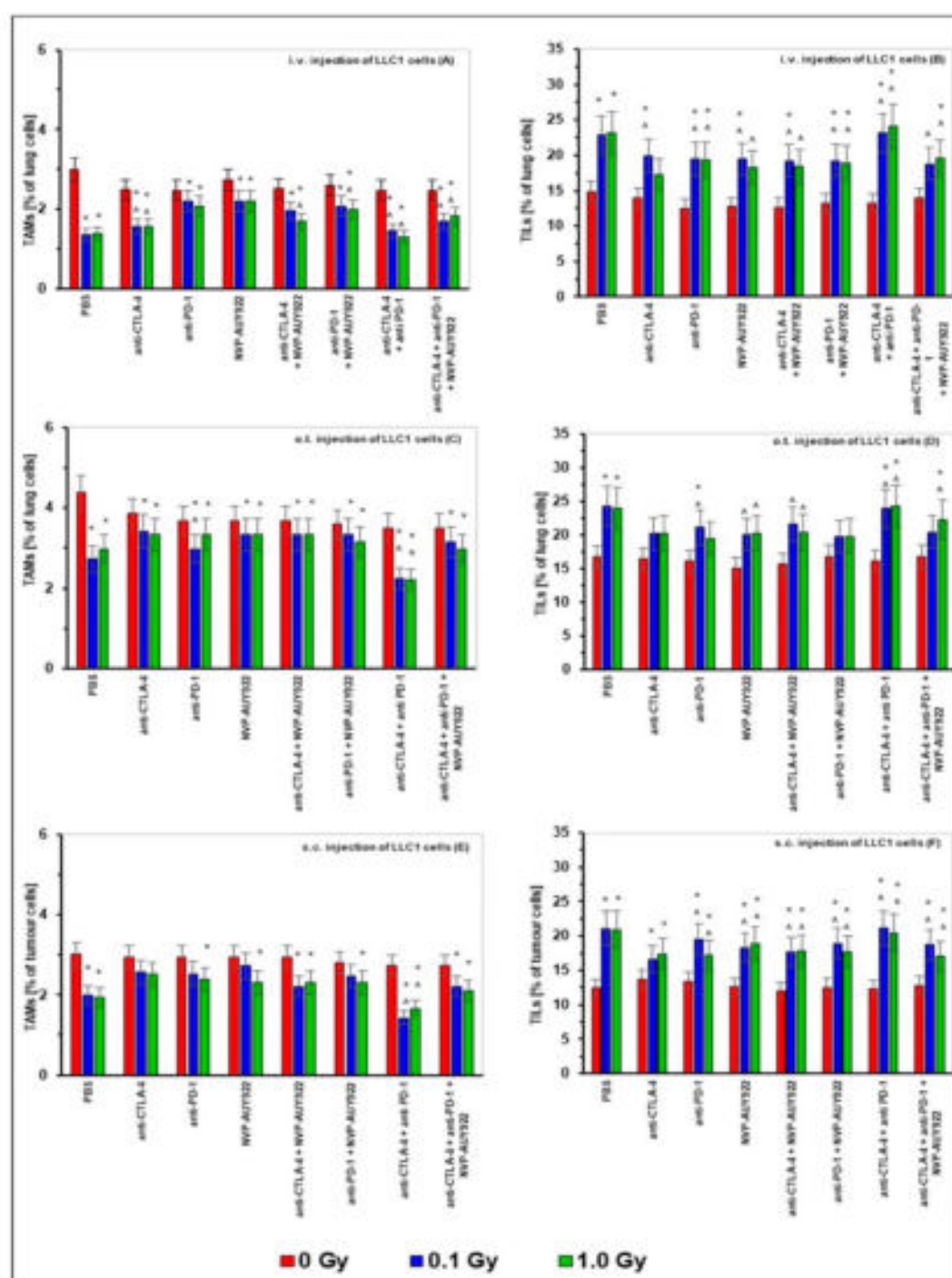
**Figure 3.** Tumor growth in C57BL/6 mice s.c. injected with LLC1 cells and exposed to WBI at total doses of 0.1 or 1.0 Gy combined with the blockade of the function of one or two immune checkpoints and/or HSP90. The curves formed from mean values of the tumor volumes measured in 6 mice per group are presented. \* indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with PBS; \* indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with the same molecule or combination of the molecules.

**Table 3.** The CD4+/CD8+ T lymphocyte ratios among the cells obtained from the lungs after i.v. or o.t. injection of LLC1 cells or from tumors grown subcutaneously in C57BL/6 mice treated with blockers of the immune checkpoints and/or HSP90 combined with WBI at total doses of 0.1 and 1.0 Gy.

| Method of Injection of LLC1 Cells | Groups                               | CD4+/CD8+ Ratio |        |        |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------|--------|--------|
|                                   |                                      | 0 Gy            | 0.1 Gy | 1.0 Gy |
| i.v.                              | PBS                                  | 5.9             | 4.4    | 4.4    |
|                                   | anti-CTLA-4                          | 5.7             | 4.5    | 5.2    |
|                                   | anti-PD-1                            | 5.8             | 5.2    | 5.1    |
|                                   | NVP-AUY922                           | 5.8             | 5.3    | 5.1    |
|                                   | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 5.8             | 4.9    | 4.9    |
|                                   | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 5.9             | 5.0    | 5.1    |
|                                   | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 5.6             | 3.5    | 3.8    |
|                                   | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 5.7             | 5.1    | 5.2    |
| o.t.                              | PBS                                  | 6.1             | 4.3    | 3.3    |
|                                   | anti-CTLA-4                          | 6.2             | 4.8    | 3.3    |
|                                   | anti-PD-1                            | 6.1             | 5.6    | 4.1    |
|                                   | NVP-AUY922                           | 6.1             | 5.6    | 4.1    |
|                                   | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 6.1             | 5.3    | 3.8    |
|                                   | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 6.2             | 5.3    | 3.8    |
|                                   | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 6.0             | 3.8    | 1.6    |
|                                   | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 6.0             | 5.4    | 3.9    |
| s.c.                              | PBS                                  | 5.4             | 4.5    | 3.3    |
|                                   | anti-CTLA-4                          | 5.2             | 5.6    | 4.1    |
|                                   | anti-PD-1                            | 5.1             | 5.4    | 3.9    |
|                                   | NVP-AUY922                           | 5.1             | 5.4    | 3.8    |
|                                   | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 4.9             | 5.3    | 3.8    |
|                                   | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 5.1             | 5.4    | 3.9    |
|                                   | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 3.8             | 3.6    | 1.6    |
|                                   | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 5.2             | 5.3    | 3.8    |

The results obtained from experiments conducted on six (i.v. or o.t. injection of LLC1 cells) or three (s.c. injection) mice per group are presented. All abbreviations are explained in Materials and Methods.

As indicated in Figure 4, the numbers of TAMs (CD11b+Ly6C+Ly6G+) in the lungs of mice i.v. or o.t. injected with LLC1 cells as well as in s.c. implanted tumors were significantly reduced by WBI at both total doses of X-rays, whereas sole application of any of the anti-CTLA-4, anti-PD-1, and/or anti-HSP90 molecules used either alone or in combination with each other did not affect these numbers. WBI combined with application of any of the anti-CTLA-4, anti-PD-1, and/or anti-HSP90 molecules used alone or in combination, resulted in the majority of cases in the increased percentages of TAMs in both the pulmonary and subcutaneous tumors, the effect being most pronounced when irradiations at both total doses were combined with application of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 molecules. In turn, the numbers of TILs (CD3+CD45+) in the lungs of mice i.v. or o.t. injected with LLC1 cells as well as in s.c. implanted tumors were significantly elevated by WBI at both total doses of X-rays. In contrast, sole application of any of the anti-CTLA-4, anti-PD-1 and/or anti-HSP90 molecules used either alone or in combination with each other did not affect these cells' numbers. However, irradiations combined with application of any of the anti-CTLA-4, anti-PD-1, and/or anti-HSP90 molecules used alone or, in most cases, in combination with each other, increased the percentages of TILs in both the lungs and subcutaneous tumors.



**Figure 4.** The percentages of tumour-associated macrophages (TAMs) (panels A,C,E) and tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) (panels B,D,F) in the lungs after i.v. (panels A,B) or o.t. (panels C,D) injection with LLC1 cells or in tumors after s.c. (panels E,F) injection of LLC1 cells to C57BL/6 mice treated with blockers of the immune checkpoints and/or HSP90 combined with WBI at total doses of 0.1 and 1.0 Gy. The bars indicate mean percentages of TAMs and TILs calculated for six (i.v. and o.t. injection of tumor cells) or three (s.c. injection of tumor cells) mice per group are presented. \* indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with PBS; ^ indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with the same inhibitory molecule or a combination of these molecules.

As in the case of TILs, percentages of NK (CD49b+CD335+) and CTL (CD8+CD178+) lymphocytes in the lungs of mice i.v. or o.t. injected with LLC1 cells were significantly elevated by WBI at both total doses of X-rays (Figure 5A–D). In contrast, sole application of any of the anti-CTLA-4, anti-PD-1, and/or anti-HSP90 molecules used either alone or in combination with each other did not affect the numbers of these cells. However, irradiations combined with application of any of the inhibitors used alone and in combination with each other increased, in the majority of cases, the relative numbers of NK cells and CTLs in the lungs. The latter effect seemed to be most pronounced when WBIs at both total doses were accompanied by application of anti-CTLA-4 in combination with anti-PD-1 molecules. Likewise, the numbers of NK cells and CTLs in the s.c. implanted tumors were significantly elevated by WBI at both total doses of X-rays. An even more pronounced effect was detected when irradiations were accompanied by the combined application of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 molecules. In contrast, in the majority of cases, the sole application of any of the anti-CTLA-4, anti-PD-1, and/or anti-HSP90 molecules used either alone or in combination with each other did not significantly affect the numbers of NK cells and CTLs in the subcutaneously growing tumors (Figure 5E,F).

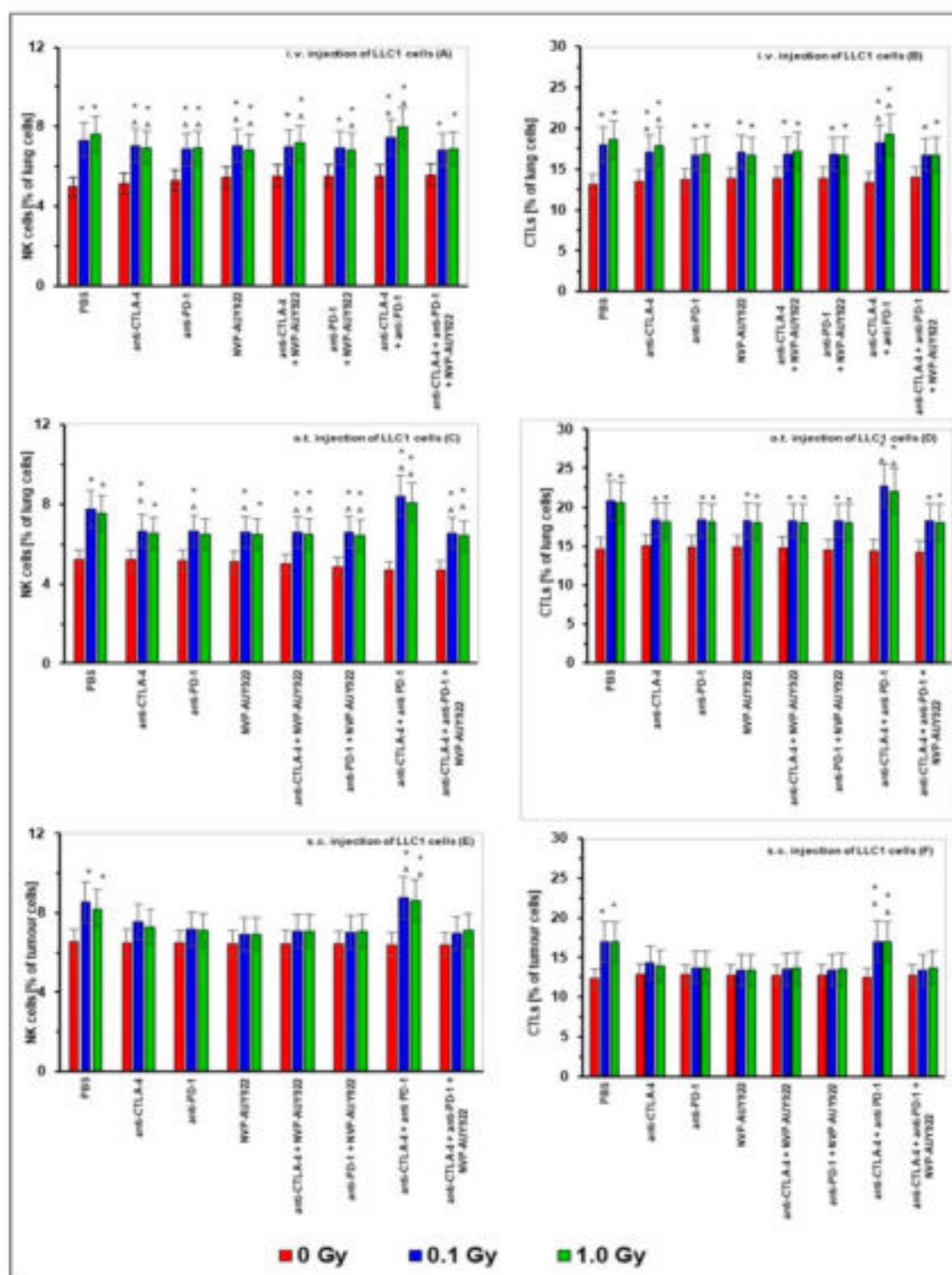
As shown in Figure 6, the population of Treg CD4+CD25+FoxP3+ and Th17 (CD4+IL17A+) lymphocytes in the lungs of mice i.v. or o.t. injected with LLC1 cells as well as in s.c. implanted tumors were significantly reduced by WBI at both total doses of X-rays. This reduction did not seem to be significantly affected by the concurrent application of the inhibitory molecules used either alone or in combination with the exception of the effect of the combined use of the anti-CTLA-4 and anti-PD-1 molecules on the numbers of Treg cells. Notably, sole application of the anti-CTLA-4, anti-PD-1, and/or anti-HSP90 molecules used either alone or in combination with each other did not markedly impact on the numbers of Treg and Th17 lymphocytes recovered from the tumorous tissues (Figure 6A–F).

Serum levels of the putatively anti-inflammatory TGF- $\beta$  (Table S1) and IL-10 (Table S2) in mice i.v., o.t., or s.c. injected with LLC1 cells were significantly reduced by WBI at 0.1 and 1.0 Gy total doses of X-rays, the effect being more pronounced after irradiation with the former total dose. In contrast, the sole application of any of the inhibitors used either alone or in combination with each other did not affect these cytokines' levels. However, WBI combined with application of any of the anti-CTLA-4, anti-PD-1, and/or anti-HSP90 molecules used alone or in combination with each other decreased the secretion of these cytokines, the effect being most pronounced when irradiations at both total doses were combined with concurrent application of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 molecules.

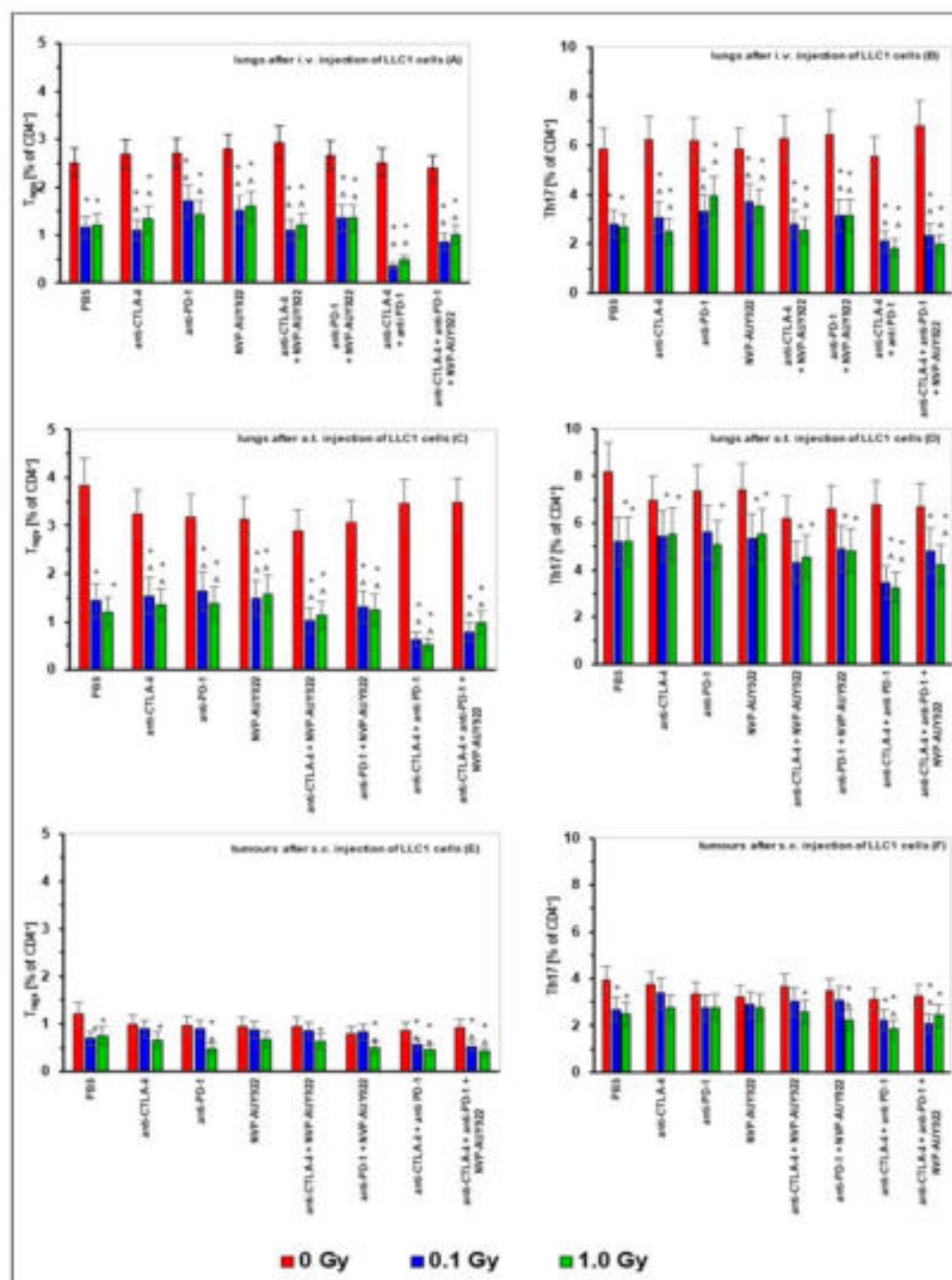
In turn, the levels of the pro-inflammatory TNF- $\alpha$  (Table S3) and IFN- $\gamma$  (Table S4) in the serum collected from mice i.v., o.t., or s.c. injected with LLC1 cells were significantly elevated by WBI at both total doses of X-rays, whereas sole application of any of the inhibitory molecules used either alone or in combination with each other did not affect the levels of these cytokines. However, WBI combined with application of any of the anti-CTLA-4, anti-PD-1, and/or anti-HSP90 molecules used alone or in combination with each other, in the majority of cases, led to the increased production of these cytokines; the effect being most pronounced when irradiations at both total doses were combined with concurrent application of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 molecules.

No differences between the examined groups were detected in the serum levels of the pro-inflammatory IL-6 (Table S5) in mice i.v., o.t., or s.c. injected with LLC1 cells, exposed to WBI, and treated with anti-CTLA-4, anti-PD-1, and/or anti-HSP90 molecules used either alone or in combination with each other.

In this set of experiments, the serum levels of IL-2, IL-4, and IL-17A were assessed below the detection limit of the method in all the examined groups.



**Figure 5.** The percentages of natural killer (NK) cells (panels A,C,E) and cytotoxic T lymphocytes (CTLs) (panels B,D,F) in the lungs after i.v. (panels A,B) or o.t. (panels C,D) injection with LLC1 cells or in tumors after s.c. (panels E,F) injection of LLC1 cells to C57BL/6 mice treated with blockers of the immune checkpoints and/or HSP90 combined with WBI at total doses of 0.1 and 1.0 Gy. The bars indicate mean percentages of NK cells and CTLs calculated for six (i.v. and o.t. injection of tumor cells) or three (s.c. injection of tumor cells) mice per group are presented. \* indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with PBS; † indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with the same inhibitory molecule or a combination of these molecules.



**Figure 6.** The percentages of regulatory T lymphocytes (Tregs) (panels A,C,E) and helper T lymphocytes (Th17 cells) (panels B,D,F) in the lungs after i.v. (panels A,B) or o.t. (panels C,D) injection with LLC1 cells or in tumors after s.c. (panels E,F) injection of LLC1 cells to C57BL/6 mice treated with blockers of the immune checkpoints and/or HSP90 combined with WBI at total doses of 0.1 and 1.0 Gy. The bars formed from mean values of the Tregs and Th17 cells measured in 6 (i.v. and o.t. injection of tumor cells) or 3 (s.c. injection of tumor cells) mice per group are presented. \* indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with PBS; \*\* indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with the same molecule or combination of the molecules.

### 3. Discussion

The present investigation was undertaken in order to assess for the first time the presumable anti-neoplastic effects of the combination of the low-dose whole-body irradiation (WBI) with X-rays combined with the blockade of the function of one or two immune checkpoints and/or a heat shock protein. Our studies were performed using a reliable preclinical model of the human non-small cell lung cancer [46]. In this model, Lewis lung cancer (LLC1) cells derived from an epidermoid carcinoma that had spontaneously developed in the lung of a C57BL mouse were injected through three different routes into syngeneic C57BL/c mice. Between seven and eleven days later, i.e., when the subcutaneously growing tumors were palpable, the mice were exposed to WBI and injected with the inhibitors of the ICs or HSP90. Progression of the tumors developing in the lungs and other internal organs or under the skin of the animals as well the clonogenic potential of these cells in vitro were estimated. Additionally, various immune cells infiltrating the tumors as well as serum levels of the selected pro- and anti-inflammatory cytokines were quantified.

Our first important observation was that five subsequent WBIs of the relatively radioresistant C57BL/6 mice [47,48] at daily doses of 0.02 and 0.2 Gy of X-rays (i.e., at 0.1 and 1.0 Gy total doses) significantly suppressed the in vivo growth of syngeneic LLC1 cells and, the effect being detectable in mice whose tumors were induced either by i.v., o.t., or s.c. injection of the LLC1 cells. Likewise, the clonogenic capacity in vitro of the tumor cells obtained from the lungs of mice injected with LLC1 cells was markedly inhibited by the WBIs. Notably, the reduced tumorigenesis in vivo was more pronounced after irradiations at the lower compared to the higher total dose of X-rays, the effect being paralleled by the lower clonogenic potential in vitro of LLC1 cells obtained from the lungs of mice irradiated at 0.02 Gy per day compared to the potential of the cells recovered from mice exposed at 0.2 Gy per day (Figures 1–3, Tables 1 and 2). Apparently, some in vivo factors were induced by the lower-dose irradiations, which more effectively than the higher-dose exposures, suppressed the potential of the tumor cells to grow in vitro and in vivo. This notion is supported by multiple observations that exposures to low-LET radiation at  $\leq 0.1$  Gy per fraction more potently suppresses cancer growth in experimental animals and human patients than do irradiations at higher daily doses (reviewed in [8,9]). Generally, these results corroborate the findings from our earlier experiments conducted in both C57BL/6 and the more radiosensitive BALB/c mice exposed to both single and multiple WBIs with X-rays at 0.1 and 0.2 Gy and assayed for the development of the induced neoplastic colonies in the lungs [49–52]. In fact, the present results expand our previous observations in that the anti-tumor effects were expressed not only after i.v., but also after o.t. and s.c. injection of LLC1 cells. In the previous investigations, the mice were irradiated before inoculation of the syngeneic tumor cells and, as indicated by the up-regulated activities of NK lymphocytes and cytotoxic macrophages obtained from the spleen and peritoneal cavities, respectively, of the mice, it was the systemic stimulation of innate immunity that was associated with the anti-neoplastic effect of the WBIs. In contrast, in the present study, C57BL/6 mice were exposed to X-rays several days after injection of the tumor cells and still the anti-neoplastic efficacy of WBIs could be clearly demonstrated in mice in which the tumors were induced by three different routes of implantation of LLC1 cells. This effect was accompanied by the significant down- and up-regulation of the numbers of the TAMs and TILs, respectively, in both the pulmonary and subcutaneous tumors. Notably, after WBIs, the relative numbers of Tregs and Th17 cells as well as the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio among the recovered TILs were down-regulated, whereas the numbers of the CTLs and NK lymphocytes were elevated. Furthermore, after WBIs at both total doses, decreased levels of IL-10 and TGF- $\beta$  and elevated levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were detected in the sera of the tested mice. These results suggest that WBIs employed in the present study stimulated recruitment to the growing tumors of cytotoxic lymphocytes while down-regulating the influx of cells that might promote inflammation and tumor growth. At the same time, the irradiations prompted the secretion to the circulation of two pro-inflammatory cytokines and suppressed the secretion of two anti-inflammatory cytokines. The potential impact

of the modified levels of the systemic cytokines on the growth of the i.v., o.t., and/or s.c. injected LLC1 cells needs to be clarified in future studies.

The second important finding of the present investigation is that application of any one or any combination of the tested anti-immune checkpoint and anti-HSP90 molecules unassisted by a parallel WBI did not generally impact the growth of LLC1 cells in the lungs of the i.v. or o.t. injected mice. Noticeably, injections of a single inhibitory agent, especially the anti-HSP molecule NVP-AU922, were the least effective. However, concurrent application of the anti-CTLA-4 and anti-PD-1 molecules appeared to markedly inhibit the formation of the in vitro colonies by the tumor cells obtained from the lungs of the i.v.- or o.t.-injected mice (Tables 1 and 2). Moreover, such a combined blockade of the two immune checkpoints significantly inhibited the development of subcutaneously growing tumors. (Figure 3G). Although the growth of these tumors was also thwarted by a sole application of the anti-CTLA-4 molecule (Figure 3B), the effect was not accompanied by suppression of the above described clonogenic capacity of LLC1 cells in vitro. The finding of the more pronounced anti-neoplastic efficiency of the combined inactivation of two complementary checkpoints is in accord with the observations that such a simultaneous blockade shows synergistic effects [53,54]. Noticeably however, in contrast to the effects of WBIs used as the only treatment, sole application of any one or any combination of the tested inhibitory molecules did not seem to produce significant changes in the numbers of the tumor infiltrating immune cells or the serum levels of the tested cytokines. The general lack of the tumor-inhibitory activity of the blockers of the CTLA-4, PD-1, and HSP90 molecules in mice i.v. and o.t. injected with LLC1 cells is surprising in view of the results of studies indicating that single and especially combined applications of such blockers were able to successfully enhance the response rates and survival of patients with various malignancies including lung cancer (reviewed in [13,15–17,33,41]). One possible explanation of this discrepancy is that the CTLA-4- and/or PD-1-related signaling pathways are not activated in tumors developing in mice implanted by certain routes with the LLC1 or, as was demonstrated for HSP90, blockade of the function of such molecules does not affect the growth of such cells in mice [55]. This possibility might also explain the general observation from the clinical trials that therapy targeted at immune checkpoints has been effective only in a fraction of the lung cancer patients and that the use of NVP-AUY922 in the early stage of clinical trial for NSCLC patients showed disappointing results (reviewed in [14,18,33,41,56]). Moreover, many such trials are associated with the occurrence of adverse effects instigated by administration of the inhibitory molecules (reviewed in [16,57,58]). Arguably, these effects may interfere with the anti-tumor activity of the blocking agents. In our present investigation, however, no discernible disturbances in the behavior and general condition of the tumor-bearing mice treated with all the tested inhibitors were observed during the daily inspections of the animals performed until the 7th day post completion of the treatments.

The third noticeable information begotten by the results of the present study is that concurrent application of WBI and any of the inhibitors did not seem to markedly affect the anti-neoplastic effect of the former treatment. Once again, the only exception to this general observation was the combined blockade of the functions of CTLA-4 and PD-1 immune checkpoints which, when added to the WBIs, exerted a notably more pronounced effect both in vivo (growth of the tumors in the lungs and under the skin) and in vitro (clonogenic potential of the tumor cells). Accordingly, although in terms of the intratumoral composition of immune cells and the serum levels of the tested cytokines, the addition of most of the inhibitors to WBI did not seem to generate any significant departures from the changes seen after the sole use of WBI, simultaneous blockade of the CTLA-4 and PD-1 immune checkpoints combined with WBI at both total doses of X-rays seemed to step up, if generally not significantly, the effects of the sole use of the latter treatments.

The lack of the significant synergistic or additive effect of the inhibitors added to the WBI clearly contrasts with the existing experimental and clinical evidence, indicating that the efficiency of cancer immunotherapy based on the blockade of CTLA-4 and/or PD-1 is enhanced when the blockade is combined with standard radiation therapy (reviewed

in [19,29]). For instance, in a recent preclinical study using a mouse model of prostate cancer which responded poorly to immune checkpoint inhibition, the therapy became effective when application of the anti-PD-1 or anti-PD-L1 antibodies was coupled with irradiation of the tumor graft at high doses of X-rays [59]. Likewise, in C57BL/6 mice bearing o.t. (intracranially) implanted GL261 glioma cells, improved survival was demonstrated when the anti-PD-1 therapy was combined with local irradiation of the tumor, whereas either treatment alone was less effective [60]. Additionally, earlier studies utilizing murine models of breast cancer demonstrated that local radiotherapy effectively inhibited growth of the induced primary tumors, especially when the irradiations were associated with blockade of the function of CTLA-4. Importantly, in these studies, no anti-tumor effect was detected when the anti-CTLA-4 antibody was used as a sole treatment [61,62]. In the present investigation, in which we used a different model of the transplantable cancer and the ultra-low dose WBIs rather than high-dose localized radiation, addition of the blockers of CTLA-4, PD-1, and/or HSP90 hardly improved the well-pronounced anti-neoplastic effect of WBI. It is likely, therefore, that the low level irradiations did not evoke the activity of the ICs and/or HSP(s). Indeed, there are reports indicating that irradiation at 75 and 150 mGy of X-rays down-regulates the expression of CTLA-4 on splenocytes or Treg cells, respectively, obtained from the irradiated mice [63,64]. In our present study, we did not estimate the expression of the immune checkpoint or HSP molecules but we showed that multiple WBIs at 0.02 or 0.2 Gy of X-rays resulted in the reduction of the numbers of Treg and pro-inflammatory Th17 lymphocytes in the neoplastic tissues induced by implantation of LLC1 cells. This observation may contrast with the results of the standard high-dose radiotherapy which induces immunogenic death of cancer cells and inflammation and up-regulates Treg cells and/or the heat shock response (reviewed in [19,56,65]).

One limitation of our present study is the use of a single type of an 'artificial' neoplasm and a single strain of the mice used as recipients of the in vitro cultured Lewis lung cancer cells. Moreover, although the employed simple schedule of the administration of WBI relative to inhibition of the tested molecules produced reproducible and comparable results in mice transplanted with the tumor cells by three different routes, other time windows, dosing, frequency, and routes of applications, etc. should be tested in the context of the WBI coupled with immune checkpoint and/or heat shock protein blockade. These and other possible limitations of the study are amenable to be eliminated and should be addressed in future investigations.

In summary, the present results confirm and expand our previously reported observations of the anti-neoplastic activity of multiple whole-body irradiations of mice at low doses of X-rays by demonstrating that such WBIs at five daily doses of 0.02 and 0.2 Gy suppress the growth of Lewis lung cancer cells in vivo and in vitro and that the effects are accompanied by the relevant changes in the numbers of both pro- and anti-neoplastic immune cells in the developed tumors as well as in the levels of the selected pro- and anti-inflammatory cytokines in the serum of the irradiated mice. For the first time, however, the results indicate that a combination of WBIs with blockade of the immune checkpoints such as CTLA-4 and PD-1, especially when the two had been inactivated together, also potently inhibited the growth of lung cancer cells in vivo and their clonogenic potential in vitro. Such a combined treatment seemed to promote the above described cellular and cytokine alterations induced by the sole use of WBIs. Generally, inactivation of the function of heat shock protein HSP90 applied concurrently with WBI appeared to be less effective in these regards. Notably, the anti-neoplastic effects in vivo of WBIs used solely and in combination with the blocking agents were comparably expressed in mice with tumors induced by i.v., o.t., or s.c. injection of the LLC1 cells. Alas, the observed shifts in the composition of the immune cells and secreted cytokines addition of any or all of the tested blockers to WBI did not seem to markedly augment the already well pronounced anti-neoplastic effect of the latter. Moreover, application of most of the inhibitors without the concomitant WBI appeared to be almost totally ineffective in inhibiting the development of the transplanted tumors in vivo; only simultaneous inactivation of CTLA-4 and PD-1 suppressed the poten-

tial of LLC1 cells to produce neoplastic colonies in vitro and to grow into subcutaneous tumors in vivo. Obviously, further studies are needed to unravel the mechanisms of the apparent resistance of the experimental lung carcinoma to the potentially curative effects of the blockade of the function of immune checkpoints and/or HSP90 applied separately or together with WBI. Understanding of such mechanisms may be key to the design of effective strategies of treatment of lung and other cancers based on inactivation of such molecular targets in combination with low-dose radiotherapy.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. List of Labels Used in Figures and Tables

The following labels are used in all the figures and tables presented:

|                                        |                                                                                                          |
|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • 0 Gy                                 | • sham-exposed mice;                                                                                     |
| • 0.1 Gy                               | • mice exposed to WBI at 0.1 Gy total dose X-rays;                                                       |
| • 1.0 Gy                               | • mice exposed to WBI at 1.0 Gy total dose X-rays;                                                       |
| • PBS                                  | • mice i.p. injected thrice a week with 5% glucose solution in PBS;                                      |
| • anti-CTLA-4                          | • mice i.p. injected thrice a week with molecules blocking the CTLA-4 receptor;                          |
| • anti-PD-1                            | • mice i.p. injected thrice a week with molecules blocking the PD-1 receptor;                            |
| • NVP-AUY922                           | • mice i.p. injected thrice a week with molecules blocking the HSP90 protein;                            |
| • anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | • mice i.p. injected thrice a week with molecules blocking the CTLA-4 receptor and HSP90 protein;        |
| • anti-PD-1 + NVP-AUY922               | • mice i.p. injected thrice a week with molecules blocking PD-1 and HSP90 protein;                       |
| • anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | • mice i.p. injected thrice a week with molecules blocking CTLA-4 and PD-1 receptors;                    |
| • anti CTLA-4 + anti PD-1 + NVP-AUY922 | • mice i.p. injected thrice a week with molecules blocking CTLA-4 and PD-1 receptors, and HSP90 protein. |
| • TILs                                 | • tumor infiltrating CD3+CD45+ lymphocytes                                                               |
| • TAMs                                 | • tumor associated CD11b+Ly6C+Ly6G+ macrophages                                                          |
| • NK cells                             | • CD49b+CD335+ NK lymphocytes                                                                            |
| • CTLs                                 | • CD8+CD178+ cytotoxic T lymphocytes                                                                     |
| • Tregs                                | • CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T lymphocytes                                                               |
| • Th17 cells                           | • CD4+IL17A+ helper T lymphocytes labelled as                                                            |
| • CD4+                                 | • lymphocytes labelled with anti-CD4 monoclonal antibody                                                 |
| • CD8+                                 | • lymphocytes labelled with anti-CD8 monoclonal antibody                                                 |

## 4.2. Animals

Mice C57BL/6 were obtained from the Mossakowski Medical Research Institute of the Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland, and at 6–8 weeks of age were used for the experiments. The animals were housed under specific pathogen-free conditions in a Modular Animal Caging System®-MACS Mobile Units (Alternative Design, Siloam Springs, AR, USA), and were provided with a natural daily cycle (12-h photoperiod) and the ad libitum access to food and water. The living conditions and health of the animals were monitored daily by a veterinarian. The experiments were carried out so as to inflict the least pain on the animals. For all the procedures, the mice were anesthetized and/or sacrificed with isoflurane in the euthanasia induction box (WITKO, Lodz, Poland). All experimental procedures described below are outlined in Figure 1. The study was divided into three parts. In each part of the study, mice were randomly assigned to 24 experimental groups (see Figure 7) which were exposed to different doses of X-rays and administered, in different configurations, blockers of the immune checkpoints CTLA-4 and PD-1 and/or of HSP-90. Random numbers were generated using the standard = RAND() function. The total number of mice used in the present study equaled to 912. The investigations were carried out by permission of the 2nd Local Ethical Committee for Experimentation on Animals at the Warsaw University of Life Sciences in Warsaw, Poland (permission No. WAW2/065/2018 of 27 April 2018). All the experiments were performed in accordance with all the relevant guidelines and regulations. We also confirm that we complied with the ARRIVE guidelines.

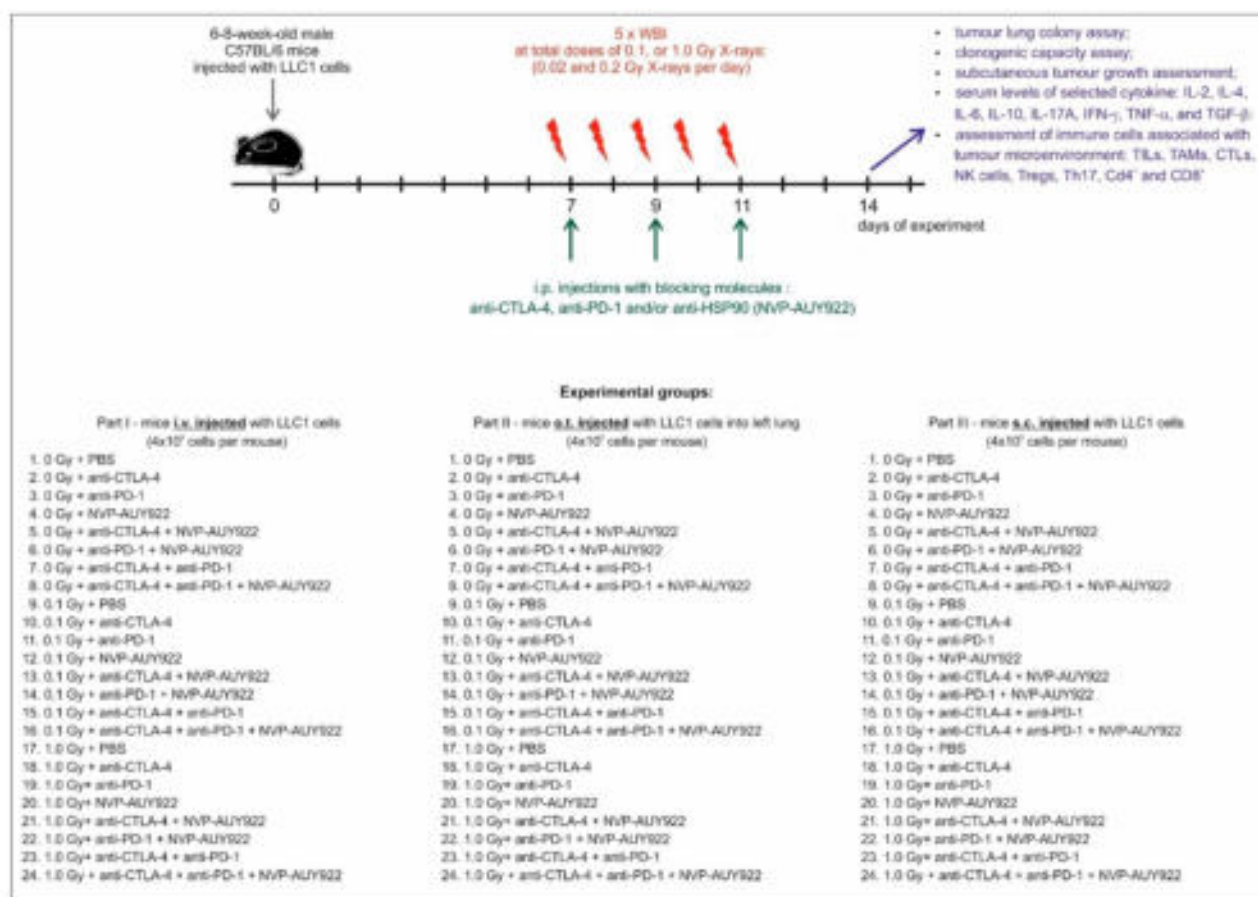


Figure 7. Experimental protocols.

### 4.3. Tumor Cells

Syngeneic Lewis Lung Carcinoma (LLC1) cells (ATCC; The Global Bioresource Center, LGC Standards, Kielpin Lomianki, Poland)—the only reproducible experimental model for the human non-small-cell lung cancer to date [46,66]—were used for the induction of tumor nodules in mice. The cells were maintained as a mono-layer culture in a culture medium composed of the DMEM W/GLUTAMAX-I, PYR, 4,5 GLU medium (GIBCO, Life Technologies, Warsaw, Poland), 10% Heat-inactivated FBS (PAN BIOTECH, IMMUNIQ, Zory, Poland), 100 U/mL penicillin, and 100 U/mL streptomycin (Corning, Sigma-Aldrich, Poznan, Poland) in standard conditions (SC): humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. The LLC1 cells were passaged every two days using 0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO). The cell line was tested free of mycoplasma.

### 4.4. Injection of LLC1 Cells

On day 0 of the experiment, after obtaining a single cell suspension using 0.25% Trypsin-EDTA, the LLC1 cells were counted in a mammalian cell counter NucleoCounter NC-100 (ChemoMetec, Allerød, Denmark) and brought to the required concentration. Then, three different ways of the injection of LLC1 cells into mice were used (see Figure 7):

1. intravenous (i.v.)—the animals were placed in a mouse holder and  $4 \times 10^5$  LLC1 cells per mouse suspended in 200 µL PBS (ADLAB, Lublin, Poland) were injected into a tail vein using a 1 mL insulin syringe (Becton Dickinson, Warsaw, Poland) with a hypodermic needle. The mice were then divided into 24 groups at 16 mice per group (total number of mice);
2. orthotopic (o.t.)—mice were anesthetized and put on their right flank. One-mL tuberculin syringes (Becton Dickinson) with hypodermic needles were used to inject  $4 \times 10^5$  cells per mouse in 100 µL PBS containing 1.35 mg/mL of Matrigel (VWR, Gdansk, Poland). The cells were injected percutaneously into the left lung at the lateral dorsal axillary line 1.5 cm above the lower rib line just below the inferior border of the scapula. The needle was quickly advanced 5–7 mm into the thorax and quickly removed after the injection of the cell suspension and the mouse was put back on the left flank. The treated animals were observed for 45–60 min until fully recovered. Finally, the mice were divided into 24 groups at 16 mice per group (total number of mice 384);
3. subcutaneous (s.c.)— $4 \times 10^5$  LLC1 cells per mouse in 200 µL PBS were injected directly into the lower back using the 1-mL tuberculin syringes (Becton Dickinson) with 30-gauge hypodermic needles. Mice were then divided into 24 groups at 6 mice per group (total number of mice 144).

### 4.5. Irradiation

Seven days after the injection of the LLC1 cell, the animals were exposed to fractionated WBI with X-rays at the total dose of 0.1 or 1.0 Gy given in five daily fractions (0.02 or 0.2 Gy per fraction per day)—see Figure 4. All the irradiations were performed at the Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Warsaw, Poland, using the Xylon International Smart 200 X-ray generator (Xylon, San Jose, CA, USA) at 200 kV, 2 mA, 0.09 Gy/min dose rate. During the irradiations, the animals were placed in a ventilated container and positioned along the axis of the radiation beam. Control mice were sham-exposed (generator at the off-mode) in identical conditions. The absorbed doses were verified using thermoluminescent dosimeters as described previously [67].

### 4.6. Application of the Blocking Molecules

Molecules against the CTLA-4 (anti-mouse CTLA-4 antibody-clone 9H10; Hoelzel, Cologne, Germany) and PD-1 (anti-mouse PD-1 antibody-clone RMP1-14; Hoelzel) immune checkpoint receptors and/or the HSP90 protein (NVP-AUY922; MedChemTronica, Sollentuna, Sweden) were injected intraperitoneally (i.p.) thrice a week (on days 7, 9, and 11 after inoculation of LLC1 cells) during the period of time when the irradiations were

performed (see Figure 4). The blocking molecules were dissolved in the 5% glucose solution (Sigma-Aldrich) in PBS and administered at the following concentrations: 10 mg/kg body mass of anti-mouse CTLA-4 or anti-mouse PD-1 antibodies and 15 mg/kg body mass of NVP-AUY922. The molecules were administered in different configurations (see Figure 4).

#### 4.7. Lung Tumor Colony Assay

Fourteen days after the i.v., o.t., or s.c. inoculation of LLC cells, mice were sacrificed, their lungs were filled with the solution of India ink and formalin, and the number of visible macroscopic tumor colonies per lung were counted using a magnifying glass [67]. Each experimental group that was i.v. or o.t. injected with tumor cells consisted of ten mice, whereas each experimental group that was s.c. injected with tumor cells consisted of three mice.

In addition, potential metastases were macroscopically assessed using a magnifying glass in the spleens and livers which were collected from mice of the above groups.

#### 4.8. Tissue Collection

Fourteen days after the i.v., o.t., or s.c. inoculation of LLC1 cells, mice were sacrificed, their lungs, spleens, livers, and subcutaneously growing tumors were removed, homogenized, and suspended in culture medium. Cell suspensions of the lung, spleen, and liver homogenates were divided in two parts. One part was used for clonogenic capacity assays, whereas the second part as well as cell suspensions of the subcutaneously growing tumors was used for flow cytometric analysis of the numbers of cells of the innate and adaptive immunity associated with cancer progression. The cells assayed for the clonogenic capacity assays were utilized immediately after collection, whereas those destined for analysis by flow cytometry were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Serum samples were prepared from peripheral blood obtained by heart punctures of the anaesthetized mice 14 days after the i.v., o.t., or s.c. inoculation of LLC1 cells. The obtained serum samples were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Each experimental group of mice that was i.v. or o.t. injected with tumor cells consisted of six animals, whereas each experimental group of mice that was s.c. injected with tumor cells consisted of three animals.

#### 4.9. Clonogenic Capacity

The cell suspensions obtained from the lungs, spleens, and livers of mice i.v., o.t., or s.c. inoculated with LLC1 cells were seeded on the 6-well culture plates (4 mL per well for 2 wells). The plates were inspected daily, the CM being replaced every three days. Fourteen to 21 days later, the medium was removed and the wells were rinsed with PBS. The developed tumor cell colonies (clones) were fixed and stained with a mixture of 0.5% crystal violet (Sigma-Aldrich) in 50/50 methanol (Avantor Performance Materials Poland, Gliwice, Poland)/water for 30 min. On the following day, the clones were counted and expressed as total number of neoplastic colonies per organ according to the formulas:

$$\text{total no. of clones per lung} = (\text{no. of clones in well 1} + \text{no. of clones in well 2}) \times 2 \quad (1)$$

$$\text{total no. of clones per spleen} = (\text{no. of clones in well 1} + \text{no. of clones in well 2}) \times 2 \quad (2)$$

$$\text{total no. of clones per liver} = (\text{no. of clones in well 1} + \text{no. of clones in well 2}) \times 3 \quad (3)$$

After estimation of the total number of the clones per organ, the tumor clonogenic capacity (CC) was calculated using the following equation:

$$\text{CC} = [(\text{mean no. of clones per organ obtained from mice of the treated group}) / (\text{mean no. of clones per organ obtained from mice of the untreated group})] \times 100\% \quad (4)$$

Each experimental group of mice which were i.v. or o.t. injected with tumor cells consisted of six animals, whereas each experimental group of mice which were s.c. injected with tumor cells consisted of three animals.

#### 4.10. Tumor Volume Assessment

Mice s.c. inoculated with LLC1 cells were identified by the ear tags (VIVARI, Warsaw, Poland). The growing tumors were measured manually at regular intervals using the electronic calipers and the tumor volumes were estimated using the formula:

$$\text{tumor volume} = 4\pi/3 \times w \times h \times l \quad (5)$$

where width (w), height (h), and length (l) are the three largest diameters. Each experimental group consisted of six mice.

#### 4.11. Flow Cytometric Analysis

To analyze the cells of the innate and adaptive immunity associated with cancer progression such as TAMs, TILs, Tregs, Th17 lymphocytes, CTLs, and NK cells, defrosted cells obtained from the lungs and subcutaneously growing tumors were assayed in the FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Warsaw, Poland) using the following monoclonal antibodies: FITC Rat Anti-Mouse CD45, APC Rat Anti-CD11b, PE Rat Anti-Mouse Ly-6G and Ly-6C, PerCP-Cy<sup>TM</sup>5.5 Hamster Anti-Mouse CD3e, PerCP-Cy<sup>TM</sup>5.5 Rat Anti-Mouse CD8a, PE Hamster Anti-Mouse CD178, FITC Rat Anti-Mouse CD49b, Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 Rat Anti-Mouse CD335 (Nkp46), and Mouse Th17/Treg Phenotyping Kit (all from BD Pharmingen), BB515 Rat Anti-Mouse CD25 (BD Horizon).

After defrosting, the obtained serum samples, after defrosting, were assayed for the levels of: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ , using the Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD).

All determinations were performed in triplicates. The obtained data were analyzed with the use of the CellQuest software (Becton-Dickinson) and FCAP Array software (Becton-Dickinson).

#### 4.12. ELISA Tests

After defrosting, the obtained serum samples, after defrosting, were assayed for the levels of TGF- $\beta$  using the Mouse TGF Beta 1 ELISA Kit PicoKine<sup>TM</sup> (Boster Bio, Pleasanton, CA, USA) with use of ELISA method employing the Epoch<sup>TM</sup> microplate spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, US) and the ELx50<sup>TM</sup> microplate strip washer (BioTek Instruments). All determinations were performed in triplicates. The obtained data were analyzed with the use of a reader software Gen5 2.0 (BioTek Instruments).

#### 4.13. Statistical Analysis

Inter-group differences in the number of tumor colonies, tumor clonogenic capacities, tumor volumes, percentages of immune cells, and serum levels of cytokines were analyzed using the Mann–Whitney U test for non-parametric trials with  $p < 0.05$  regarded as significant.

### 5. Conclusions

In the present study, we aimed at determining whether blockade of the activity of one or two immune checkpoints and/or HSP90 can modify the previously reported by us and other authors of the anti-cancer effect of whole-body irradiations at low doses of X-rays (WBIs). The obtained results demonstrate for the first time that such targeted blockades used in conjunction with WBI, especially when the blockers of the CTLA-4 and PD-1 immune checkpoints were inactivated together, also potentially inhibited the growth of the Lewis lung cancer (LLC1) cells in vivo and their clonogenic potential in vitro. Accordingly, such a combined treatment led to the relevant alterations in the numbers of pro- and anti-neoplastic immune cells infiltrating the induced tumors as well as in the production of anti- and pro-inflammatory cytokines likely involved in the tumor progression. Notably, the observed anti-neoplastic effects of the combined treatments were comparably expressed in mice i.v., o.t., or s.c. injected with LLC1 cells. However, application of any one or any combination of the tested blockers without the parallel

WBI was hardly effective, despite the accompanying shifts in the composition of immune cells and secreted cytokines. Clearly, further studies are needed to elucidate the impact of the tested therapeutic modalities on the neoplastic cells and other immunologically-relevant elements of the tumor microenvironment. The results of such studies, along with determination of the optimal dosage and schedule of the delivery of the tested modalities will be crucial for designing an effective anti-cancer strategy based on the combination of targeted treatments with low-dose radiotherapy.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22126309/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.M.N., A.C. and A.W.; Data curation, E.M.N. and A.C.; Funding acquisition, A.W.; Investigation, E.M.N., A.C., M.P. and L.C.; Methodology, E.M.N. and A.C.; Project administration, E.M.N., A.C. and A.W.; Software, E.M.N. and A.C.; Supervision, A.W.; Validation, E.M.N., A.C. and A.W.; Visualization, E.M.N. and A.C.; Writing—original draft, E.M.N. and A.C.; Writing—review & editing, P.S. and A.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Polish Ministry of National Defence grant number 510/2017/DA. The APC was funded by the Military Institute of Hygiene and Epidemiology.

**Institutional Review Board Statement:** The investigations were carried out by permission of the 2nd Local Ethical Committee for Experimentation on Animals at the Warsaw University of Life Sciences in Warsaw, Poland (permission No. WAW2/065/2018 of 27 April 2018). All the experiments were performed in accordance with all the relevant guidelines and regulations. We also confirm that we complied with the ARRIVE guidelines.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the authors.

**Acknowledgments:** Special acknowledgments to Marek K. Janiak, who has made a significant contribution to this publication through his active participation in the conceptual work on the research design, supervision on the conducted research and valuable guidance, advice, and numerous important suggestions during preparation of the manuscript. We also acknowledge the participation of Malgorzata Jedraszczak, Agata Janeczko and Agata Kwiatkowska in carrying out the experiments. The contributions of Mateusz Pociąg and Lukasz Cheda were realized within Project No. POWR.03.02.00-00-I009/17-00 (Operational Project Knowledge Education Development 2014-2020 co-financed by European Social Fund).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 1–41. [\[CrossRef\]](#)
2. Simeone, J.C.; Nordstrom, B.L.; Patel, K.; Klein, A.B. Treatment patterns and overall survival in metastatic non-small-cell lung cancer in a real-world, US setting. *Future Oncol.* **2019**, *15*, 3491–3502. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Williams, J.R.; Thwaites, D.I. (Eds.) *Radiotherapy Physics in Practice*, 2nd ed.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2000; ISBN 0-19-262878-X.
4. Hatton, M.Q.; Martin, J.E. Continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy (CHART) and non-conventionally fractionated radiotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer: A review and consideration of future directions. *Clin. Oncol.* **2010**, *22*, 356–364. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Pijls-Johannesma, M.C.; De Ruyscher, D.; Lambin, P.; Rutten, I.; Vansteenkiste, J.F. Early versus late chest radiotherapy for limited stage small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2005**, *1*, CD004700. [\[CrossRef\]](#)
6. Islami, F.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global trends of lung cancer mortality and smoking prevalence. *Transl. Lung Cancer Res.* **2015**, *4*, 327–338. [\[CrossRef\]](#)
7. UNSCEAR 1986 Report. *Genetic and Somatic Effects of Ionizing Radiation. Report to the General Assembly, with Annexes*; E.86.IX.; United Nations Publ.: New York, NY, USA, 1986; p. 170.

8. Janiak, M.K.; Wincenciak, M.; Cheda, A.; Nowosielska, E.M.; Calabrese, E.J. Cancer immunotherapy: How low-level ionizing radiation can play a key role. *Cancer Immunol. Immunother.* **2017**, *66*, 819–832. [\[CrossRef\]](#)
9. Janiak, M.K.; Pocięgiel, M.; Welsh, J.S. Time to rejuvenate ultra-low dose whole-body radiotherapy of cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2021**, *160*, 103286. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Yang, G.; Li, W.; Jiang, H.; Liang, X.; Zhao, Y.; Yu, D.; Zhou, L.; Wang, G.; Tian, H.; Han, F.; et al. Low-dose radiation may be a novel approach to enhance the effectiveness of cancer therapeutics. *Int. J. Cancer* **2016**, *39*, 2157–2168. [\[CrossRef\]](#)
11. Cui, J.; Yang, G.; Pan, Z.; Zhao, Y.; Liang, X.; Li, W.; Cai, L. Hormetic Response to Low-Dose Radiation: Focus on the Immune System and Its Clinical Implications. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 280. [\[CrossRef\]](#)
12. Villaruz, L.C.; Kalyan, A.; Zarour, H.; Socinski, M.A. Immunotherapy in lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* **2014**, *3*, 2–14. [\[CrossRef\]](#)
13. Chen, Y.M. Immune checkpoint inhibitors for nonsmall cell lung cancer treatment. *J. Chin. Med. Assoc.* **2017**, *80*, 7–14. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Somasundaram, A.; Burns, T.F. The next generation of immunotherapy: Keeping lung cancer in check. *J. Hematol. Oncol.* **2017**, *10*, 87. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Chae, Y.K.; Arya, A.; Iams, W.; Cruz, M.R.; Chandra, S.; Choi, J.; Giles, F. Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and nonsmall cell lung cancer (NSCLC). *J. Immunother. Cancer* **2018**, *6*, 39. [\[CrossRef\]](#)
16. Rotte, A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 255. [\[CrossRef\]](#)
17. Puri, S.; Shafique, M. Combination checkpoint inhibitors for treatment of non-small-cell lung cancer: An update on dual anti-CTLA-4 and anti-PD-1/PD-L1 therapies. *Drugs Context* **2020**, *9*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Yoneda, K.; Imanishi, N.; Ichiki, Y.; Tanaka, F. Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs) in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *J. UOEH* **2018**, *40*, 173–189. [\[CrossRef\]](#)
19. Vansteenkiste, J.; Wauters, E.; Reymen, B.; Ackermann, C.J.; Peters, S.; De Ruyscher, D. Current status of immune checkpoint inhibition in early-stage NSCLC. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 1244–1253. [\[CrossRef\]](#)
20. Baksh, K.; Weber, J. Immune checkpoint protein inhibition for cancer: Preclinical justification for CTLA-4 and PD-1 blockade and new combinations. *Semin. Oncol.* **2015**, *42*, 363–377. [\[CrossRef\]](#)
21. Twyman-Saint Victor, C.; Rech, A.; Maity, A.; Rengan, R.; Pauken, K.E.; Stelekati, E.; Benci, J.L.; Xu, B.; Dada, H.; Odorizzi, P.M.; et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* **2015**, *520*, 373–377. [\[CrossRef\]](#)
22. Allard, B.; Allard, D.; Stagg, J. Methods to Evaluate the Antitumor Activity of Immune Checkpoint Inhibitors in Preclinical Studies. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1458*, 159–177. [\[CrossRef\]](#)
23. Herzberg, B.; Campo, M.J.; Gainor, J.F. Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist* **2017**, *22*, 81–88. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Khalil, D.N.; Smith, E.L.; Brentjens, R.J.; Wolchok, J.D. The future of cancer treatment: Immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2016**, *13*, 273–290. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Wada, S.; Harris, T.J.; Tryggestad, E.; Yoshimura, K.; Zeng, J.; Yen, H.-R.; Getnet, D.; Grosso, J.E.; Bruno, T.C.; De Marzo, A.M.; et al. Combined Treatment Effects of Radiation and Immunotherapy: Studies in an Autochthonous Prostate Cancer Model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2013**, *87*, 769–776. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Sharma, P.; Allison, J.P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **2015**, *348*, 56–61. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Melero, I.; Berman, D.M.; Aznar, M.A.; Korman, A.J.; Pérez Gracia, L.J.; Haanen, J. Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 457–472. [\[CrossRef\]](#)
28. Farkona, S.; Diamandis, E.P.; Blasutig, I.M. Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer? *BMC Med.* **2016**, *14*, 73. [\[CrossRef\]](#)
29. Wang, Y.; Deng, W.; Li, N.; Neri, S.; Sharma, A.; Jiang, W.; Lin, S.H. Combining Immunotherapy and Radiotherapy for Cancer Treatment: Current Challenges and Future Directions. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 185. [\[CrossRef\]](#)
30. Darragh, L.B.; Oweida, A.J.; Karam, S.D. Resistance to Combination Radiation-Immunotherapy: A Focus on Contributing Pathways Within the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **2019**, *9*, 3154. [\[CrossRef\]](#)
31. Trepel, J.; Mollapour, M.; Giaccone, G.; Neckers, L. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 537–549. [\[CrossRef\]](#)
32. Miyata, Y.; Nakamoto, H.; Neckers, L. The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 347–365. [\[CrossRef\]](#)
33. Yun, C.W.; Kim, H.J.; Lim, J.H.; Lee, S.H. Heat Shock Proteins: Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy. *Cells* **2020**, *9*, 60. [\[CrossRef\]](#)
34. Schopf, F.H.; Biebl, M.M.; Buchner, J. The HSP90 chaperone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 345–360. [\[CrossRef\]](#)
35. Fucarino, A.; Pitruzzella, A. Role of HSP60/HSP10 in Lung Cancer: Simple Biomarkers or Leading Actors? *J. Oncol.* **2020**, *2020*, 4701868. [\[CrossRef\]](#)
36. Calderwood, S.K.; Gong, J. Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 311–323. [\[CrossRef\]](#)

37. Saini, J.; Sharma, P.K. Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer. *Curr. Drug Targets* **2018**, *19*, 1478–1490. [\[CrossRef\]](#)
38. Eccles, S.A.; Massey, A.; Raynaud, F.I.; Sharp, S.Y.; Box, G.; Valenti, M.; Patterson, L.; de Haven Brandon, A.; Gowan, S.; Boxall, F.; et al. NVP-AUY922: A novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2850–2860. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Okui, T.; Shimo, T.; Hassan, N.M.; Fukazawa, T.; Kurio, N.; Takaoka, M.; Naomoto, Y.; Sasaki, A. Antitumor effect of novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 against oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* **2011**, *31*, 1197–1204. [\[PubMed\]](#)
40. Zagouri, F.; Sergentanis, T.N.; Chrysikos, D.; Papadimitriou, C.A.; Dimopoulos, M.A.; Psaltopoulou, T. Hsp90 inhibitors in breast cancer: A systematic review. *Breast* **2013**, *22*, 569–578. [\[CrossRef\]](#)
41. Rong, B.; Yang, S. Molecular mechanism and targeted therapy of Hsp90 involved in lung cancer: New discoveries and developments (Review). *Int. J. Oncol.* **2018**, *52*, 321–336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Sojka, D.R.; Gogler-Pigłowska, A.; Vydra, N.; Cortez, A.J.; Filipczak, P.T.; Krawczyk, Z.; Scieglinska, D. Functional redundancy of HSPA1, HSPA2 and other HSPA proteins in non-small cell lung carcinoma (NSCLC); an implication for NSCLC treatment. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 14394. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Xu, F.; Wei, Y.; Tang, Z.; Liu, B.; Dong, J. Tumor-associated macrophages in lung cancer: Friend or foe? *Mol. Med. Rep.* **2020**, *22*, 4107–4115. [\[CrossRef\]](#)
44. Marshall, E.A.; Ng, K.W.; Kung, S.H.Y.; Conway, E.M.; Martinez, V.D.; Halvorsen, E.C.; Rowbotham, D.A.; Vucic, E.A.; Plumb, A.W.; Becker-Santos, D.D.; et al. Emerging roles of T helper 17 and regulatory T cells in lung cancer progression and metastasis. *Mol. Cancer* **2016**, *15*, 67. [\[CrossRef\]](#)
45. Bremnes, R.M.; Busund, L.-T.; Kilvaer, T.L.; Andersen, S.; Richardsen, E.; Paulsen, E.E.; Hald, S.; Khanehekenari, M.R.; Cooper, W.A.; Kao, S.C.; et al. The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2016**, *11*, 789–800. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Kellar, A.; Egan, C.; Morris, D. Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 621324. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Storer, J.B.; Mitchell, T.J.; Fry, R.J. Extrapolation of the relative risk of radiogenic neoplasms across mouse strains and to man. *Radiat. Res.* **1988**, *114*, 331–353. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Ponnaiya, B.; Cornforth, M.N.; Ullrich, R.L. Radiation-Induced Chromosomal Instability in BALB/c and C57BL/6 Mice: The Difference Is as Clear as Black and White. *Radiat. Res.* **1997**, *147*, 121–125. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Cheda, A.; Wrembel-Wargocka, J.; Lisiak, E.; Nowosielska, E.M.; Marciniak, M.; Janiak, M.K. Single low doses of X rays inhibit the development of experimental tumour metastases and trigger the activities of NK cells in mice. *Radiat. Res.* **2004**, *161*, 335–340. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Cheda, A.; Nowosielska, E.M.; Wrembel-Wargocka, J.; Janiak, M.K. Production of cytokines by peritoneal macrophages and splenocytes after exposures of mice to low doses of X-rays. *Radiat. Environ. Biophys.* **2008**, *47*, 275–283. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Nowosielska, E.M.; Wrembel-Wargocka, J.; Cheda, A.; Lisiak, E.; Janiak, M.K. Enhanced cytotoxic activity of macrophages and suppressed tumour metastases in mice irradiated with low doses of X-rays. *J. Radiat. Res.* **2006**, *47*, 229–236. [\[CrossRef\]](#)
52. Nowosielska, E.M.; Cheda, A.; Wrembel-Wargocka, J.; Janiak, M.K. Anti-neoplastic and immuno-stimulatory effects of low-dose X-ray fractions in mice. *Int. J. Radiat. Biol.* **2011**, *87*, 202–212. [\[CrossRef\]](#)
53. Li, J.; Ni, L.; Dong, C. Immune checkpoint receptors in cancer: Redundant by design? *Curr. Opin. Immunol.* **2017**, *45*, 37–42. [\[CrossRef\]](#)
54. Zahavi, D.J.; Weiner, L.M. Targeting Multiple Receptors to Increase Checkpoint Blockade Efficacy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 158. [\[CrossRef\]](#)
55. Chatterjee, S.; Huang, E.H.; Christie, I.; Kurland, B.F.; Burns, T.F. Acquired resistance to the Hsp90 inhibitor, ganetespib, in KRAS-mutant NSCLC is mediated via reactivation of the ERK-p90RSK-mTOR signaling network. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 793–804. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Chatterjee, S.; Bhattacharya, S.; Socinski, M.A.; Burns, T.F. HSP90 inhibitors in lung cancer: Promise still unfulfilled. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **2016**, *14*, 346–356. [\[PubMed\]](#)
57. Michot, J.M.; Bigenwald, C.; Champiat, S.; Collins, M.; Carbonnel, F.; Postel-Vinay, S.; Berdelou, A.; Varga, A.; Bahleda, R.; Hollebecque, A.; et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: A comprehensive review. *Eur. J. Cancer* **2016**, *54*, 139–148. [\[CrossRef\]](#)
58. Jaeger, A.M.; Whitesell, L. HSP90: Enabler of cancer adaptation. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2019**, *3*, 275–297. [\[CrossRef\]](#)
59. Dudzinski, S.O.; Cameron, B.D.; Wang, J.; Rathmell, J.C.; Giorgio, T.D.; Kirschner, A.N. Combination immunotherapy and radiotherapy causes an abscopal treatment response in a mouse model of castration resistant prostate cancer. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 218. [\[CrossRef\]](#)
60. Zeng, J.; See, A.P.; Phallen, J.; Jackson, C.M.; Belcaid, Z.; Ruzevick, J.; Durham, N.; Meyer, C.; Harris, T.J.; Albesiano, E.; et al. Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2013**, *86*, 343–349. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Demaria, S.; Kawashima, N.; Yang, A.M.; Devitt, M.L.; Babb, J.S.; Allison, J.P.; Formenti, S.C. Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 728–734.

62. Dewan, M.Z.; Galloway, A.E.; Kawashima, N.; Dewyngaert, J.K.; Babb, J.S.; Formenti, S.C.; Demaria, S. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5379–5388. [[CrossRef](#)]
63. Liu, S.Z.; Jin, S.Z.; Liu, X.D.; Sun, Y.M. Role of CD28/B7 costimulation and IL-12/IL-10 interaction in the radiation-induced immune changes. *BMC Immunol.* **2001**, *2*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Wang, B.; Li, B.; Dai, Z.; Ren, S.; Bai, M.; Wang, Z.; Li, Z.; Lin, S.; Wang, Z.; Huang, N.; et al. Low-dose splenic radiation inhibits liver tumor development of rats through functional changes in CD4+CD25+Treg cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2014**, *55*, 98–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Kumari, A.; Simon, S.S.; Moody, T.D.; Garnett-Benson, C. Immunomodulatory effects of radiation: What is next for cancer therapy? *Future Oncol.* **2016**, *12*, 239–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Justilien, V.; Fields, A.P. Utility and Applications of Orthotopic Models of Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) for the Evaluation of Novel and Emerging Cancer Therapeutics. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2013**, *62*. [[CrossRef](#)]
67. Nowosielska, E.M.; Cheda, A.; Wrembel-Wargocka, J.; Janiak, M.K. Effect of low doses of low-let radiation on the innate anti-tumor reactions in radioresistant and radiosensitive mice. *Dose Response* **2012**, *10*, 500–515. [[CrossRef](#)]

# Supplementary Materials for:

## Effects of a Unique Combination of the Whole-Body Low Dose Radiotherapy With Inactivation of Two Immune Checkpoints and/or a Heat Shock Protein on the Transplantable Lung Cancer in Mice

Ewa M. Nowosielska <sup>1,†,\*</sup>, Aneta Cheda <sup>1,†</sup>, Mateusz Pociąg <sup>2</sup>, Lukasz Cheda <sup>3</sup>, Pawel Szymanski <sup>1,4</sup>, and Antoni Wiedlocha <sup>1,5,6</sup>

<sup>1</sup> Department of Radiobiology and Radiation Protection, Military Institute of Hygiene and Epidemiology, 4 Kozielska St., 01-163 Warsaw, Poland; aneta.cheda@wihe.pl (A.C.); pawel.szymanski@wihe.pl (P.S.);

<sup>2</sup> National Centre for Nuclear Research Radioisotope Centre POLATOM, 7A. Soltana St., 05-400 Otwock, Poland; mateusz.pociąg@ncbj.gov.pl

<sup>3</sup> Faculty of Chemistry, Biological and Chemical Research Centre, University of Warsaw, 101 Żwirki i Wigury St., 02-089 Warsaw, Poland; lcheda@chem.uw.edu.pl

<sup>4</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry, Drug Analyses and Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, 1 Muszyńskiego St., 90-151 Lodz, Poland

<sup>5</sup> Department of Molecular Cell Biology, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo University Hospital, Montebello, 0379 Oslo, Norway; Antoni.wiedlocha@ous-research.no

<sup>6</sup> Centre for Cancer Reprogramming, Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, University of Oslo, Montebello, 0379 Oslo, Norway

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work

\* Correspondence: ewa.nowosielska@wihe.pl; Tel.: +48 261853066

**Table S1.** Serum level of TGF- $\beta$  in C57BL/6 mice after i. v., o.t., or s.c. injection of LLC1 and treatment with blockers of the immune checkpoints and/or HSP90 combined with WBI at total doses of 0.1 or 1.0 Gy.

| Method of injection of LLC1 cells | Groups                               | TGF- $\beta$ [pg/ml] |         |         |
|-----------------------------------|--------------------------------------|----------------------|---------|---------|
|                                   |                                      | 0 Gy                 | 0.1 Gy  | 1.0 Gy  |
| i.v.                              | PBS                                  | 182.5                | 63.2*   | 74.5*   |
|                                   | anti-CTLA-4                          | 177.5                | 92.3**  | 89.8**  |
|                                   | anti-PD-1                            | 178.6                | 90.3**  | 88.8**  |
|                                   | NVP-AUY922                           | 182.6                | 124.8** | 100.2** |
|                                   | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 170.6                | 112.0** | 103.7** |
|                                   | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 178.2                | 96.9**  | 92.3**  |
|                                   | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 171.2                | 57.4**  | 50.3**  |
|                                   | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 172.6                | 118.8** | 114.6** |
| o.t.                              | PBS                                  | 173.1                | 46.8*   | 57.0*   |
|                                   | anti-CTLA-4                          | 164.2                | 77.1**  | 74.2**  |
|                                   | anti-PD-1                            | 158.6                | 75.1**  | 71.9**  |
|                                   | NVP-AUY922                           | 156.8                | 109.1** | 84.6**  |
|                                   | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 154.3                | 91.4**  | 87.3**  |
|                                   | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 164.8                | 78.0**  | 77.1**  |
|                                   | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 162.0                | 39.6**  | 33.3**  |
|                                   | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 175.9                | 103.1** | 99.0**  |
| s.c.                              | PBS                                  | 159.7                | 37.8*   | 57.0*   |
|                                   | anti-CTLA-4                          | 155.8                | 68.3**  | 74.2**  |
|                                   | anti-PD-1                            | 150.0                | 66.9**  | 71.9**  |
|                                   | NVP-AUY922                           | 148.6                | 100.4** | 84.6**  |
|                                   | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 145.8                | 82.1**  | 87.3**  |
|                                   | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 156.1                | 69.8**  | 77.1**  |
|                                   | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 143.5                | 52.0**  | 33.3**  |
|                                   | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 146.7                | 94.7**  | 99.0**  |

Mean values obtained from experiments conducted on six (i.v. or o.t. injection of tumour cells) or three (s.c. injection of tumour cells) mice per group are presented. All abbreviations are explained in 'Materials and Methods.' \*indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with PBS; \*\*indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with the same molecule or combination of the molecules.

**Table S2.** Serum levels of IL-10 in C57BL/6 mice after i.v., o.t., or s.c. injection of LLC1 and treatment with blockers of the immune checkpoints and/or HSP90 combined with WBI at total doses of 0.1 and 1.0 Gy.

| Method of injection<br>of LLC1 cells | Groups                               | IL-10 [pg/ml] |                     |                     |
|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------|---------------------|---------------------|
|                                      |                                      | 0 Gy          | 0.1 Gy              | 1.0 Gy              |
| i.v.                                 | PBS                                  | 16.37         | 7.83 <sup>*</sup>   | 7.50 <sup>*</sup>   |
|                                      | anti-CTLA-4                          | 14.11         | 9.82 <sup>**</sup>  | 9.14 <sup>**</sup>  |
|                                      | anti-PD-1                            | 13.83         | 10.16 <sup>**</sup> | 9.48 <sup>**</sup>  |
|                                      | NVP-AUY922                           | 13.65         | 11.55 <sup>**</sup> | 10.86 <sup>**</sup> |
|                                      | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 13.41         | 9.14 <sup>**</sup>  | 9.14 <sup>**</sup>  |
|                                      | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 14.99         | 10.51 <sup>**</sup> | 10.86 <sup>**</sup> |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 14.17         | 7.37 <sup>**</sup>  | 7.16 <sup>**</sup>  |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 16.50         | 8.14 <sup>**</sup>  | 9.48 <sup>**</sup>  |
| o.t.                                 | PBS                                  | 8.34          | 4.61 <sup>*</sup>   | 4.28 <sup>*</sup>   |
|                                      | anti-CTLA-4                          | 7.65          | 5.27 <sup>**</sup>  | 5.93 <sup>**</sup>  |
|                                      | anti-PD-1                            | 7.65          | 5.27 <sup>**</sup>  | 4.93 <sup>**</sup>  |
|                                      | NVP-AUY922                           | 7.30          | 5.27 <sup>**</sup>  | 5.60 <sup>**</sup>  |
|                                      | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 6.95          | 4.73 <sup>**</sup>  | 4.60 <sup>**</sup>  |
|                                      | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 7.61          | 5.93 <sup>**</sup>  | 4.16 <sup>**</sup>  |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 7.27          | 3.62 <sup>**</sup>  | 3.29 <sup>**</sup>  |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 6.89          | 5.93 <sup>**</sup>  | 3.95 <sup>**</sup>  |
| s.c.                                 | PBS                                  | 5.93          | 3.29 <sup>*</sup>   | 2.96 <sup>*</sup>   |
|                                      | anti-CTLA-4                          | 5.83          | 4.73 <sup>**</sup>  | 3.87 <sup>**</sup>  |
|                                      | anti-PD-1                            | 5.43          | 4.28 <sup>**</sup>  | 3.73 <sup>**</sup>  |
|                                      | NVP-AUY922                           | 5.93          | 4.61 <sup>**</sup>  | 3.53 <sup>**</sup>  |
|                                      | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 5.60          | 4.16 <sup>**</sup>  | 3.81 <sup>**</sup>  |
|                                      | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 5.74          | 3.95 <sup>**</sup>  | 3.20 <sup>**</sup>  |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 5.27          | 2.90 <sup>**</sup>  | 2.33 <sup>**</sup>  |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 5.57          | 3.87 <sup>**</sup>  | 3.53 <sup>**</sup>  |

Mean values obtained from experiments conducted on six (i.v. or o.t. injection of tumour cells) or three (s.c. injection of tumour cells) mice per group are presented. All abbreviations are explained in 'Materials and Methods.' \*indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with PBS; ^indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with the same molecule or combination of the molecules.

**Table S3.** Serum levels of TNF- $\alpha$  in C57BL/6 mice after i.v., o.t., or s.c. injection of LLC1 and treatment with blockers of the immune checkpoints and/or HSP90 combined with WBI at total doses of 0.1 and 1.0 Gy.

| Method of injection<br>of LLC1 cells | Groups                               | TNF- $\alpha$ [pg/ml] |         |         |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|---------|---------|
|                                      |                                      | 0 Gy                  | 0.1 Gy  | 1.0 Gy  |
| i.v.                                 | PBS                                  | 11.44                 | 13.37*  | 13.31*  |
|                                      | anti-CTLA-4                          | 11.44                 | 12.68** | 12.67** |
|                                      | anti-PD-1                            | 10.86                 | 12.67** | 12.23** |
|                                      | NVP-AUY922                           | 11.24                 | 12.45** | 12.04** |
|                                      | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 11.05                 | 12.68** | 11.84*  |
|                                      | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 11.05                 | 11.64*  | 12.68** |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 10.86                 | 13.61** | 13.75** |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 11.24                 | 12.88** | 13.31** |
| o.t.                                 | PBS                                  | 13.85                 | 38.48*  | 37.76*  |
|                                      | anti-CTLA-4                          | 15.86                 | 35.46** | 28.07** |
|                                      | anti-PD-1                            | 14.09                 | 19.85** | 16.97** |
|                                      | NVP-AUY922                           | 15.13                 | 19.28** | 17.83** |
|                                      | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 15.61                 | 29.06** | 17.83** |
|                                      | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 15.13                 | 23.46** | 16.60*  |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 15.86                 | 59.67** | 57.62** |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 14.09                 | 25.85** | 35.46** |
| s.c.                                 | PBS                                  | 8.05                  | 10.13*  | 10.29*  |
|                                      | anti-CTLA-4                          | 8.29                  | 9.93**  | 10.11** |
|                                      | anti-PD-1                            | 8.11                  | 9.75**  | 9.94**  |
|                                      | NVP-AUY922                           | 8.05                  | 9.27**  | 9.75**  |
|                                      | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 8.05                  | 9.18**  | 9.39**  |
|                                      | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 7.94                  | 8.64**  | 8.71**  |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 8.54                  | 10.53** | 10.67** |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 8.37                  | 9.57**  | 9.05**  |

Mean values obtained from experiments conducted on six (i.v. or o.t. injection of tumour cells) or three (s.c. injection of tumour cells) mice per group are presented. All abbreviations are explained in 'Materials and Methods.' \*indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with PBS; ^indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with the same molecule or combination of the molecules.

**Table S4.** Serum levels of IFN- $\gamma$  in C57BL/6 mice after i.v., o.t., or s.c. injection of LLC1 and treatment with blockers of the immune checkpoints and/or HSP90 combined with WBI at total doses of 0.1 and 1.0 Gy.

| Method of injection<br>of LLC1 cells | Groups                               | IFN - $\gamma$ [pg/ml] |        |        |
|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|--------|--------|
|                                      |                                      | 0 Gy                   | 0.1 Gy | 1.0 Gy |
| i.v.                                 | PBS                                  | 1.83                   | 5.95*  | 5.55*  |
|                                      | anti-CTLA-4                          | 1.83                   | 3.85** | 2.52** |
|                                      | anti-PD-1                            | 1.77                   | 2.58** | 3.01** |
|                                      | NVP-AUY922                           | 1.72                   | 2.93** | 2.39** |
|                                      | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 1.72                   | 2.45** | 2.66** |
|                                      | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 1.71                   | 2.13** | 2.14** |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 1.60                   | 5.26** | 5.37** |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 1.60                   | 3.21** | 2.90** |
| o.t.                                 | PBS                                  | 0.79                   | 1.72*  | 1.72*  |
|                                      | anti-CTLA-4                          | 0.89                   | 1.47** | 1.39** |
|                                      | anti-PD-1                            | 0.84                   | 1.28** | 1.35** |
|                                      | NVP-AUY922                           | 0.84                   | 1.23** | 1.35** |
|                                      | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 0.89                   | 1.71** | 1.33** |
|                                      | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 0.89                   | 1.60** | 1.28** |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 0.89                   | 1.83** | 1.77** |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 0.85                   | 1.55** | 1.24** |
| s.c.                                 | PBS                                  | 0.61                   | 1.08*  | 1.03*  |
|                                      | anti-CTLA-4                          | 0.75                   | 1.03** | 0.96** |
|                                      | anti-PD-1                            | 0.70                   | 0.89** | 0.90** |
|                                      | NVP-AUY922                           | 0.66                   | 0.93** | 0.90** |
|                                      | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 0.74                   | 0.93** | 0.93** |
|                                      | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 0.70                   | 0.89** | 0.93** |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 0.79                   | 1.23** | 1.23** |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 0.84                   | 0.85   | 0.89   |

Mean values obtained from experiments conducted on six (i.v. or o.t. injection of tumour cells) or three (s.c. injection of tumour cells) mice per group are presented. All abbreviations are explained in 'Materials and Methods.' \*indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with PBS; ^indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with the same molecule or combination of the molecules.

**Table S5.** Serum levels of IL-6 in C57BL/6 mice after i.v., o.t., or s.c. injection of LLC1 and treatment with blockers of the immune checkpoints and/or HSP90 combined with WBI at total doses of 0.1 and 1.0 Gy.

| Method of injection<br>of LLC1 cells | Groups                               | IL-6 [pg/ml] |        |        |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------|--------|--------|
|                                      |                                      | 0 Gy         | 0.1 Gy | 1.0 Gy |
| i.v.                                 | PBS                                  | 8.94         | 8.79   | 9.11   |
|                                      | anti-CTLA-4                          | 8.93         | 8.79   | 9.11   |
|                                      | anti-PD-1                            | 8.57         | 8.79   | 9.08   |
|                                      | NVP-AUY922                           | 8.39         | 8.61   | 9.08   |
|                                      | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 8.37         | 8.55   | 8.94   |
|                                      | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 8.18         | 8.44   | 8.62   |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 8.64         | 8.27   | 8.62   |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 8.37         | 8.27   | 8.12   |
| o.t.                                 | PBS                                  | 4.31         | 4.67   | 4.57   |
|                                      | anti-CTLA-4                          | 4.43         | 4.37   | 4.63   |
|                                      | anti-PD-1                            | 4.56         | 4.24   | 4.43   |
|                                      | NVP-AUY922                           | 4.81         | 4.63   | 4.81   |
|                                      | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 4.31         | 4.71   | 4.57   |
|                                      | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 4.35         | 4.81   | 4.81   |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 4.49         | 4.95   | 4.63   |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 5.57         | 4.35   | 4.29   |
| s.c.                                 | PBS                                  | 0.65         | 0.59   | 0.42   |
|                                      | anti-CTLA-4                          | 0.56         | 0.61   | 0.53   |
|                                      | anti-PD-1                            | 0.47         | 0.52   | 0.43   |
|                                      | NVP-AUY922                           | 0.56         | 0.50   | 0.33   |
|                                      | anti-CTLA-4 + NVP-AUY922             | 0.62         | 0.57   | 0.44   |
|                                      | anti-PD-1 + NVP-AUY922               | 0.52         | 0.50   | 0.54   |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1              | 0.59         | 0.54   | 0.36   |
|                                      | anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + NVP-AUY922 | 0.52         | 0.42   | 0.46   |

Mean values obtained from experiments conducted on six (i.v. or o.t. injection of tumour cells) or three (s.c. injection of tumour cells) mice per group are presented. All abbreviations are explained in 'Materials and Methods.' \*indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with PBS; ^indicates statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference from the results obtained in the sham-exposed mice injected with the same molecule or combination of the molecules.

Mateusz Pociągiciel, Piotr Opyd, Tomasz Zawodny,  
Michał Lis, Krzysztof J. Filipiak

# **Meta-Analysis of the Impact of Low-Dose Ionizing Radiation on Mortality and Progression of Heart Disease in the General Patient Population: Insights from Hormesis Theory in Cardiology**

*Journal of Clinical Medicine 2024*

Systematic Review

# Meta-Analysis of the Impact of Low-Dose Ionizing Radiation on Mortality and Progression of Heart Disease in the General Patient Population: Insights from Hormesis Theory in Cardiology

Mateusz Pociągł <sup>1,\*</sup>, Piotr Opyd <sup>1</sup>, Tomasz Zawodny <sup>1</sup>, Michał Lis <sup>1,2</sup> and Krzysztof J. Filipiak <sup>3,4</sup> 

<sup>1</sup> Clinical Department of Internal Medicine, Czerniakowski Hospital, 00-739 Warsaw, Poland

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Łazarski University, 02-662 Warsaw, Poland

<sup>3</sup> Department of Hypertensiology, Angiology and Internal Medicine, Poznań University of Medical Sciences, 25-406 Poznań, Poland; krzysztof.filipiak@uczniamedyczna.com.pl

<sup>4</sup> Department of Clinical Sciences, Maria Skłodowska-Curie Medical Academy, 03-411 Warsaw, Poland

\* Correspondence: mateusz.pociagel@szpitalczerniakowski.waw.pl



**Citation:** Pociągł, M.; Opyd, P.; Zawodny, T.; Lis, M.; Filipiak, K.J. Meta-Analysis of the Impact of Low-Dose Ionizing Radiation on Mortality and Progression of Heart Disease in the General Patient Population: Insights from Hormesis Theory in Cardiology. *J. Clin. Med.* **2024**, *13*, 6909. <https://doi.org/10.3390/jcm13226909>

Academic Editors: Giovanni Di Salvo and Gian Luigi Nicolosi

Received: 10 October 2024

Revised: 3 November 2024

Accepted: 14 November 2024

Published: 16 November 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** **Background/Objectives:** Low-dose ionizing radiation (LDIR) is commonly used in medical diagnoses and certain professions, but its long-term effects on noncancer diseases, particularly cardiovascular disease (CVD), remain uncertain. While LDIR has recognized diagnostic benefits, its influence on CVD mortality and disease progression is still debated, with some suggesting that low doses may even have beneficial effects, as per the hormesis theory. **Methods:** This meta-analysis aimed to evaluate the impact of LDIR on cardiovascular health outcomes. The study followed a systematic approach, using the PRISMA guidelines to select and analyze relevant studies from databases such as PubMed, Scopus, Web of Science, and Embase. Out of 167 identified studies, 8 were chosen for analysis, including 6 cohort studies and 2 experimental studies. **Results:** The findings indicated a significant link between LDIR exposure and increased CVD mortality and progression, though some studies also noted potential benefits of LDIR in certain conditions, aligning with the hormesis theory. **Conclusions:** These mixed results raise questions about the specific conditions under which LDIR might be beneficial or harmful. Overall, the study emphasizes the need for strict radiation control measures and health monitoring for individuals regularly exposed to LDIR, both in clinical and occupational settings.

**Keywords:** low-dose ionizing radiation; cardiovascular disease; mortality; disease progression; hormesis; meta-analysis

## 1. Introduction

LDIR is an essential component of current medical practices especially in diagnostic techniques that include X-rays, CT scans, and nuclear medicine [1,2]. Moreover, LDIR is also reported in some workplaces such as nuclear power plants, radiology departments, and uranium mining [3]. It is established that LDIR is useful in the diagnosis of diseases and treatment of patients, but the detrimental effects that exposure to it has on the human body in the long run are a cause for concern, especially in relation to the effects that it has on non-cancer diseases such as CVD [4]. This concern is further supported by the fact that cardiovascular diseases are the number one killer all over the world, hence the need to establish all possible risk factors for the diseases including LDIR [5]. The use of LDIR has been given a new perspective with the introduction of radiation hormesis [3]. Hormesis theory is an assumption that low concentrations of a toxic agent, for instance, ionizing radiation, can stimulate favorable responses in biological systems [6]. As per this theory, LDIR probably has the ability to induce protective effects that prevent the growth of diseases such as CVD [1]. Nevertheless, there is still no conclusive research to support this theory,

and the evidence is rather scattered [7]. The results of some investigations actually point to possible benefits of LDIR, while other investigations point to increased cardiovascular risks. These mixed findings have indicated the need for a systematic review and synthesis of the existing literature to understand these effects more comprehensively [8].

Moreover, knowing the impact of LDIR on cardiovascular health will help to design protective measures and to establish the standards for populations that are exposed to low doses of radiation. Such populations are not only the healthcare workers and patients who frequently require diagnostic imaging, but also workers who are occupationally exposed to radiation. Since LDIR is used by large populations and can have an impact on public health, it is necessary to determine the long-term cardiovascular effects and advantages of this method [5].

New developments in epidemiological and biological science have shed more light on how LDIR may affect cardiovascular health. Research has been conducted to review the effects of LDIR on heart disease progression and mortality and to investigate the mediators, including inflammation, oxidative stress, and endothelial function. However, due to differences in study methodology, the characteristics of the population under study, and the radiation exposure levels, the conclusions differ. This systematic review and meta-analysis will therefore sum up the existing data on the adverse effects and possible cardioprotective benefits of LDIR. In this way, we try to offer a more conclusive view that would be useful for clinical practice, occupational health strategies, and further studies.

### *Research Questions*

What is the impact of LDIR on CVD mortality in the general population?

How does LDIR influence the progression of heart disease in patients exposed to low doses of ionizing radiation?

What insights can be drawn from hormesis theory regarding the potential beneficial or harmful effects of LDIR on cardiovascular health?

## **2. Methodology**

### *2.1. Search Strategy*

The results of this systematic review and meta-analysis were prepared following the guidelines of PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses). The databases used in the literature search were PubMed, Scopus, Web of Science, and Embase.

To find the studies, the following keywords and MeSH terms were used in the search strategy: low-dose ionizing radiation, cardiovascular disease, mortality, heart disease progression, radiation exposure, and hormesis. Boolean connectors AND and OR were used to link the keywords and filter the results.

### *2.2. Inclusion Criteria*

Studies were included based on the following criteria: (i) exposure to low-dose ionizing radiation (0.1–0.2 Gy per fraction and cumulative totals ranging from 1 to 4 Gy), (ii) cardiovascular disease mortality or progression, (iii) cohort studies, case-control studies, or experimental studies, (iv) publication in peer-reviewed journals, and (v) sufficient data for extraction and analysis.

### *2.3. Exclusion Criteria*

Studies were excluded based on the following criteria: (i) review articles, editorials, or opinion pieces, (ii) studies involving high-dose ionizing radiation exposure, (iii) studies with insufficient data for extraction, (iv) non-English-language studies, and (v) studies not focused on cardiovascular outcomes.

#### 2.4. Article Screening and Selection

Subsequently, the articles were filtered according to their titles and abstracts after the completion of the research process and the elimination of duplicate articles. Two independent reviewers then determined the relevance of each article, and the differences were discussed and/or resolved with the help of a third reviewer if necessary. The titles and abstracts of the identified papers were then reviewed, and articles that met the inclusion and exclusion criteria were obtained in full text.

#### 2.5. Data Extraction

Information from the included studies was extracted using a data extraction form. The following information was collected from each study: study name, authors, publication year, type of study, aim and objective, number of participants, LDIR dose, impact on mortality rate, impact on the progression of cardiac diseases, and outcomes. The extracted data were also double-checked by two independent reviewers to enhance the accuracy and completeness of the data.

#### 2.6. Quality Assessment

The risk of bias of included studies was evaluated by using the Cochrane Risk of Bias tool. This tool evaluates the risk of bias across several domains: the potential sources of bias are selection bias (randomization and allocation concealment), performance bias (participant and personnel blinding), detection bias (outcome assessor blinding), attrition bias (incomplete outcome data), reporting bias (selective reporting), and other bias. Each domain was considered as low risk of bias, high risk of bias, or unclear. The quality assessment was performed by two authors of the review independently, and any difference in their scoring was resolved by discussion or by referring to a third author.

#### 2.7. Data Synthesis

The meta-analysis of the data was performed using Comprehensive Meta-Analysis (CMA) software version 3. The main end points were the impact of LDIR on cardiovascular disease mortality and change. The meta-analysis was conducted to obtain pooled estimates because of the variability observed in the studies. Cohesion was evaluated using the  $I^2$  statistic; the values of  $I^2 = 25\%$ ,  $50\%$ , and  $75\%$  were considered low, moderate, and high, respectively. The results were checked to ensure that they are not sensitive to the choice of functional form.

### 3. Results

The comprehensive search across different databases yielded 167 studies after the removal of duplicates and by applying the inclusion and exclusion criteria; in total, 8 papers were included in the analysis, of which 6 were cohort studies and 2 were experimental studies. Figure 1 represents the PRISMA flow diagram of the selection process of included studies. The cohort studies assessed the impact of LDIR exposure on CVD mortality and disease progression in nuclear industries and uranium mining populations; the experimental studies examined the biological effects of LDIR on atherosclerosis in animal models.

Table 1 represents the detailed characteristics of the included studies. The quality assessment of included studies showed the potential performance bias among them. Figure 2 represents the traffic light plot of the quality assessment of the included studies.

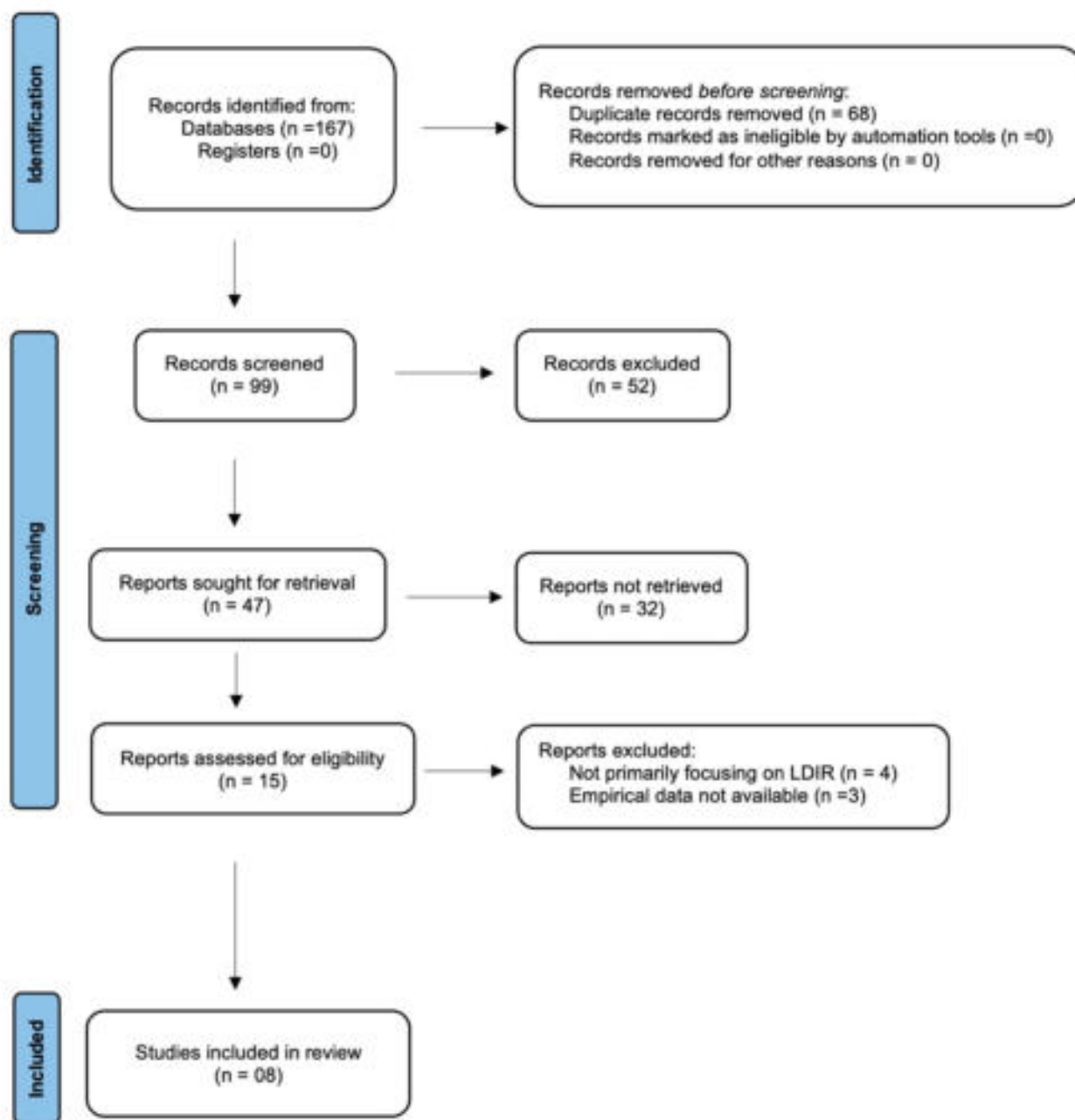


Figure 1. PRISMA flow diagram of included studies.

Table 1. Comprehensive overview of study characteristics.

| Study Name                                                                                                                             | Authors | Type of Study | Aim and Objective                                                                                                            | Participant Size | LDIR Dose (Low-Dose Ionizing Radiation)                                                                | Effect on Mortality                                                                                                                                                                                                         | Effect on Cardiac Disease Progression                                                                                                                                        | Outcomes                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Analysis of the Mortality Experience Amongst U.S. Nuclear Power Industry Workers After Chronic Low-Dose Exposure to Ionizing Radiation | [9]     | Cohort Study  | To analyze the mortality rates among U.S. nuclear power industry workers exposed to chronic low-dose ionizing radiation      | 53,698           | Several millisieverts (mSv) per year. Individual dosimetry                                             | Positive though statistically nonsignificant association with leukemia and all solid cancers. Positive and significant association with arteriosclerotic heart disease including coronary heart disease with an ERR of 8.78 | Strong positive association between radiation dose and deaths from arteriosclerotic heart disease, including coronary heart disease, with an ERR of 8.78 (95% CI 2.10, 20.0) | Mortality reduced compared to general population (healthy worker effect). Positive association with leukemia and all solid cancers, and strong association with arteriosclerotic heart disease. Further follow-up and analysis recommended. |
| The Risk of Radiation-Induced Cerebrovascular Disease in Chernobyl Emergency Workers                                                   | [10]    | Cohort Study  | To estimate radiation risks of non-cancer diseases of the circulatory system among Chernobyl emergency workers               | 61,017           | Mean dose of 0.1 Gy. Individual dosimetry                                                              | Statistically significant dose risks for ischemic heart disease (ERR $\text{Gy}^{-1} = 0.41$ ), essential hypertension (ERR $\text{Gy}^{-1} = 0.36$ ), and cerebrovascular diseases (ERR $\text{Gy}^{-1} = 0.45$ )          | Statistically significant dose response for cerebrovascular diseases, with risk highest in workers receiving >150 mGy in <6 weeks.                                           | Significant increase in radiation risks for ischemic heart disease, essential hypertension, and cerebrovascular diseases. Risks vary based on duration of stay and dose rate, with high daily doses showing stronger associations.          |
| Mortality from Cardiovascular Diseases in the German Uranium Miners Cohort Study, 1946–1998                                            | [11]    | Cohort Study  | To investigate the association between cardiovascular disease mortality and exposure to ionizing radiation in uranium miners | 59,001           | Mean cumulative exposure: 241 WLM for radon, 41 mSv for external gamma radiation. Individual dosimetry | No trend in circulatory disease mortality with increasing cumulative exposure to radon, gamma radiation, or radionuclides                                                                                                   | No significant association between radiation exposure and heart disease or stroke mortality was found                                                                        | The study found no detectable association between cardiovascular disease mortality and cumulative radiation exposure. Limited evidence for increased risk of circulatory diseases from low-dose radiation exposure.                         |

Table 1. Cont.

| Study Name                                                                                                                         | Authors | Type of Study              | Aim and Objective                                                                                                                                                                                             | Participant Size                   | LDIR Dose (Low-Dose Ionizing Radiation)                                                                                    | Effect on Mortality                                                                                                                                                                    | Effect on Cardiac Disease Progression                                                                                                                         | Outcomes                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Low-dose ionizing radiation and cardiovascular diseases—Strategies for molecular epidemiological studies in Europe                 | [12]    | Cohort Study               | To assess cardiovascular disease mortality among German uranium miners exposed to low doses of ionizing radiation                                                                                             | 58,972                             | Cumulative exposure to radon, external gamma radiation, and long-lived radionuclides. Environment and individual dosimetry | Higher mortality rates due to cardiovascular diseases in exposed workers                                                                                                               | Not specified but implied significant progression in disease                                                                                                  | Increased mortality due to cardiovascular diseases with significant radiation exposure.                                                                                                                                |
| A Model of Cardiovascular Disease Giving a Plausible Mechanism for the Effect of Fractionated Low-Dose Ionizing Radiation Exposure | [13]    | Theoretical Model Study    | To propose a spatial reaction-diffusion model for atherosclerosis that provides a plausible mechanism for the effects of chronic, fractionated low-dose ionizing radiation exposure on cardiovascular disease | Not applicable (model-based study) | Fractionated low-dose ionizing radiation, exact dosage not specified                                                       | The model suggests that chronic exposure to low doses of ionizing radiation may increase mean chemo-attractant (MCP-1) concentration, which could elevate cardiovascular disease risk. | Increased MCP-1 due to radiation-induced monocyte death and reduced MCP-1 degradation, potentially leading to the progression of atherosclerosis              | The model's predictions align with observed cardiovascular disease risks in occupationally exposed groups, suggesting that chronic low-dose radiation exposure could contribute to cardiovascular disease development. |
| Cardiovascular Risks Associated with Low Dose Ionizing Particle Radiation                                                          | [14]    | Experimental study on mice | To report on the long-term effects of whole-body proton and iron ion irradiation on cardiovascular health in mice                                                                                             | Not applicable (animal study)      | Proton (0.5 Gy, 1 GeV) and iron ion (0.15 Gy, 1 GeV/nucleon). Beam irradiation calculations                                | Mortality not significantly different among irradiated and control groups up to 28 days post-AMI                                                                                       | Significant changes in cardiac function and remodeling post-irradiation; improved function in proton-irradiated mice but declined in iron ion-irradiated mice | Demonstrated specific cardiovascular effects depending on the type of radiation, with potential implications for space travel and radiotherapy.                                                                        |

Table 1. Cont.

| Study Name                                                                                                   | Authors | Type of Study                     | Aim and Objective                                                                                                                                   | Participant Size               | LDIR Dose (Low-Dose Ionizing Radiation)                                                     | Effect on Mortality                                                                                                    | Effect on Cardiac Disease Progression                                                                                  | Outcomes                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Low Dose Ionizing Radiation Exposure and Cardiovascular Disease Mortality                                    | [15]    | Cohort Study                      | To assess the risk of cardiovascular disease mortality in Canadian workers exposed to low-dose ionizing radiation                                   | 337,397                        | Mean dose: 8.6 mSv (men), 1.2 mSv (women). Individual dosimetry                             | Significant positive dose-response relationship; higher risk than other occupational cohorts and atomic bomb survivors | Significant positive dose-response relationship observed for both men and women with varying ERRs for different doses  | Strong positive association between radiation dose and CVD mortality. Limitations include potential biases due to dosimetry uncertainties and lack of adjustment for non-radiation risk factors.                                         |
| Reparative effects after low-dose radiation exposure: Inhibition of atherosclerosis by reducing NETs release | [16]    | Experimental Study (Animal Model) | To explore the mechanisms by which low-dose radiation may contribute to atherosclerosis and investigate its effects on neutrophils and NET release. | 40 Apoe-KO mice (animal study) | 0.5 Gy $\gamma$ -ray whole-body low-dose ionizing radiation. Beam irradiation calculations. | The study focused on the mechanisms rather than direct mortality outcomes.                                             | Significant decrease in atherosclerosis progression observed, especially in high-fat diet group receiving low-dose IR. | Long-term low-dose ionizing radiation exposure was found to stimulate neutrophils and inhibit their production of NETs, resulting in the inhibition of atherosclerosis. In the high-fat diet group, the effect was particularly evident. |

ERR—excess relative risks; CI—confidence interval; WLM—working level months; MCP-1—mean chemo-attractant; AMI—acute myocardial ischemia; NETs—neuroendocrine tumors; IR—ionizing radiation.

| Authors                | Selection Bias | Performance Bias | Detection Bias | Attrition Bias | Reporting Bias | Other Bias | Overall Risk of Bias |
|------------------------|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|------------|----------------------|
| Howe et al., 2004      | Low            | High             | Low            | Low            | Low            | Low        | Low                  |
| Ivanov et al., 2006    | Low            | High             | Low            | Low            | Low            | Low        | Low                  |
| Kreuzer et al., 2006   | Low            | High             | Low            | Low            | Low            | Low        | Low                  |
| Kreuzer et al., 2015   | Low            | High             | Low            | Low            | Low            | Low        | Low                  |
| Little et al., 2009    | High           | Low              | High           | Low            | Low            | Low        | High                 |
| Yan et al., 2014       | Low            | High             | Low            | Low            | Low            | Low        | Low                  |
| Zielinski et al., 2009 | Low            | High             | Low            | Low            | Low            | Low        | Low                  |
| Qu et al., 2024        | Low            | High             | Low            | Low            | Low            | Low        | Low                  |

Figure 2. Traffic light plot of quality assessment of included studies [9–16].

Howe et al. (2004) observed a positive trend though nonsignificant for leukemia and all solid cancers. It was, however, found to be significantly related to arteriosclerotic heart disease that includes congenital heart disease (CHD) with an ERR of 8.78 (95% CI 2.10, 20.0) [9]. Ivanov et al. (2006) found that dose risks were significantly increased for ischemic heart disease ( $\text{ERR Gy}^{-1} = 0.41$ ), essential hypertension ( $\text{ERR Gy}^{-1} = 0.36$ ), and cerebrovascular diseases ( $\text{ERR Gy}^{-1} = 0.45$ ). They reported that the highest risk was associated with workers who received more than 150 mGy in less than 6 weeks [10]. Kreuzer et al. (2006) did not observe any increase in mortality from circulatory diseases with cumulative exposure to radon, gamma radiation, or radionuclides [11]. In another study conducted by Kreuzer et al. (2015), the mortality from CVD in German uranium miners who were exposed to low doses of ionizing radiation was compared. Cardiovascular diseases were reported to be more frequent in exposed workers and indicated severe advancement in disease [12]. Little et al. (2009) suggested the spatial reaction-diffusion model for atherosclerosis that explained the biological mechanism of the impact of chronic, fractionated low-dose ionizing radiation exposure on CVD. The model proposed that the following effects might be observed in chronic low dose ionizing radiation: the mean chemo-attractant (MCP-1) concentration would rise, thus raising the risk of cardiovascular diseases [13].

Yan et al. (2014) described the study of the long-term cardiovascular consequences of whole-body proton and iron ion irradiation in mice. The study established differences in cardiovascular impacts based on the type of radiation; while proton radiation enhanced cardiac function in mice, iron ion radiation negatively impacted it [14]. Zielinski et al. (2009) observed a positive dose-response trend for CVD mortality, with ERR per Sievert being 1.22 for men (90% CI: 0.47, 2.10) and 7.37 for women (90% CI: 0.95 percent, 18.1 percent). The excess absolute risk (EAR) for total radiation-induced solid cancer per Sievert per 10,000 person-years was 37.5 (90% CI; the whole cohort mean score was 17.0 (SD = 60.1)) [15]. Qu et al. (2024) studied the possible atherosclerosis-related mechanisms of LDIR and identified that LDIR activated neutrophils and suppressed the generation of neutrophil extracellular traps (NETs), thus suppressing atherosclerosis. This was most apparent in the high-fat diet group [16].

### 3.1. Mortality Rate in LDIR Exposed Group

The meta-analysis of enhanced mortality rate in the low-dose ionizing radiation (LDIR)-exposed group includes five studies, as illustrated in Figure 3. Howe et al. (2004) [9] reported an event rate of 0.272 with a 95% confidence interval (CI) of 0.268 to 0.275, showing a statistically significant increase in mortality ( $Z = -101.713$ ,  $p < 0.001$ ). Ivanov et al. (2006) [10] found an event rate of 0.100 (95% CI: 0.098 to 0.102), also significant ( $Z = -162.825$ ,  $p < 0.001$ ). Kreuzer et al. (2006) [11] indicated an event rate of 0.157 (95% CI: 0.154 to 0.160), with a highly significant result ( $Z = -148.584$ ,  $p < 0.001$ ). Kreuzer et al. (2015) [12] observed a higher event rate of 0.490 (95% CI: 0.486 to 0.494), indicating a substantial increase in mortality ( $Z = -4.851$ ,  $p < 0.001$ ). Zielinski et al. (2009) [15] found an event rate of 0.191 (95% CI: 0.085 to 0.376), with a significant increase ( $Z = -3.018$ ,  $p = 0.003$ ). The overall analysis suggests a consistent and statistically significant increase in mortality among LDIR-exposed individuals.

### Meta-Analysis of Enhanced Mortality Rate in LDIR-Exposed Group

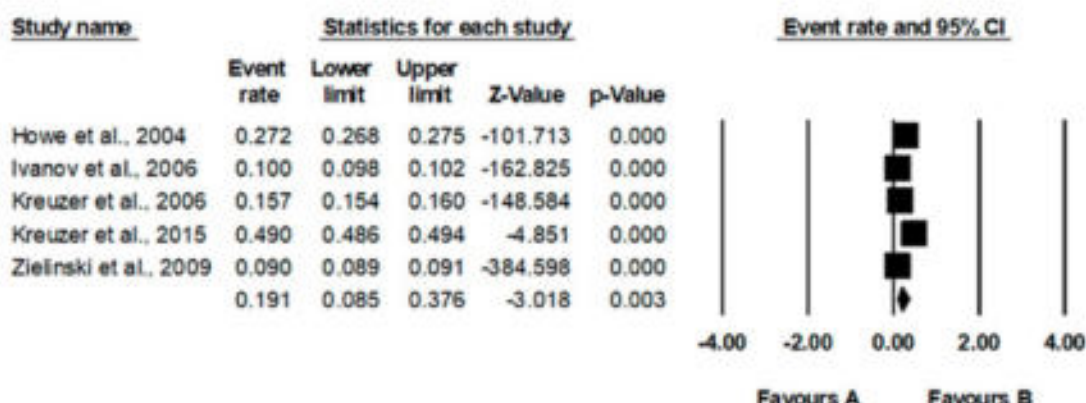


Figure 3. Forest plot, illustrating the mortality rate in the LDIR-exposed group [9–12,15].

#### 3.2. Cardiac Disease Progression Rate in LDIR-Exposed Group

The meta-analysis results for the progression rate of cardiac disease in the LDIR-exposed group are presented in Figure 4. Howe et al. (2004) [9] reported an event rate of 0.286 (95% CI: 0.282 to 0.290), showing significant progression ( $Z = -95.708$ ,  $p < 0.001$ ). Ivanov et al. (2006) [10] found an event rate of 0.215 (95% CI: 0.211 to 0.218), with a statistically significant result ( $Z = -131.524$ ,  $p < 0.001$ ). Kreuzer et al. (2006) [11] observed an event rate of 0.258 (95% CI: 0.255 to 0.262), indicating significant progression ( $Z = -112.076$ ,  $p < 0.001$ ). Kreuzer et al. (2015) [12] noted an event rate of 0.168 (95% CI: 0.165 to 0.171), with significant findings ( $Z = -145.306$ ,  $p < 0.001$ ). Zielinski et al. (2009) [15] reported an event rate of 0.268 (95% CI: 0.266 to 0.269), with a significant progression rate ( $Z = -258.674$ ,  $p < 0.001$ ). The pooled analysis indicates a robust and statistically significant association between LDIR exposure and increased cardiac disease progression.

### Meta-Analysis of Cardiac Disease Progression Rate in LDIR-Exposed Group

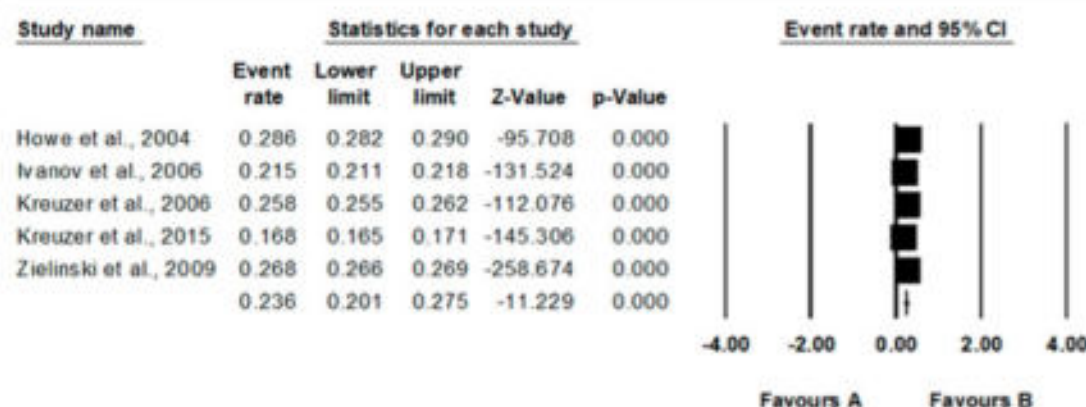


Figure 4. Forest plot of cardiac disease progression rate in LDIR-exposed group [9–12,15].

#### 3.3. Types of Cardiac Disease Progression in LDIR-Exposed Group

The types of cardiac diseases prevalent in the LDIR-exposed group are summarized in Figure 5. Howe et al. (2004) [9] identified arteriosclerotic heart disease with an event rate of

0.174 (95% CI: 0.171 to 0.178), showing significant findings ( $Z = -136.681$ ,  $p < 0.001$ ). Ivanov et al. (2006) [10] reported ischemic heart disease and cerebrovascular diseases with an event rate of 0.215 (95% CI: 0.211 to 0.218), also significant ( $Z = -131.524$ ,  $p < 0.001$ ). Kreuzer et al. (2006) [11] observed general cardiovascular diseases with an event rate of 0.191 (95% CI: 0.188 to 0.194), significantly elevated ( $Z = -137.942$ ,  $p < 0.001$ ). Kreuzer et al. (2015) [12] found atherosclerosis with an event rate of 0.168 (95% CI: 0.165 to 0.171), also significant ( $Z = -145.306$ ,  $p < 0.001$ ). Zielinski et al. (2009) [15] reported atherosclerosis with an event rate of 0.268 (95% CI: 0.266 to 0.269), showing significant results ( $Z = -258.674$ ,  $p < 0.001$ ). The comprehensive analysis indicates that LDIR exposure is associated with various types of cardiac diseases, particularly atherosclerosis and ischemic heart disease.

### Meta-Analysis of Types of Cardiac Disease Progression Rate in LDIR-Exposed Group

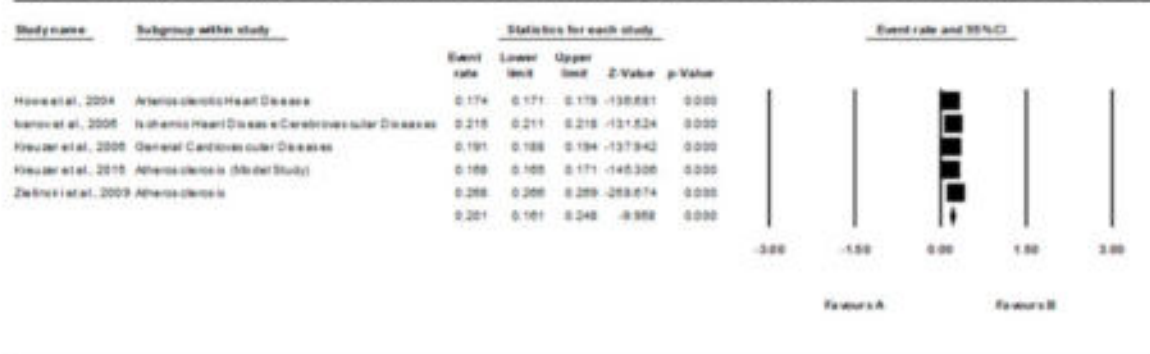


Figure 5. Forest plot depicting the types of cardiac disease progression in the LDIR-exposed group [9–12,15].

### 3.4. Comparison of Mortality Between LDIR-Exposed Group and Control Group

The mortality rates between the LDIR-exposed group and the control group, highlighting studies that reported positive outcomes of LDIR exposure, are compared in Figure 6. Yan et al. (2014) [14] found an odds ratio of 2.434 (95% CI: 0.111 to 53.509), suggesting a reduced mortality rate in the LDIR group, although not statistically significant ( $Z = 0.564$ ,  $p = 0.573$ ). Qu et al. (2024) [16] reported an odds ratio of 2.667 (95% CI: 0.184 to 38.558), indicating a reduction in mortality, but, again, not statistically significant ( $Z = 0.720$ ,  $p = 0.472$ ). The combined odds ratio was 2.564 (95% CI: 0.340 to 19.350), with a Z-value of 0.913 and a p-value of 0.361. These findings suggest a trend towards reduced mortality in LDIR-exposed groups, but with wide confidence intervals and nonsignificant results.

### Meta-Analysis of Positive Outcome of LDIR-Exposed group on Mortality Rate as Compared to Control Group

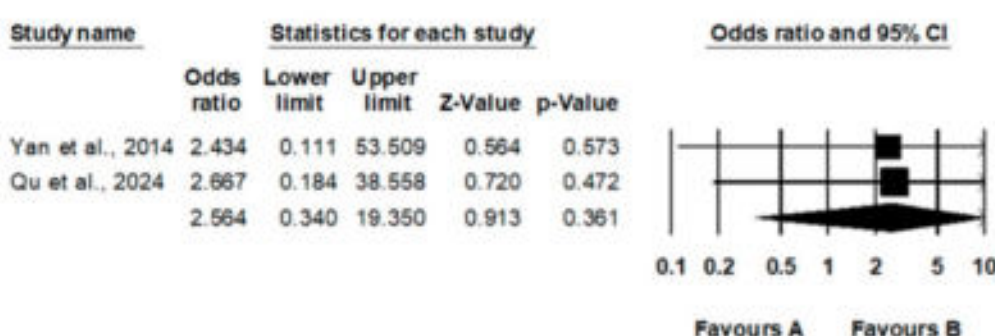


Figure 6. Forest plot comparing mortality between LDIR-exposed group and control group [14,16].

### 3.5. Comparison of Cardiac Disease Progression Between LDIR-Exposed Group and Control Group

A forest plot comparing cardiac disease progression between the LDIR-exposed group and the control group is presented in Figure 7. Yan et al. (2014) [16] found an odds ratio of 7.098 (95% CI: 0.427 to 118.009), indicating a slower progression rate in the LDIR group, although not statistically significant ( $Z = 1.366$ ,  $p = 0.172$ ). Qu et al. (2024) [16] reported an odds ratio of 2.667 (95% CI: 0.184 to 38.558), suggesting reduced progression, but also not statistically significant ( $Z = 0.720$ ,  $p = 0.472$ ). The combined odds ratio was 4.243 (95% CI: 0.612 to 29.423), with a  $Z$ -value of 1.463 and a  $p$ -value of 0.143. These results indicate a potential trend towards slower cardiac disease progression in the LDIR-exposed groups, but the findings are not statistically significant and have wide confidence intervals.

Meta-Analysis of Positive Outcome of LDIR-Exposed group on Slow Cardiac Disease Progression Rate as Compared to Control Group

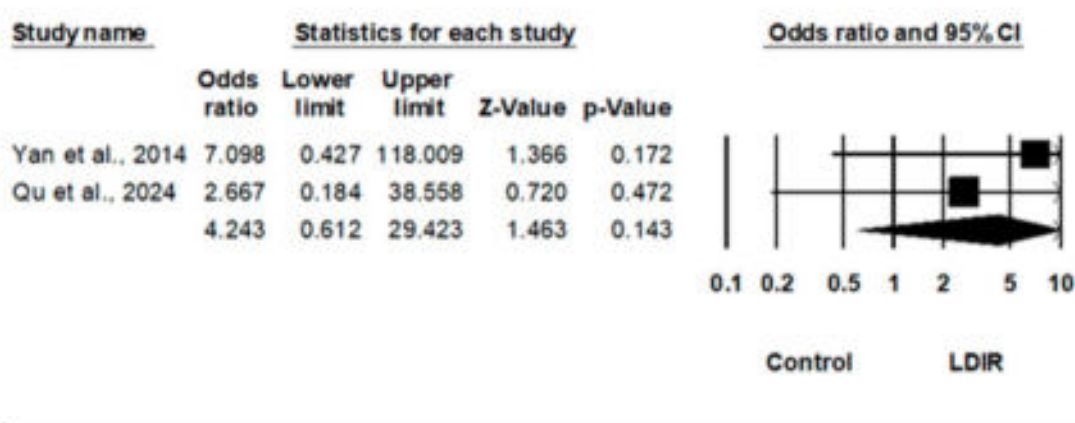


Figure 7. Forest plot comparing cardiac disease progression between LDIR-exposed group and control group [14,16].

In summary, the meta-analysis confirms the increased mortality and further progression of cardiac diseases in patients exposed to LDIR. The studies suggesting a positive impact of low-dose ionizing radiation (LDIR) on reducing mortality and slowing disease progression represent observational trends only and lack statistical significance. These observed effects may be attributable to various uncontrolled risk factors to which the study population may have been exposed and which were not accounted for in the published analyses. These findings, therefore, speak to the multifaceted effects of LDIR on cardiovascular health, and this study's conclusions call for more research to elucidate these effects.

## 4. Discussion

The findings of the present meta-analysis offer a systematic assessment of the effects of low-dose ionizing radiation (LDIR) on cardiovascular outcomes based on the analysis of eight heterogeneous studies. The areas of concern were overall mortality, the evolution of cardiac diseases, and the forms of cardiovascular diseases that are characteristic for groups exposed to LDIR. The findings reinforce the multifaceted and context-dependent nature of LDIR's influence on cardiovascular outcomes.

### 4.1. Enhanced Mortality Rate in LDIR-Exposed Groups

The meta-analysis of the mortality rates in five identified studies showed a rise in mortality among LDIR-exposed people. Kreuzer et al. (2015) [12] and Howe et al. (2004) [9] described especially high event rates based on which LDIR exposure in occupational settings such as nuclear power industries and uranium mining may increase mortality risks. These results are in concordance with prior studies which have shown that any amount of ionizing radiation is dangerous for human health in the long run.

However, when comparing the mortality in LDIR-exposed groups with control groups, as observed by Yan et al. (2014) [14] and Qu et al. (2024) [16], there was an indication of decreased mortality in the LDIR groups. Despite the fact that these results were not statistically significant, the findings suggest that there may be a hormetic dose–response curve where exposure to low levels of radiation may stimulate protective biological responses and decrease mortality rates. This difference therefore calls for further research in order to establish under what circumstances LDIR is useful and when it is detrimental.

#### 4.2. Cardiac Disease Progression

The rates of advancement of cardiac disease were also analyzed, and the results suggested that LDIR could significantly enhance the advancement of the diseases. Ivanov et al. (2006) [10] and Kreuzer et al. (2006, 2015) [11,12] observed further worsening of the cardiac ailments including ischemic heart disease and general cardiovascular diseases. These findings are in accordance with other studies that indicate that radiation could worsen the existing cardiovascular diseases due to increased oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction.

Notably, when the comparison of the development of cardiac disease between LDIR-exposed groups and control groups was made, the results suggested a possible decrease in disease progression rates in the LDIR groups, as indicated in Yan et al. (2014) and Qu et al. (2024) [14,16]. These findings were not statistically significant; however, they indicate that LDIR could have a dual effect on cardiovascular health depending on the circumstances.

#### 4.3. Types of Cardiac Diseases

The examination of certain diseases which are characteristic of the LDIR-exposed groups showed certain relations with arteriosclerotic heart disease, ischemic heart disease, and atherosclerosis. Howe et al. (2004) [9], Ivanov et al. (2006) [10], and Zielinski et al. (2009) [15] discussed all these relations and the fact that LDIR has diverse effects on the cardiovascular system. Thus, the mechanistic knowledge from Little et al. (2009) [13] and the experimental data by Qu et al. (2024) [16] extend the hypothesis that LDIR might affect the course of some CVDs through biological mechanisms related to inflammation and immune regulation.

#### 4.4. Implications for Public Health and Future Research

Based on the results of this meta-analysis, there are several implications for public health especially for those who are exposed to LDIR in workplaces and clinics. The results of increased mortality and progression of heart disease among the population exposed to LDIR suggest the possibility of more rigorous monitoring of radiation doses and provide a starting point for future periodic follow-up studies among affected individuals to better understand the molecular mechanisms in the future. Moreover, the evidence of hormesis obtained in some investigations implies that low levels of radiation can be helpful and further research regarding this phenomenon is needed.

The studies analyzed in this meta-analysis exhibit substantial differences across several dimensions, including the characteristics of the study populations (e.g., nuclear industry employees or uranium miners), the levels of radiation exposure, and the types of outcomes assessed. Future studies could benefit from comparing LDIR with other well-known cardiovascular risk factors, such as smoking or hypertension, to better understand its relative impact. Moreover, examining long-term outcomes in varied populations, particularly those with pre-existing cardiovascular conditions, could clarify if LDIR's effects vary depending on an individual's baseline health.

There is a need for large sample studies in which the doses of radiation are measured accurately, and the potential confounding factors are properly controlled. Studying the mechanisms through which LDIR influences cardiovascular health at the molecular and cellular level will be important for designing interventions and protective measures. Con-

sequently, further investigations regarding the circumstances in which LDIR may act as a protective factor could pave the way for new strategies in the treatment of CVDs.

## 5. Conclusions

This meta-analysis offers a systematic review of the cardiovascular impact of low-dose ionizing radiation to establish a link with raised mortality and the progression of cardiac diseases. Although there are some hints that LDIR may develop hormetic effects, these discoveries are not statistically verified and should be researched more. The discrepancies of the effects of LDIR on cardiovascular health are highlighted and stress the importance of strict radiation safety precautions and further investigations. In this way, the care of endangered groups and the definition of adequate measures to prevent negative impacts of ionizing radiation on human health can be provided.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.P.; data curation, M.P. and P.O.; investigation, M.P.; methodology, M.P.; project administration, M.P., P.O., T.Z. and M.L.; software, M.P.; supervision, K.J.F.; visualization, M.P.; writing—original draft, M.P.; writing—review and editing, M.P., P.O., T.Z., M.L. and K.J.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Cuttler, J.M. Application of low doses of ionizing radiation in medical therapies. *Dose-Response* **2020**, *18*, 1559325819895739. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Hurlbert, M.; Condor, J.; Landrie-Parker, D.; Shasko, L. People do not have high levels of knowledge of low dose ionizing radiation (LDIR). *J. Environ. Radioact.* **2024**, *271*, 107311. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Vaiserman, A.; Cuttler, J.M.; Socol, Y. Low-dose ionizing radiation as a hormetin: Experimental observations and therapeutic perspective for age-related disorders. *Biogerontology* **2021**, *22*, 145–164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Panera, N.; Camisa, V.; Brugaletta, R.; Vinci, M.R.; Santoro, A.; Coscia, E.; Pastore, A.; Cannatà, V.; Gobba, F.; Modenese, A.; et al. Blood cell gene expression profiles: A narrative review of biomarkers and effects of low-dose ionizing radiation exposure. *J. Health Soc. Sci.* **2021**, *6*, 349–366.
5. Peters, C.E.; Quinn, E.K.; Rodriguez-Villamizar, L.A.; MacDonald, H.; Villeneuve, P.J. Exposure to low-dose radiation in occupational settings and ischaemic heart disease: A systematic review and meta-analysis. *Occup. Environ. Med.* **2023**, *80*, 706–714. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Lau, Y.S.; Chew, M.T.; Alqahtani, A.; Jones, B.; Hill, M.A.; Nisbet, A.; Bradley, D.A. Low dose ionising radiation-induced hormesis: Therapeutic implications to human health. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 8909. [\[CrossRef\]](#)
7. Paithankar, J.G.; Gupta, S.C.; Sharma, A. Therapeutic potential of low dose ionizing radiation against cancer, dementia, and diabetes: Evidences from epidemiological, clinical, and preclinical studies. *Mol. Biol. Rep.* **2023**, *50*, 2823–2834. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Dawood, A.; Mothersill, C.; Seymour, C. Low dose ionizing radiation and the immune response: What is the role of non-targeted effects? *Int. J. Radiat. Biol.* **2021**, *97*, 1368–1382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Howe, G.R.; Zablotska, L.B.; Fix, J.J.; Egel, J.; Buchanan, J. Analysis of the mortality experience amongst US nuclear power industry workers after chronic low-dose exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.* **2004**, *162*, 517–526. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Ivanov, V.K.; Maksimov, M.A.; Chekin, S.Y.; Petrov, A.V.; Biryukov, A.P.; Kruglova, Z.G.; Matyash, V.A.; Tsyb, A.F.; Manton, K.G.; Kravchenko, J.S. The risk of radiation-induced cerebrovascular disease in Chernobyl emergency workers. *Health Phys.* **2006**, *90*, 199–207. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Kreuzer, M.; Kreisheimer, M.; Kandel, M.; Schnelzer, M.; Tschense, A.; Grosche, B.J.R. Mortality from cardiovascular diseases in the German uranium miners cohort study, 1946–1998. *Radiat. Environ. Biophys.* **2006**, *45*, 159–166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Kreuzer, M.; Auvinen, A.; Cardis, E.; Hall, J.; Jourdain, J.-R.; Laurier, D.; Little, M.P.; Peters, A.; Raj, K.; Russell, N.S. Low-dose ionising radiation and cardiovascular diseases—Strategies for molecular epidemiological studies in Europe. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2015**, *764*, 90–100. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Little, M.P.; Gola, A.; Tzoulaki, I. A model of cardiovascular disease giving a plausible mechanism for the effect of fractionated low-dose ionizing radiation exposure. *PLoS Comput. Biol.* **2009**, *5*, e1000539. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Yan, X.; Sasi, S.P.; Gee, H.; Lee, J.; Yang, Y.; Mehrzad, R.; Onufrak, J.; Song, J.; Enderling, H.; Agarwal, A.; et al. Cardiovascular risks associated with low dose ionizing particle radiation. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e110269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

15. Zielinski, J.M.; Ashmore, P.J.; Band, P.R.; Jiang, H.; Shilnikova, N.S.; Tait, V.K.; Krewski, D. Low dose ionizing radiation exposure and cardiovascular disease mortality: Cohort study based on Canadian national dose registry of radiation workers. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* **2009**, *22*, 27–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Qu, S.; Qiu, X.; Liu, J.; Feng, R.; Wang, Y.; Dong, X.; Jin, Y.; Liu, X. Reparative effects after low-dose radiation exposure: Inhibition of atherosclerosis by reducing NETs release. *Sci. Total. Environ.* **2024**, *947*, 174540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Mateusz Pociągiciel, Piotr Opyd,  
Aleksandra Langowska, Michał Lis

# **Possible positive impact of low-doses of ionizing radiation (LDIR) in the occupational exposure of health care workers**

*Folia Cardiologica 2024*

# Possible positive impact of low-doses of ionizing radiation (LDIR) in the occupational exposure of health care workers

Potencjalnie pozytywny wpływ niskich dawek promieniowania jonizującego (LDIR) na pracowników ochrony zdrowia

Mateusz Pociągiewski<sup>1</sup>, Piotr Opyd<sup>1</sup>, Aleksandra Langowska<sup>1</sup>, Michał Lis<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Clinical Department of Internal Medicine, Endocrinology, Diabetology, and Nephrology, Czerniakowski Hospital, Warsaw, Poland

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, Lazarski University, Warsaw, Poland

## Abstract

From a historical perspective, diseases other than cancer have not been recognized as a health risk associated with low doses of ionizing radiation. Nonetheless, it is currently clear that high doses of ionizing radiation can cause cardiovascular disease, and recent epidemiological studies indicate an increased risk of non-oncological diseases even at lower radiation doses than formerly considered. The following review aims to present the most distinctive studies and data concerning the risk of low-dose radiation in occupationally exposed individuals, as well as the potential health benefits. Fifty-four articles selected from databases were examined. The results indicate a complex picture of the relationship between radiation exposure and disease, and the possible positive effects. It should be emphasized that while some publications demonstrate beneficial effects of exposure to ionizing radiation on health, they also emphasize the need for comprehensive and detailed studies. This would allow a complete understanding of the relationship in question.

Keywords: ionizing radiation, radiation hormesis, occupational exposure, low-dose ionizing radiation

Folia Cardiologica 2024; 19: 283–292

## Introduction

Ionizing radiation (IR) plays an extremely significant role today, with people constantly exposed to it through the environment, work, medical applications, and other sources [1]. Although this radiation has shown high efficacy in terms of both treating and diagnosing various diseases in patients, one cannot underestimate the effects of occupational exposure to medical personnel, including cataracts, cardiovascular disease, and last but not least, cancer. Although

most hospital personnel exposed to LDIR (low-dose ionizing radiation) remain within the limits established by ICRP (International Commission on Radiological Protection), the use of high-dose techniques has been a matter of concern in recent decades. It is noteworthy that the occupational risks of these individuals are not only limited to the time they perform their duties but may also affect future generations due to IR exposure, as supported by available evidence [2, 3].

Even though the effects of HDIR (high dose ionizing radiation) are already clearly established, ambiguities

Address for correspondence: Mateusz Pociągiewski, Clinical Department of Internal Medicine, Endocrinology, Diabetology, and Nephrology, Czerniakowski Hospital, Stepilska 19/25, 00-739 Warsaw, Poland, e-mail: mateusz.pociągiewski@op.pl

Received: 08.07.2024

Accepted: 05.09.2024

Early publication date: 25.11.2024

This article is available in open access under Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

remain [4]. Biological responses to LDIR depend on various psychical factors, such as the following [5, 6]:

- total absorbed radiation dose,
- nature of radiation exposure (acute versus chronic),
- the distribution of radiation sources,
- dimensions of biological targets.
- Ionizing radiation induces single- and double-stranded DNA breaks and genome instability [7].

Although most of these changes are usually rapidly diagnosed and repaired by cellular mechanisms, a few remain evident at later stages of the cell cycle. Studies also indicate that after radiation, in order to adapt and maintain cell survival, different pathways are activated at different time periods [8].

To be more specific, as early as a few hours after the onset of radiation, ROS (reactive oxygen species) neutralizing factors are activated, while signaling pathways pursue the process of apoptosis. In contrast, within a few days, activation of DNA repair pathways is observed, and after a few weeks, an immune response develops [9]. It is worth noting, however, that LDIR can lead to a reduction in terms of the damage to the genome of human lymphocytes caused by previous higher doses. This phenomenon constitutes an excellent example of an "adaptive response", which is often referred to as a potential mechanism for stimulating specific protective functions [10].

Infrared interacts with specific molecules inside the cell, including water molecules. This interaction has a direct nature [11]. As a result, most of the infrared energy is consumed in the process of releasing electrons from the water molecule. The result of this process includes ROSs containing hydroxyl radicals (OH<sup>•</sup>), which are characterized by high reactivity. If these radicals are formed in the vicinity of biological molecules, they potentially cause immediate oxidative damage [12]. As a result of chain reactions and the generation of destructive free radicals, so-called oxidative stress occurs, which causes a variety of damage [13]. Despite this, antioxidants represent a significant defense system against the effects of oxidative stress, contributing to the removal of RFTs both indirectly and directly [14]. After the occurrence of oxidative stress due to the effects of IR, ROS (reactive oxygen species) are generated and free radicals are released. This process may result in DNA damage. In addition to this indirect effect, there may also be changes in the physiology of mitochondria, which are the center of oxidative metabolism. Ultimately, this can lead to increased genome instability in cells exposed to radiation [15, 16].

Among the protective measures against ROS, one may distinguish the following:

- antioxidant molecules (glutathione – GSH),
- antioxidant defense enzymes (catalase – CAT, superoxide dismutase – SOD).

Generally, a balance exists between ROS and antioxidants. However, the lack of this balance may result from disease or long-term exposure to ionizing radiation, which leads to oxidative stress. Chronic oxidative stress itself can cause DNA damage, which in turn is a contributing factor to numerous diseases, such as cancer [17]. The subject literature has proposed several hypotheses describing the mechanisms of the adaptive response to low doses of ionizing radiation, including the following [18]:

- stimulation of the immune system,
- acceleration of detecting and repairing DNA damage,
- increase in antioxidant levels.

During the first half of the past century, an increase in concern in the context of occupational exposure was observed. This was contributed to by research findings published during this period. As a result, special emphasis began to be placed on establishing restrictions that both ensure overall health protection and prevent undesirable effects [19]. Importantly, according to the recommendations of the ICRP, the annual dose limit amounts to 50 mSv. In contrast, the dose averaged over 5-year periods is 20 mSv [20].

The harmful effects of LDIR are particularly dangerous among hospital workers, which are continuously exposed to it [21]. In studies conducted to date, the effects of this chronic radiation have been measured by various methods, including the following examples [22, 23]:

- CBMN (cytokinesis-blocking micronucleus) tests,
- comet assays,
- PPC (premature chromosome condensation),
- hematological and biochemical parameters,
- assessment of chromosomal abnormalities (dicentric, ring, translocation).

Although each of these methods is applicable nowadays, the most reliable and sensitive is currently considered to be the CBMN test, which is particularly useful at low doses of radiation.

## Methods

Following the guidelines for preferred literature sources and meta-analyses, a carefully considered literature review was conducted. The process began in January 2024 when, to comprehensively review the available knowledge, a computerized literature search was applied using reputable databases such as:

- Scopus,
- PubMed,
- Google Scholar,
- Embase.

This included articles published in English but did not limit the time range of publication. The literature search was based on carefully selected key phrases, including:

- “radiation”,
- “ionizing radiation”,
- “medical personnel”,
- “radiation protection”.

The articles that were qualified for analysis met specific inclusion criteria, namely, studies published in English, focused on the positive effects of low doses of radiation, using ionizing radiation, and both experimental and clinical studies with full texts available. Meanwhile, the analysis excluded conference abstract, simulation studies, review articles, case reports, letters, editorials, unpublished data, and articles in languages other than English. This rigorous literature selection process allowed for the inclusion of only the most relevant and valuable sources in the context of the topic under study.

## Results

### The impact of radiation on DNA alteration

First, attention is given to the effect of radiation on DNA alteration. It should be noted that ionizing radiation can induce modifications in the methylation pattern of DNA (deoxyribonucleic acid), and oxidative damage caused by this type of radiation can further affect the methylation status of DNA. Nevertheless, the effects of low doses of ionizing radiation, such as those occurring in the workplace, on DNA methylation are still the subject of much controversy.

Studying of the relationship between occupational radiation exposure and changes in DNA methylation, Chen et al. [24] conducted an assessment with the goal of identifying a possible link between radiation-induced oxidative damage and DNA methylation modification. Subsequently, the relationship between workplace radiation levels, DNA methylation status, and oxidative damage in interventional medical practitioners was examined. The participants in the study included 117 interventional physicians as well as 117 individuals who comprised the control group.

The researchers assessed global DNA methylation levels in peripheral blood leukocytes, as well as expression levels of Dnmts (DNA methyltransferase) and Hcy (homocysteine) in serum. This allowed an accurate assessment of the state of DNA methylation in the bodies of study participants. In addition, measurements of 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) and 4-HNE (4-hydroxynonenal) were used as indicators of oxidative damage [24]. Analysis of the relevance of multiple indicators has provided insight into the potential relationship between occupational radiation exposure, changes in DNA methylation, and oxidative damage in interventional physicians. It was found that the expression levels of Dnmts, 4-HNE, and 8-OHdG were significantly higher in interventional physicians compared to the control group. However, there was no statistical difference in terms of the rate of total DNA methylation and Hcy expression between the 2 groups. The overall cumulative

equivalent personal dose of the intervention physicians was positively correlated with the expression levels of Dnmts, 8-OHdG, and 4-HNE.

It is noteworthy that the expression levels of 8-OHdG in interventional physicians exhibited a negative correlation with global DNA methylation levels while showing a positive correlation with Hcy expression levels. Ultimately, the results of the study suggest that occupational radiation exposure of interventional physicians affects the expression of DNA methylation-related enzymes, with the simultaneous effect of radiation-induced oxidative damage on DNA methylation. Nonetheless, the authors did not show conclusive evidence linking the dose of occupational exposure to the observed changes in DNA methylation, which highlights the need for further research to understand the differences between the effects of radiation exposure and oxidative damage [24].

### The impact of radiation on cardiovascular incidence

Equally relevant is the effect of radiation on the incidence of cardiovascular disease. This phenomenon was analyzed by Cha et al. The authors conducted a study to understand the relationship between exposure to low doses of external occupational radiation and the risk of cardiovascular disease among workers involved in diagnostic radiotherapy [25]. A population of 11,500 workers associated with diagnostic radiation therapy was correlated with data from the National Dosimetry Registry as well as data from the National Health Insurance Service. The analysis included RR (relative risk) calculations for examining the correlation between occupational factors and cardiovascular morbidity, as well as determining excess relative risk per 100 milligrams (ERR/100 mGy). This was aimed at quantifying the relationship between radiation dose and response [25].

In total, during 93,696 person-years of follow-up, there were 2270 cases of cardiovascular disease, with a mean follow-up period of 8.1 years [25]. The risk factor values for hypertension were significantly higher in individuals starting work before 2000 compared to workers who started work in 2005 or thereafter. Of note, the ERR/100 mGy for total cardiovascular disease amounted to 0.14 (95% CI: -0.57 – -0.99). The risk of irradiation for cerebrovascular disease and ischemic heart disease increased slightly for estimates of individual cumulative cardiac doses (ERR/100 mGy = 3.10 [-0.75–11.59] and 1.22 [-0.71–4.73], respectively) [25].

Nevertheless, ERR estimates were generally more positive in female workers compared to male workers. Analogous results were noted for younger workers compared to those over 50 years old. Although this study provided limited evidence to support a positive relationship between occupational radiation exposure and overall cardiovascular disease risk over a short follow-up period among radiation

medical workers in South Korea [25], it is still necessary to further monitor the significantly elevated RR for the first-time exposure in the earlier period, as well as the elevated ERR in female workers and younger workers.

### The impact of radiation on early atherosclerosis

When analyzing the results of available studies, it is also crucial to consider the effect of radiation on the early occurrence of atherosclerosis. A study in this regard was performed in 1993 by Tomei et al. The researchers conducted an analysis of 145 physicians who were subjected to occupational exposure to ionizing radiation. For this purpose, they used capillary microscopy. The study showed a clear relationship between this exposure and damage to the cutaneous microcirculation. Only 20.7% of individuals in the exposed group exhibited correct capillaroscopic images, in contrast to 91.5% in the control group. The relative risk ratio for capillaroscopic damage in exposed subjects amounted to 0.23 (95% CI: 0.16–0.31). An interesting aspect is the lack of noticeable differences between medical specialties. The findings of this study underscore the significant correlation that exists between occupational exposure and capillaroscopic abnormalities, including subtle gender-related differences [26].

On the other hand, the study by Andreassi et al. focused on the relationship between exposure to low doses of ionizing radiation and damage to the endothelium, with a particular focus on the risk of developing atherosclerosis. As part of the study, all participants were invited to undergo various assessments, including:

- genetic evaluation,
- measurement of CIMT (carotid intima-media thickness),
- analysis of peripheral blood in the context of telomere length.

CIMT analyses were performed on a total of 171 cardiac laboratory staff and 156 non-radiation subjects. The personnel were divided into 2 groups, including a low-exposure group ( $n = 80$ ) and a high-exposure group ( $n = 91$ ). This division was based on medial occupational radiation exposure. As a result, it was observed that the high-exposure group exhibited a significant increase in CIMT values compared to the low-exposure workers. In addition, radiation-exposed workers also showed significant telomere shortening. The present evidence can be considered highly relevant to the issues of accelerated vascular aging and early development of atherosclerosis [27].

Another study was conducted by Manenti et al. [28]. According to their review, the effect of long-term exposure to low-dose radiation on the increased risk of cardiovascular disease is a fundamental issue. Although observational epidemiological studies conducted in communities of radiation therapy workers in different countries are still

prone to bias, the data they provided can be considered convincing. In view of this, since the influence of other risk factors related to the environment, lifestyle, and personal risk factors may exceed the risk of cardiovascular disease caused by low-dose radiation exposure, the statistical significance of an epidemiological study constitutes a vital element [28].

### The impact of radiation on immune expression of medical radiologists

Another subject of analysis is the effect of radiation on immunologic expression among medical radiologists. These issues were addressed by Wang et al., who focused on examining the expression of CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) and TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3) in peripheral blood T cells of medical radiologists [29]. Altogether, the study included 100 medical radiologists. The control group, on the other hand, consisted of 107 healthy men. For the purpose of the study, flow cytometry was used to analyze CTLA-4 and TIM-3 expression in CD4+ and CD8+ lymphocytes. It was found that the expression levels of CTLA and TIM-3 in CD4+ T cells of irradiated workers were lower than those of healthy individuals from the control group ( $p < 0.05$ ). Correlation analysis clearly indicated that CD8+CTLA-4 expression levels were significantly positively correlated with individual cumulative dose ( $r_s = 0.60$ ,  $p = 0.001$ ,  $< 0.05$ ). Conversely, the expression level of CD8+TIM-3 was negatively correlated ( $r_s = -0.180$ ,  $p = 0.027$ ,  $< 0.05$ ) [29].

The presented findings suggest that the exposure to low doses of radiation affects CTLA-4 and TIM-3 expression in human peripheral blood T cells. Further research on the effects of radiation on immune expression should focus on an in-depth understanding of the mechanisms that lead to changes in terms of CTLA-4 and TIM-3 expression due to exposition to low doses of radiation [29].

### The impact of radiation on protein synthesis

Furthermore, it is necessary to discuss the effect that radiation has on protein (mRNA) synthesis, which is one of the most energetically demanding cellular functions. This process is tightly regulated and integrated with a variety of signaling pathways, both upward and downward, dependent on a wide range of trans proteins and cis mRNA elements. Under conditions of stress, and therefore, exposure to ionizing radiation, regulatory mechanisms transform protein synthesis. This aims to translate mRNAs encoding proteins that are significant for the proper functioning of the cellular response. It is also worth noting that beneficial responses to low doses of radiation, referred to as radiation hormesis, have been described in particular models. Nevertheless,

the molecular mechanisms that direct this phenomenon remain as yet not entirely described.

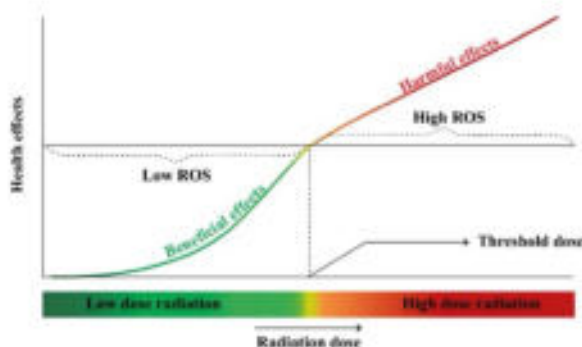
An independent study was conducted by Kabilan et al. [30]. The authors investigated how variations in cellular responses to high- and low-dose ionizing radiation are implemented as a result of modulation of molecular pathways, with attention paid to the regulation of mRNA translation control. The researchers proved that the incompatible transcriptional and translational profiles of cells exposed to infrared radiation strongly suggest that translational control serves as a guardian. More specifically, it guarantees homeostatic flexibility in the synthesis of a repertoire of proteins necessary for an adequate cellular response. Such a reaction with its scope includes repairing damage and stabilizing the genome, constituting a mechanism of adaptation to environmental stress, which is essential for basic functions of life. Mild stress generated by low doses of infrared radiation, often occurring in the environment, at work as well as during medical procedures, probably activates these protective mechanisms. As a result, it causes beneficial biological effects known as radiation hormesis. Experimentally, this phenomenon has been observed in various models and clinical endpoints. Analogous results have been reported using phenotypic indicators such as genome stability, anti-tumor immunity, and life expectancy.

In the light of the above, one may distinguish 4 distinct categories of evidence that support the hypothesis regarding the role of translational control in terms of radiation hormesis. Firstly, experimental studies have directly demonstrated that blocking *de novo* protein synthesis with small-molecule inhibitors interrupts the hormesis effect in irradiated cells. Secondly, detailed molecular analysis from studies concerning high-dose radiation highlight the importance of translational control in those contexts. A third piece of evidence is derived from the significant overlap and mutual interaction of the translational machinery with molecular factors in DNA damage signalling, suggesting close connections with radiation hormesis. Finally, the ancient translational machinery that evolved under the influence of constant background radiation for centuries implies its role in the expression of the radiation hormesis phenotype [30].

In the same context, it is also worth examining the experiments conducted by Tang and Loke. Studies by these authors indicate that mutations in ATM (ataxia-telangiectasia), MAPK (mitogen-activated protein kinase), ERK (extracellular signal-related kinase), JNK (phospho-c-Jun NH(2)-terminal kinase), and P53 (signal transduction pathway-related protein 53) may play a major role in low-dose radiation-induced hormesis. In addition, MAPK and P53 may be pivotal in the context of adaptive response, whereas ATM, COX-2 (cyclooxygenase-2), JNK, ERK, P53, and ROS (reactive oxygen species) are potentially connected with radioresistance. Furthermore, COX-2, MAPK, ROS,

ERK, and TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor receptor alpha) are in turn involved in the witness effect induced by low doses of radiation. In contrast, signal transduction pathways connected with ATM, MAPK, ERK, ROS, TNF $\alpha$ , and P53 are known to be involved in genomic instability induced by low doses of radiation. The results achieved by Tang and Loke clearly indicate that different aspects of the cellular response to low doses of radiation may be regulated by distinct signal transduction pathways. However, there is also the possibility that different responses to low doses of radiation may use the same signal transmission pathways. A prime example is P53, which is involved in hormesis, genomic instability, radioresistance, and adaptive response. Thus, current data indicate the need for caution in designing therapies that use low doses of radiation to achieve beneficial effects in humans [31].

Another study on the effects of radiation on protein synthesis was conducted by Mousavikia et al. The study included 20 individuals who, due to their occupation, were exposed to low doses of ionizing radiation (through the use of computed tomography and angiography), along with their corresponding control groups. For the purpose of studying the long-term effects of irradiation on medical workers, the incidence of MN (micronuclei) as well as the activity of antioxidants such as SOD (superoxide dismutase), TAC (total antioxidant capacity), and CAT (catalase) were assessed. Subsequently, in the context of evaluating adaptation to high provocative doses, all groups were subjected to *in vitro* irradiation, and the frequency of MN was compared. Finally, to examine the effect of high doses of ionizing radiation after exposure to both acute and chronic low dose, the authors compared the incidence of MN in 2 groups: the control group, which was irradiated *in vitro* (acute low dose + high dose), and radiation therapy workers (chronic low dose + high dose) [32]. It was observed that there was a significant increase in the incidence of MN in the occupationally exposed group ( $n = 30$ ) compared to the control group ( $p < 0.0001$ ). Nevertheless, chronic irradiation of medical workers did not cause an adaptive S response. However, it should be noted that such an effect may have been induced by acute, low doses ( $p < 0.05$ ). In addition, the activity levels of antioxidant enzymes such as SOD, TAC, and CAT did not differ statistically significantly between medical workers and the control group ( $p > 0.05$ ) [32]. The authors of the study in question also noted that exposure to low doses of ionizing radiation results in increased damage to cytogenetics. On the other hand, it does not provoke an adaptive response or improve antioxidant capacity among medical workers. The control of occupational exposure of health care workers represents the first step toward improving their health and the quality of patient care. Undoubtedly, in the long term, this may contribute to reducing both human and economic expenses.



**Figure 1.** Schematic illustration of exposure to ionizing radiation and associated health effects. Low-dose radiation, below an established limit, exhibits beneficial effects, in contrast to high-dose radiation, above an established limit, which is associated with negative consequences [33]

### Potential positive impact of low-dose irradiation

The increasing popularity of diagnostic and therapeutic techniques based on ionizing radiation has been associated with the growing prevalence of chronic diseases among patients and medical personnel. However, the impact of chronic effects of IR radiation varies and depends on numerous factors, such as:

- intensity of radiation exposure,
- dose of radiation,
- duration of exposure to radiation.

The possible relationship between LDIR (*low-dose ionizing radiation*) and potentially high risk is a subject of controversy. This is largely caused by the limited number of direct human studies [33]. Research on the effects of LDIR undoubtedly shows significant public health relevance, considering the prevalence of exposure to this radiation background. It is assumed that data from epidemiological and clinical reports, as well as the results of preclinical studies, can clarify controversial points and contribute to the understanding of potential health risks associated with the exposure to LDIR. A growing amount of available literature in this field points to potential benefits, such as reduced cancer risk, reduced cancer-related deaths, reduced nervous system damage, improved nerve function, and reduced complications associated with diabetes after LDIR exposure. A schematic representation of exposure to ionizing radiation and its associated health effects is presented in the figure 1.

In addition, there have been evolutionarily conservative changes observed in stress response signaling pathways in response to LDIR. Nevertheless, the pattern of molecular signaling pathways in response to LDIR is unclear. Moreover, there is limited information available on biomarkers

of epidemiological LDIR exposure, or none are available. For this reason, it has been suggested that epidemiological, clinical, and preclinical studies be conducted on the beneficial effects induced by LDIR in the context of chronic diseases, such as cancer, diabetes, and dementia, and their associated molecular mechanisms [34]. Understanding the mechanisms of response to LDIR may provide the foundation for developing LDIR-based therapies to stop the progression of disease. Modulation of these signaling pathways may prove beneficial toward developing radiation resistance among humans. Nevertheless, follow-up clinical studies are necessary, supported by additional data from biochemical, cellular, and molecular studies, as well as an analysis of the side effects associated with LDIR.

It should be highlighted that the phenomenon in which beneficial effects occur in response to mild stress after exposure to harmful agents at low doses is referred to as hormesis [35]. Introducing initial treatment with lower doses of a harmful agent can act as a preventive measure, counteracting the negative effect of later exposure to higher doses. Contrary to that, direct exposure to high doses without prior preparation can be harmful. Although research in this area may be controversial, it cannot be ignored because it may provide guidance on the potential use of LDIR in disease therapy.

Hormesis, which provides beneficial effects in response to low-dose LDIR, is a phenomenon commonly used in fields such as [36]:

- toxicology,
- medicine,
- pharmacy,
- radiation biology.

The results of several studies confirm the hermetic effects of LDIR, including increasing the longevity of organisms [37, 38], reducing cancer metastasis [39, 40], alleviating ovarian cancer [41] and reducing cancer-related mortality [42–44]. Additionally, improvements in neuronal function among patients with neurological disorders [45, 46], improvements in patients with type II diabetes [47] and beneficial effects on health of patients with severe and critical COVID-19 [48] have been reported.

In preclinical studies, various cellular and molecular pathways participating in LDIR-induced hormesis have been identified in models of various diseases [49–51]. Hormetic responses result in the activation of cellular protection mechanisms that counteract molecular damage through microRNA synthesis, regulation of gene expression, and epigenetic modifications via MEK-ERK1/2, MSK1, and Elk-1 signaling pathways [52]. Furthermore, the researchers observed an increase in the effectiveness of the DNA repair system and an increase of antioxidant levels through modulated Nrf2 signaling [53, 54]. What is more, activation of autophagy pathways is an extremely important part of removing the effects of damage [54]. Additionally,

the hormesis induced by LDIR results in the synthesis of neurotrophic factors which promote neuronal growth and survival, protecting them through improved angiogenesis, axonal growth, and neuroregeneration [49]. Finally, the authors observed metabolic changes such as improvements in terms of lipid profile and insulin sensitivity [50]. The presented studies highlight the potential benefits of using LDIR to treat various diseases, but this requires further clinical as well as preclinical studies.

In his study, Tedesco reported that interventional cardiologists exhibit a cellular response that is designed to neutralize radiation-induced oxidative damage [55]. It appears that *in vitro*  $\gamma$ -irradiation in the range of 220–440 mGy reduced erythrocyte hemolysis induced by hypochlorous acid by 40%. This protective response to  $\gamma$ -irradiation resulted in erythrocytes becoming more resistant to oxidative damage induced by hypochlorous acid occurring 3 hours after irradiation. The biochemical changes in both glutathione synthesis and turnover accompanying the described effect may be relevant in the development of new guidelines for individuals occupationally exposed to radiation. As a result of the protection activated by  $\gamma$ -radiation, erythrocytes became more resistant to oxidative damage induced by hypochlorous acid, which appeared 3 hours after irradiation. These biochemical changes in the process of synthesis and turnover of glutathione indicate a general biochemical remodeling caused by  $\gamma$ -radiation exposure. This process may be relevant to the development of novel guidelines concerning individuals that are occupationally exposed to radiation [55].

## Discussion

Over the past few decades, clinical and experimental studies have unambiguously confirmed that exposure to low-dose ionizing radiation can produce hormetic effects. There is evidence to suggest that initial exposure to LDIR can have beneficial effects on the efficacy of conventional treatments for cancer, dementia, and diabetes [56, 57].

Nevertheless, it is necessary to develop clear guidelines related to the practical application of LDIR in therapy. Until now, there have been a limited number of clinical studies

on the effects of LDIR on the treatment of patients with dementia and diabetes [45, 47], indicating the need for more, similar studies to explore the following topic more broadly.

Due to the increasing number of cases of cancer, dementia, and diabetes, conducting further clinical trials is highly important, while taking appropriate precautions in order to minimize differences between clinical and experimental data. At the same time, there is a need to take into account the potential side effects associated with LDIR exposure when designing therapeutic procedures based on this method. Modern engineering tools that enable precise delivery of radiation doses can help minimize this risk. Recent studies suggest that modifications of exposure techniques can reduce the risks associated with LDIR without negatively affecting the quality of analyses [58]. As a result, new non-invasive treatments based on LDIR demonstrate significant potential as far as the issues of improving the quality of health care and patients' lives, and lowering the costs of therapy are concerned.

## Additional information

### Author contribution

MP – conceptualization, investigation, data curation, writing (original draft, review & editing); PO – writing (review & editing); AL – writing (review & editing); ML – writing (review & editing)

### Acknowledgments

I am grateful to Dr. Michał Lis for his continuous support and feedback throughout the entire process of preparing the publication. I would also like to thank my colleagues, Piotr Opyd, Aleksandra Langowska and Michał Lis, for their valuable input and suggestions. I am also grateful to the institution Czernikowski Hospital in Warsaw for providing the necessary resources to carry out this research project

### Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests

### Funding

None

## Streszczenie

Dotychczasowo przyjęty liniowy model skutków promieniowania jonizującego (LNT, *Linear No-Threshold*) warunkuje, że choroby inne niż nowotwory nie były uznawane za ryzyko zdrowotne związane z niskimi dawkami promieniowania jonizującego. Niemniej jednak obecnie jest jasne, że wysokie dawki promieniowania jonizującego mogą powodować choroby układu krążenia, a ostatnie badania epidemiologiczne wskazują na zwiększone ryzyko wystąpienia chorób nieonkologicznych nawet przy niższych dawkach promieniowania niż wcześniej uważano. Poniższy przegląd ma na celu przedstawienie najbardziej charakterystycznych badań i danych dotyczących ryzyka związanego z ekspozycją na promieniowanie jonizujące w zakresie niskich dawek u osób narażonych zawodowo, a także potencjalnych korzyści zdrowotnych wynikających z takiego narażenia. Przeanalizowano pięćdziesiąt cztery artykuły wybrane z baz danych. Wyniki wskazują na złożoną zależność między narażeniem na promieniowanie a chorobą, oraz możliwe pozytywne skutki takiej ekspozycji. Należy podkreślić, że podczas gdy niektóre publikacje wykazują korzystne skutki narażenia na promieniowanie jonizujące na zdrowie, podkreślają również potrzebę kompleksowych i szczegółowych dalszych badań dotyczących takiego wpływu.

Słowa kluczowe: promieniowanie jonizujące, hormeza radiacyjna, narażenie zawodowe, niskie dawki promieniowania jonizującego

Folia Cardiologica 2024; 19: 283–292

## References

1. Zhang Ye, Rohde LH, Emami K, et al. Suppressed expression of non-DSB repair genes inhibits gamma-radiation-induced cytogenetic repair and cell cycle arrest. *DNA Repair (Amst)*. 2008; 7(11): 1835–1845, doi: 10.1016/j.dnarep.2008.07.009, indexed in Pubmed: 18703189.
2. Møller AP, Mousseau TA. Strong effects of ionizing radiation from Chernobyl on mutation rates. *Sci Rep*. 2015; 5: 8363, doi: 10.1038/srep08363, indexed in Pubmed: 25666381.
3. Omar-Nazir L, Shi X, Møller A, et al. Long-term effects of ionizing radiation after the Chernobyl accident: possible contribution of historic dose. *Environ Res*. 2018; 165: 55–62, doi: 10.1016/j.envres.2018.04.005, indexed in Pubmed: 29665465.
4. Feinendegen LE, Brooks AL, Morgan WF. Biological consequences and health risks of low-level exposure to ionizing radiation: commentary on the workshop. *Health Phys*. 2011; 100(3): 247–259, doi: 10.1097/HP.0b013e31820a83ae, indexed in Pubmed: 21285724.
5. Howell RW. Physical considerations for understanding responses of biological systems to low doses of ionizing radiation: nucleosome clutches constitute a heterogeneous distribution of target volumes. *Health Phys*. 2016; 110(3): 283–286, doi: 10.1097/HP.0000000000000467, indexed in Pubmed: 26808884.
6. Caplin N, Willey N. Ionizing radiation, higher plants, and radioprotection: from acute high doses to chronic low doses. *Front Plant Sci*. 2018; 9: 847, doi: 10.3389/fpls.2018.00847, indexed in Pubmed: 29997637.
7. Mavragani IV, Nikitaki Z, Souli MP, et al. Complex DNA damage: a route to radiation-induced genomic instability and carcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2017; 9(7): 91, doi: 10.3390/cancers9070091, indexed in Pubmed: 28718836.
8. Nikitaki Z, Mavragani IV, Laskaridou DA, et al. Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: a new 'old' paradigm of how the bystanders and distant can become the players. *Semin Cancer Biol*. 2016; 37-38: 77–95, doi: 10.1016/j.semcancer.2016.02.002, indexed in Pubmed: 26873647.
9. Xiao C, He N, Liu Y, et al. Research progress on biosimeters of ionizing radiation damage. *Radiation Medicine and Protection*. 2020; 1(3): 127–132, doi: 10.1016/j.radmp.2020.06.002.
10. Russo GL, Tedesco I, Russo M, et al. Cellular adaptive response to chronic radiation exposure in interventional cardiologists. *Eur Heart J*. 2012; 33(3): 408–414, doi: 10.1093/eurheartj/ehr263, indexed in Pubmed: 21862464.
11. Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett*. 2012; 327(1-2): 48–60, doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.012, indexed in Pubmed: 22182453.
12. Caër SLe. Water radiolysis: influence of oxide surfaces on H<sub>2</sub> production under ionizing radiation. *Water*. 2011; 3(1): 235–253, doi: 10.3390/w3010235.
13. Datta K, Suman S, Kallakury BVS, et al. Exposure to heavy ion radiation induces persistent oxidative stress in mouse intestine. *PLoS One*. 2012; 7(8): e42224, doi: 10.1371/journal.pone.0042224, indexed in Pubmed: 22936963.
14. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem*. 2015; 97: 55–74, doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040, indexed in Pubmed: 25942353.
15. Cooke MS, Evans MD, Dizdarevic M, et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. 2003; 17(10): 1195–1214, doi: 10.1096/fj.02-0752rev, indexed in Pubmed: 12832285.
16. Bonora M, Missiroli S, Perrone M, et al. Mitochondrial control of genomic instability in cancer. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(8): 1914, doi: 10.3390/cancers13081914, indexed in Pubmed: 33921106.
17. Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018; 13: 757–772, doi: 10.2147/CIA.S158513, indexed in Pubmed: 29731617.
18. Guéguen Y, Bontemps A, Ebrahimian TG. Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci*. 2019; 76(7): 1255–1273, doi: 10.1007/s00018-018-2987-5, indexed in Pubmed: 30535789.

19. Ogata H. A review of some epidemiological studies on cancer risk from low-dose radiation or other carcinogenic agents. *Radiat Prot Dosimetry*. 2011; 146(1-3): 268–271, doi: [10.1093/rpd/nrc187](https://doi.org/10.1093/rpd/nrc187), indexed in Pubmed: [21715412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21715412/).
20. Radiation and your patient: a guide for medical practitioners. *Ann ICRP*. 2001; 31(4): 5–31, indexed in Pubmed: [12685757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12685757/).
21. Mettler FA, Huda W, Yoshizumi TT, et al. Effective doses in radiology and diagnostic nuclear medicine: a catalog. *Radiology*. 2008; 248(1): 254–263, doi: [10.1148/radiol.2481071451](https://doi.org/10.1148/radiol.2481071451), indexed in Pubmed: [18566177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18566177/).
22. Anderson RM. Cytogenetic biomarkers of radiation exposure. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2019; 31(5): 311–318, doi: [10.1016/j.clon.2019.02.009](https://doi.org/10.1016/j.clon.2019.02.009), indexed in Pubmed: [30914149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30914149/).
23. Singh Z. Comet assay as a sensitive technique in occupational health studies; a literature review. *Journal of Occupational Health and Epidemiology*. 2018; 7(4): 240–245, doi: [10.29252/johe.7.4.240](https://doi.org/10.29252/johe.7.4.240).
24. Chen B, Dai Q, Zhang Q, et al. The relationship among occupational irradiation, DNA methylation status, and oxidative damage in interventional physicians. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98(39): e17373, doi: [10.1097/MD.00000000000017373](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017373), indexed in Pubmed: [31574886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31574886/).
25. Cha ES, Zablotska LB, Bang YeJ, et al. Occupational radiation exposure and morbidity of circulatory disease among diagnostic medical radiation workers in South Korea. *Occup Environ Med*. 2020; 77(11): 752–760, doi: [10.1136/oemed-2019-106326](https://doi.org/10.1136/oemed-2019-106326), indexed in Pubmed: [32606019](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32606019/).
26. Tomei F, Papaleo B, Fantini S, et al. Vascular effects of occupational exposure to low-dose ionizing radiation. *American Journal of Industrial Medicine*. 1996; 30(1): 72–77, doi: [10.1002/\(sici\)1097-0274\(199607\)30:1<72::aid-ajim12>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0274(199607)30:1<72::aid-ajim12>3.0.co;2-5).
27. Andreassi MG, Piccaluga E, Gargani L, et al. Subclinical carotid atherosclerosis and early vascular aging from long-term low-dose ionizing radiation exposure: a genetic, telomere, and vascular ultrasound study in cardiac catheterization laboratory staff. *JACC Cardiovasc Interv*. 2015; 8(4): 616–627, doi: [10.1016/j.jcin.2014.12.233](https://doi.org/10.1016/j.jcin.2014.12.233), indexed in Pubmed: [25907089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25907089/).
28. Manenti G, Coppeta L, Kirev IV, et al. Low-Dose occupational exposure to ionizing radiation and cardiovascular effects: a narrative review. *Healthcare (Basel)*. 2024; 12(2), doi: [10.3390/healthcare12020238](https://doi.org/10.3390/healthcare12020238), indexed in Pubmed: [38255124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38255124/).
29. Wang C, Hao C, Dai K, et al. Occupational low-dose radiation affects the expression of immune checkpoint of medical radiologists. *Int J Environ Res Public Health*. 2022; 19(12): 7105, doi: [10.3390/ijerph19127105](https://doi.org/10.3390/ijerph19127105), indexed in Pubmed: [35742351](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35742351/).
30. Kabilan U, Graber TE, Alain T, et al. Ionizing radiation and translation control: a link to radiation hormesis? *Int J Mol Sci*. 2020; 21(18): 6650, doi: [10.3390/ijms21186650](https://doi.org/10.3390/ijms21186650), indexed in Pubmed: [32932812](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32932812/).
31. Tang FRu, Loke WK. Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability. *Int J Radiat Biol*. 2015; 91(1): 13–27, doi: [10.3109/09553002.2014.937510](https://doi.org/10.3109/09553002.2014.937510), indexed in Pubmed: [24975555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24975555/).
32. Mousavikia SN, Bahreini Toossi MT, Khademi S, et al. Evaluation of micronuclei and antioxidant status in hospital radiation workers occupationally exposed to low-dose ionizing radiation. *BMC Health Serv Res*. 2023; 23(1): 540, doi: [10.1186/s12913-023-09516-2](https://doi.org/10.1186/s12913-023-09516-2), indexed in Pubmed: [37226157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37226157/).
33. Palthanikar JG, Gupta SC, Sharma A. Therapeutic potential of low dose ionizing radiation against cancer, dementia, and diabetes: evidences from epidemiological, clinical, and preclinical studies. *Mol Biol Rep*. 2023; 50(3): 2823–2834, doi: [10.1007/s11033-022-08211-5](https://doi.org/10.1007/s11033-022-08211-5), indexed in Pubmed: [36595119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36595119/).
34. Scott BR. Radiation-hormesis phenotypes, the related mechanisms and implications for disease prevention and therapy. *J Cell Commun Signal*. 2014; 8(4): 341–352, doi: [10.1007/s12079-014-0250-x](https://doi.org/10.1007/s12079-014-0250-x), indexed in Pubmed: [25324149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25324149/).
35. Calabrese EJ. Hormesis: path and progression to significance. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(10): 2871, doi: [10.3390/ijms19102871](https://doi.org/10.3390/ijms19102871), indexed in Pubmed: [30248927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30248927/).
36. Calabrese EJ, Iavicoli I, Calabrese V. Hormesis: why it is important to biogerontologists. *Biogerontology*. 2012; 13(3): 215–235, doi: [10.1007/s10522-012-9374-7](https://doi.org/10.1007/s10522-012-9374-7), indexed in Pubmed: [22270337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22270337/).
37. Caraterra A, Courtade M, Bonnet L, et al. Effect of a continuous gamma irradiation at a very low dose on the life span of mice. *Gerontology*. 1998; 44(5): 272–276, doi: [10.1159/000022024](https://doi.org/10.1159/000022024), indexed in Pubmed: [9693258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9693258/).
38. López-Martínez G, Hahn DA. Early life hormetic treatments decrease irradiation-induced oxidative damage, increase longevity, and enhance sexual performance during old age in the Caribbean fruit fly. *PLoS One*. 2014; 9(1): e88128, doi: [10.1371/journal.pone.0088128](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088128), indexed in Pubmed: [24498251](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24498251/).
39. Cheda A, Wrembel-Wargocka J, Lisiak E, et al. Single low doses of X rays inhibit the development of experimental tumor metastases and trigger the activities of NK cells in mice. *Radiat Res*. 2004; 161(3): 335–340, doi: [10.1667/rn3123](https://doi.org/10.1667/rn3123), indexed in Pubmed: [14982480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14982480/).
40. Nowosielska EM, Cheda A, Pociągaj M, et al. Effects of a unique combination of the whole-body low dose radiotherapy with inactivation of two immune checkpoints and/or a heat shock protein on the transplantable lung cancer in mice. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(12): 6309, doi: [10.3390/ijms22126309](https://doi.org/10.3390/ijms22126309), indexed in Pubmed: [34208396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34208396/).
41. Lehrer S, Green S, Rosenzweig KE. Reduced ovarian cancer incidence in women exposed to low dose ionizing background radiation or radiation to the ovaries after treatment for breast cancer or rectosigmoid cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016; 17(6): 2979–2982, indexed in Pubmed: [27356721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27356721/).
42. Doss M. Evidence supporting radiation hormesis in atomic bomb survivor cancer mortality data. *Dose Response*. 2012; 10(4): 584–592, doi: [10.2203/dose-response.12-023.Doss](https://doi.org/10.2203/dose-response.12-023.Doss), indexed in Pubmed: [23304106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23304106/).
43. Hart J. Cancer mortality for a single race in low versus high elevation counties in the u.s. *Dose Response*. 2011; 9(3): 348–355, doi: [10.2203/dose-response.10-014.Hart](https://doi.org/10.2203/dose-response.10-014.Hart), indexed in Pubmed: [22013397](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22013397/).
44. Janiak MK, Pociągaj M, Welsh JS. Time to rejuvenate ultra-low dose whole-body radiotherapy of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021; 160: 103286, doi: [10.1016/j.critrevonc.2021.103286](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103286), indexed in Pubmed: [33667656](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33667656/).
45. Cuttler JM, Moore ER, Hosfeld VD, et al. Treatment of alzheimer disease with CT scans: a case report. *Dose Response*. 2016; 14(2), doi: [10.1177/1559325816640073](https://doi.org/10.1177/1559325816640073), indexed in Pubmed: [27103883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27103883/).
46. Cuttler JM, Moore ER, Hosfeld VD, et al. Second update on a patient with Alzheimer disease treated by CT scans. *Dose Response*. 2018; 16(1), doi: [10.1177/1559325818756461](https://doi.org/10.1177/1559325818756461), indexed in Pubmed: [29479296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29479296/).
47. Kojima S, Cuttler JM, Shimura N, et al. Radon therapy for autoimmune diseases pemphigus and diabetes: 2 case reports. *Dose Response*. 2019; 17(2), doi: [10.1177/1559325819850984](https://doi.org/10.1177/1559325819850984), indexed in Pubmed: [31191185](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31191185/).

48. Dhawan G, Kapoor R, Dhawan R, et al. Low dose radiation therapy as a potential life saving treatment for COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Radiother Oncol.* 2020; 147: 212–216, doi: [10.1016/j.radonc.2020.05.002](https://doi.org/10.1016/j.radonc.2020.05.002), indexed in Pubmed: 32437820.
49. Jiang Bo, Zhang Y, Zhao J, et al. Effects of localized x-ray irradiation on peripheral nerve regeneration in transected sciatic nerve in rats. *Radiat Res.* 2017; 188(4): 455–462, doi: [10.1667/RR14799.1](https://doi.org/10.1667/RR14799.1), indexed in Pubmed: 28796579.
50. Shao M, Lu X, Cong W, et al. Multiple low-dose radiation prevents type 2 diabetes-induced renal damage through attenuation of dyslipidemia and insulin resistance and subsequent renal inflammation and oxidative stress. *PLoS One.* 2014; 9(3): e92574, doi: [10.1371/journal.pone.0092574](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092574), indexed in Pubmed: 24651118.
51. Tsukimoto M, Nakatsukasa H, Sugawara K, et al. Repeated 0.5-Gy gamma irradiation attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis with up-regulation of regulatory T cells and suppression of IL17 production. *Radiat Res.* 2008; 170(4): 429–436, doi: [10.1667/r11352.1](https://doi.org/10.1667/r11352.1), indexed in Pubmed: 19024649.
52. Mifsud KR, Gutiérrez-Mecinas M, Trollope AF, et al. Epigenetic mechanisms in stress and adaptation. *Brain Behav Immun.* 2011; 25(7): 1305–1315, doi: [10.1016/j.bbi.2011.06.005](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.06.005), indexed in Pubmed: 21704151.
53. Latimer JJ, Alhamed A, Sveiven S, et al. Preliminary evidence for a hormetic effect on DNA nucleotide excision repair in veterans with gulf war illness. *Mil Med.* 2020; 185(1-2): e47–e52, doi: [10.1093/milmed/usz177](https://doi.org/10.1093/milmed/usz177), indexed in Pubmed: 31334811.
54. Chen Ni, Wu L, Yuan H, et al. ROS/Autophagy/Nrf2 Pathway Mediated Low-Dose Radiation Induced Radio-Resistance in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cell. *Int J Biol Sci.* 2015; 11(7): 833–844, doi: [10.7150/ijbs.10584](https://doi.org/10.7150/ijbs.10584), indexed in Pubmed: 26078725.
55. Tedesco I, Spagnuolo C, Russo M, et al. Protective effect of γ-irradiation against hypochlorous acid-induced haemolysis in human erythrocytes. *Dose Response.* 2012; 11(3): 401–412, doi: [10.2203/dose-response.12-025.Tedesco](https://doi.org/10.2203/dose-response.12-025.Tedesco), indexed in Pubmed: 23983667.
56. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019; 144(8): 1941–1953, doi: [10.1002/ijc.31937](https://doi.org/10.1002/ijc.31937), indexed in Pubmed: 30350310.
57. Kamran SC, Berrington de Gonzalez A, Ng A, et al. Therapeutic radiation and the potential risk of second malignancies. *Cancer.* 2016; 122(12): 1809–1821, doi: [10.1002/cncr.29841](https://doi.org/10.1002/cncr.29841), indexed in Pubmed: 26950597.
58. Luan FJ, Zhang J, Mak KC, et al. Low radiation x-rays: benefiting people globally by reducing cancer risks. *Int J Med Sci.* 2021; 18(1): 73–80, doi: [10.7150/ijms.48050](https://doi.org/10.7150/ijms.48050), indexed in Pubmed: 33390775.

## 8. Dyskusja

Kliniczne i eksperymentalne badania przeprowadzone w poprzednich dekadach jednoznacznie dowiodły, że ekspozycja na niskie dawki promieniowania jonizującego wywiera wieloaspektowy wpływ na zdrowie człowieka. LDIR okazało się potencjalnym czynnikiem wspomagającym tradycyjne metody leczenia chorób, takich jak nowotwory, demencja czy cukrzyca [153, 154]. Jednakże korzyści te należy rozważyć w kontekście zagrożeń, takich jak ryzyko sercowo-naczyniowe, zagrożenia zawodowe oraz możliwość wystąpienia działań niepożądanych. Nowoczesne technologie umożliwiają obecnie precyzyjne monitorowanie dawek promieniowania (dozymetria), co sugeruje możliwość ograniczenia ryzyka przy jednoczesnej maksymalizacji skuteczności terapeutycznej [155]. Biorąc pod uwagę stale rosnącą liczbę przypadków nowotworów, demencji i cukrzycy, dalsze badania kliniczne nad zastosowaniami terapeutycznymi LDIR powinny być priorytetem w celu zmniejszenia luki między badaniami eksperymentalnymi a danymi klinicznymi [69, 71].

Ryzyko długoterminowych skutków dla zdrowia, zwłaszcza w środowisku zawodowym, takim jak elektrownie jądrowe czy kopalnie uranu, budzi poważne obawy. Meta-analiza badań nad śmiertelnością, którą przeprowadziliśmy wykazała, że ryzyko zgonu było wyższe u osób narażonych na LDIR. Na przykład Kreuzer et al. (2015) oraz Howe et al. (2004) wykazali zwiększoną śmiertelność w tej grupie [44, 47]. Sugeruje to, że przewlekła ekspozycja zawodowa może być szkodliwa. Jednakże niezgodność wyników badań Yan et al. (2014) i Qu et al. (2024) wskazuje na możliwość hormetycznej odpowiedzi na LDIR, w której niższe dawki promieniowania mogą indukować korzystne procesy biologiczne, zmniejszając ryzyko śmiertelności [52, 54]. Ta dwoistość wskazuje, że ekspozycja na LDIR może stanowić wyzwanie wymagające dalszych badań w celu określenia bezpiecznych zakresów stosowania LDIR zarówno w warunkach zawodowych, jak i medycznych.

### 8.1. Ryzyko sercowo-naczyniowe związane z LDIR

Wpływ LDIR na układ sercowo-naczyniowy zależy od dawki, czasu trwania ekspozycji oraz indywidualnej podatności organizmu. Wyniki badań potwierdzają złożony

i sytuacyjnie zależny charakter wpływu LDIR na zdrowie sercowo-naczyniowe. Kolejny podrozdział omawia śmiertelność, progresję choroby oraz specyficzne zaburzenia, na które wpływa ekspozycja na LDIR.

#### **8.1.1. Zwiększona śmiertelność w grupach narażonych na LDIR**

Wybrane badania w tej dziedzinie wykazała zwiększoną śmiertelność we wszystkich grupach narażonych na LDIR. Kreuzer et al. (2015) [47] oraz Howe et al. (2004) [44] odnotowali szczególnie wysokie wskaźniki zdarzeń, sugerując, że ekspozycja na LDIR w środowisku zawodowym, np. w elektrowniach jądrowych lub kopalniach uranu, może być czynnikiem podwyższającym śmiertelność. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami wskazującymi, że wszystkie poziomy promieniowania jonizującego mogą mieć negatywny wpływ na zdrowie ludzkiej populacji w dłuższym okresie. Jednak w porównaniach śmiertelności między grupami narażonymi na LDIR a grupami kontrolnymi, Yan et al. (2014) [52] oraz Qu et al. (2024) [54] odnotowali możliwy spadek śmiertelności wśród osób eksponowanych na LDIR. Chociaż wyniki te nie były istotne statystycznie, mogą wskazywać na możliwość hormetycznej odpowiedzi na dawkę, w której niskie dawki promieniowania stymulują mechanizmy biologicznej ochrony, co skutkuje obniżeniem śmiertelności. Ta rozbieżność podkreśla konieczność dalszych badań w celu określenia warunków, w których LDIR może przynosić korzyści oraz sytuacji, w których może być szkodliwe.

#### **8.1.2. Progresja chorób serca**

Analiza wskaźników progresji chorób serca wykazała, że LDIR może znacząco przyspieszać rozwój tych schorzeń. Ivanov et al. (2006) [45] oraz Kreuzer et al. (2006, 2015) [46, 47] odnotowali pogorszenie stanu układu sercowo-naczyniowego, obejmujące zarówno chorobę niedokrwienną serca, jak i bardziej uogólnione formy schorzeń sercowo-naczyniowych. Najnowsze badania wydają się potwierdzać wnioski tych autorów dotyczące wpływu promieniowania na zaostrzenie istniejących stanów predysponujących do chorób sercowo-naczyniowych, co jest związane ze zwiększonym stresem oksydacyjnym, stanem zapalnym oraz dysfunkcją śródbłonna. Porównanie postępu chorób serca między grupami eksponowanymi na LDIR a grupami kontrolnymi

wskazało na potencjalne zmniejszenie tempa progresji choroby w grupach LDIR, jak zaobserwowali Yan i in. (2014) i Qu i in. (2024) [52, 54]. Wyniki te nie osiągnęły istotności statystycznej, jednak sugerują, że LDIR może wywierać podwójny wpływ na zdrowie układu sercowo-naczyniowego, zależnie od warunków ekspozycji.

### **8.1.3. Rodzaje chorób serca w kontekście LDIR**

Badania specyficznych schorzeń powszechnie występujących w populacjach narażonych na LDIR ujawniła pewne powiązania z miażdżycą, chorobą niedokrwienną serca oraz chorobą wieńcową. LDIR wywiera różnorodne skutki na układ sercowo-naczyniowy, co zostało omówione przez Howe i in. (2004) [44], Ivanov i in. (2006) [45] oraz Zielińskiego i in. (2009) [53]. W związku z tym koncepcja, że LDIR może wpływać na rozwój niektórych chorób sercowo-naczyniowych poprzez mechanizmy biologiczne związane ze stanem zapalnym i modulacją układu odpornościowego, znajduje dalsze potwierdzenie w wynikach eksperymentalnych przedstawionych przez Qu i in. (2024) [54] oraz w informacjach mechanistycznych podanych przez Little i in. (2009) [48].

## **8.2. Potencjał terapeutyczny TB-LDIR w leczeniu nowotworów**

Niskie dawki promieniowania jonizującego LDIR, szczególnie w postaci napromieniania całego ciała TB-LDIR, wykazała wyjątkowy potencjał w leczeniu nowotworów hematopoetycznych, takich jak chłoniak nieziarniczy (NHL). Zarówno historyczne, jak i współczesne badania kliniczne podkreślają jego skuteczność i bezpieczeństwo, przy odsetkach remisji często przekraczających 50–60%, a niekiedy nawet 90%. Co istotne, wyniki te były często osiąganym, gdy TB-LDIR stosowano jako jedyną lub początkową metodę leczenia. W porównaniu z chemioterapią, która jest obecnym standardem leczenia nowotworów uogólnionych, TB-LDIR oferuje istotne korzyści, w tym mniejszą toksyczność, szybsze zmniejszenie nacieku nowotworowego w narządach, lepszą tolerancję pacjentów oraz niższą zachorowalność [156-158]. Ponadto TB-LDIR wykazuje skuteczność u pacjentów z nawrotową lub oporną na leczenie chorobą, w przypadkach, gdy konwencjonalna chemioterapia okazała się nieskuteczna.

### **8.2.1. Profil bezpieczeństwa i działania niepożądane**

Stałym wynikiem obserwowanym w badaniach jest minimalna i akceptowalna ostra toksyczność związana z TB-LDIR. Większość badań klinicznych odnotowała jedynie przejściową, umiarkowaną trombocytopenię lub limfocytopenię, bez poważnych działań niepożądanych [92, 97, 120, 121, 123]. Powikłania długoterminowe, takie jak nowotwory wtórne, występują rzadko, gdy TB-LDIR stosowane jest jako samodzielna terapia. Przypadki wtórnej białaczki obserwowane w niektórych badaniach były głównie związane z wcześniejszą intensywną chemioterapią lub wysokodawkową radioterapią miejscową, a nie z samym TB-LDIR [132, 159]. Wyniki te wzmacniają pozytywny profil bezpieczeństwa TB-LDIR oraz jego potencjał w ograniczaniu długoterminowego ryzyka typowego dla konwencjonalnych metod leczenia nowotworów.

### **8.2.2. Optymalizacja dawki frakcyjnej dla maksymalnej skuteczności**

Sukces terapeutyczny TB-LDIR jest ściśle związany z precyzyjnymi protokołami frakcjonowania dawki promieniowania jonizującego. Dowody sugerują, że skumulowane dawki w zakresie 1–4 Gy, podawane we frakcjach 0,05–0,2 Gy na sesję, zapewniają optymalne wyniki [98, 99, 101]. Wczesna interwencja, zwłaszcza u pacjentów z NHL lub CLL, przynosiła lepsze rezultaty, co podkreśla znaczenie szybkiego wdrożenia leczenia [115, 116, 119]. Jednak wyniki w przypadku zaawansowanych nowotworów litych były mniej spójne, co prawdopodobnie wynika z ich wrodzonej oporności na leczenie oraz osłabionej odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza [94, 126].

### **8.2.3. Porównywalne zalety w stosunku do chemioterapii**

Badania porównawcze wykazały, że TB-LDIR przewyższa standardową chemioterapię pod wieloma względami. Wczesne doniesienia wskazywały, że pacjenci znacznie lepiej tolerowali TB-LDIR w porównaniu do leków chemioterapeutycznych, takich jak iperyt azotowy i trietylenomelamina, przy jednoczesnym mniejszym nasileniu skutków ubocznych [94]. Mniejsza toksyczność TB-LDIR sugeruje, że metoda ta może być szczególnie korzystna dla pacjentów w ciężkim stanie lub tych, którzy nie tolerują wysoce agresywnych schematów chemioterapii. Ponadto, działanie immunomodulujące TB-LDIR może dodatkowo stymulować naturalne mechanizmy obronne organizmu przeciwko

progresji nowotworu, zapewniając dodatkową przewagę terapeutyczną [91, 160]. Napromienianie promieniowaniem X lub  $\gamma$  w zakresie LDIR, zarówno jako terapia samodzielna, jak i leczenie wspomagające, wykazuje obiecujący potencjał przewyższający obecne metody leczenia nowotworów. Wskazuje ono na możliwość osiągnięcia długotrwałych remisji przy jednoczesnym minimalizowaniu poważnych działań niepożądanych (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Porównanie skutków ekspozycji na HDIR i LDIR.

| <b>Wysokie dawki promieniowania jonizującego (HDIR)</b>                     | <b>Niskie dawki promieniowania jonizującego (LDIR)</b>                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Powoduje śmierć prawidłowych komórek i uszkadza zdrowe tkanki               | Nie powoduje śmierci normalnych komórek i nie uszkadza zdrowych tkanek                                                                                                                                                                     |
| Może indukować stan zapalny                                                 | Hamuje przewlekły stan zapalny                                                                                                                                                                                                             |
| Może powodować supresję hematopoezy oraz odpowiedzi układu immunologicznego | Stymuluje wiele funkcji układu immunologicznego                                                                                                                                                                                            |
| Może powodować wtórne nowotwory                                             | Nie indukuje wtórnych nowotworów                                                                                                                                                                                                           |
| Może być wykorzystywane do celów terapeutycznych lokalnie                   | Napromienianie całego ciała może być terapią z wyboru w przypadku nowotworów układowych lub z przerzutami, jego działanie przeciwnowotworowe jest podobne lub lepsze niż w przypadku CT systemowej, przy jednocześnie niższej toksyczności |

## 9. Wnioski

### 9.1. Wnioski z przeprowadzonych badań własnych

Zgodnie z przedstawionymi publikacjami naukowymi włączonymi do prezentowanej dysertacji doktorskiej, wpływ niskich dawek promieniowania jonizującego na żywy organizm może wzbudzać wiele kontrowersji. Stanowi jednocześnie niezwykle fascynującą gałąź radiobiologii, w której jest jeszcze wiele niejednoznaczności. W mojej ocenie poznanie faktycznych mechanizmów stojących za interakcją promieniowania jonizującego z żywą komórką jest niezbędne do rozszerzenia aktualnych terapii w medycynie, odświeżenia naszego spojrzenia na ochronę radiologiczną, a także wykorzystanie w pełni potencjału promieniowania jonizującego – w kontekście pozytywnym i negatywnym. Bez zrozumienia fundamentalnych zasad stojących za zmianami regulacyjnymi komórki w środowisku promieniowania jonizującego, nie możemy w pełni świadomie stosować tego zjawiska fizycznego obecnego w wielu dziedzinach naszego życia. LDIR to czynnik, który towarzyszy nam nieustannie. Każdy z proponowanych przeze mnie wniosków zachęca do dalszego zaangażowania się to zagadnienie.

Odpowiadając na sformułowane w **Rozdziale 4.** cele ogólne i szczegółowe przedstawionej dysertacji, na podstawie przeprowadzonych badań, zaproponowano 5 wniosków dotyczących poszczególnych aspektów TB-LIDR poddawanych ocenie:

#### **1) Uzasadnienie kliniczne metody napromieniania całego ciała niskimi dawkami promieniowania jonizującego**

Nasza praca sugeruje, że TB-LDIR stanowi skuteczną, lecz zapomnianą metodę leczenia różnych typów nowotworów. W analizie przedstawiliśmy dowody na możliwość uzyskania remisji choroby rozrostowej przy niskim ryzyku działań niepożądanych, co uzasadniałoby potrzebę wznowienia klinicznych prac badawczych w tym zakresie.

#### **2) Eksperymentalne potwierdzenie skuteczności terapii niskimi dawkami promieniowania jonizującego w połączeniu z immunomodulacją w leczeniu raka płuca**

Badania eksperymentalne wykazały, że LDIR samo w sobie istotnie hamowało rozwój guza, natomiast połączenie terapii TB-LDIR z inhibitorami punktów kontrolnych (CTLA-4

i PD-1) lub inhibitorem białka szoku cieplnego (HSP90) przyniosło istotny efekt synergistyczny. Wyniki otwierają drogę do dalszych eksperymentów badawczych.

### **3) Niejednoznaczność wpływu niskich dawek promieniowania jonizującego na ryzyko sercowo-naczyniowe**

Wykonana przeze mnie meta-analiza wykazała zróżnicowane wnioski. Część badań sugeruje zwiększenie ryzyka sercowo-naczyniowe w warunkach ekspozycji na LDIR. Jednocześnie inne badania przedstawiają możliwy efekt pozytywny/ochronny LDIR. Wnioski wysunięte w przedstawionej analizie wskazują na konieczność indywidualnej oceny ryzyka i monitorowania osób narażonych na LDIR oraz szersze badania z uwzględnieniem czynników ryzyka innych niż promieniowanie jonizujące.

### **4) Złożony wpływ niskich dawek promieniowania jonizującego w grupie pracowników ochrony zdrowia**

Przygotowana publikacja ściśle nawiązuje i wzmacnia zaproponowane pozostałe wnioski – przedstawia dualistyczny radiobiologiczny charakter LDIR. Z jednej strony obserwowane są reakcje adaptacyjne i ochronne komórek, z drugiej – zwiększone ryzyko chorób sercowo-naczyniowych i uszkodzeń genetycznych. Podczas tej analizy również wskazano na potrzebę dalszych badań o zróżnicowanym kierunku, z uwzględnieniem czynników zakłócających obraz dyskutowanego zjawiska.

### **5) Zestawienie wszystkich otrzymanych wyników sugerujące potrzebę szeroko zakrojonych badań nad mechanizmem wpływu niskich dawek promieniowania jonizującego na żywy organizm**

Przedstawione badania i analizy zachęcają do głębokiej interdyscyplinarnej analizy zjawiska hormezy radiacyjnej i poznania molekularnych mechanizmów komórkowych w odpowiedzi na niskie dawki promieniowania jonizującego. To jak ważne jest zrozumienie natury tych obserwacji zostało rozwinięte w następnym podrozdziale (9.2.).

## 9.2. Perspektywy na przyszłość

Przeprowadzona analiza silnie sugeruje potrzebę wzmocnionego nadzoru i stosowania środków prewencyjnych (zgodnie z zadaniami ochrony radiologicznej) wśród osób pracujących w warunkach narażenia na niskie dawki promieniowania jonizującego. Wykazano, że przewlekła ekspozycja na LDIR wiąże się ze zwiększoną śmiertelnością oraz podwyższonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych, co wymaga długoterminowego monitorowania oraz regulacji zapewniających bezpieczeństwo pracownikom. Szczególnie istotne jest regularne monitorowanie zdrowia osób potencjalnie narażonych na promieniowanie, umożliwiające wczesne wykrywanie negatywnych skutków ekspozycji [156]. Ponadto porównanie wpływu LDIR z innymi czynnikami ryzyka, takimi jak palenie tytoniu czy nadciśnienie tętnicze, pozwoli lepiej ocenić jego wkład w pogorszenie stanu zdrowia. Dalsze badania nad mechanizmami molekularnymi, w tym stresem oksydacyjnym i uszkodzeniem śródbłonna, będą niezbędne do opracowania strategii terapeutycznych minimalizujących ryzyko, przy jednoczesnym zachowaniu korzyści wynikających z kontrolowanej ekspozycji na promieniowanie.

Wraz ze wzrostem dawki LDIR zwiększają się potencjalne zagrożenia dla zdrowia układu sercowo-naczyniowego. Niskie dawki, w zakresie potencjalnych efektów hormetycznych, mogą wiązać się z mniejszym ryzykiem progresji choroby sercowo-naczyniowej. Jednak różnorodność dostępnych dowodów wskazuje, że wpływ promieniowania może się znacznie różnić w zależności od poziomu ekspozycji, stanu zdrowia pacjenta i czynników ryzyka. Dalsze badania prospektywne są konieczne do zrozumienia mechanizmów, przez które LDIR wpływa na zdrowie sercowo-naczyniowe, co umożliwi określenie bezpiecznych wartości progowych oraz opracowanie strategii ochronnych. Lepsze poznanie dwukierunkowego wpływu LDIR na zdrowie sercowo-naczyniowe pozwoli na bardziej świadome wykorzystanie promieniowania w kontekście terapeutycznym, równoważąc potencjalne uszkodzenia serca z korzyściami klinicznymi.

Z perspektywy terapeutycznej TB-LDIR stało się realną alternatywą dla bardziej tradycyjnych metod leczenia, zwłaszcza w przypadku nowotworów hematologicznych, takich jak chłoniaki nieziarnicze. Badania kliniczne wykazały, że trwałe remisje osiągnęły u 50–60% pacjentów, a w niektórych przypadkach przekraczają 90%, nawet gdy TB-LDIR jest stosowane jako terapia początkowa lub jedyna [92, 97]. W przeciwieństwie do konwencjonalnej chemioterapii TB-LDIR oferuje wiele istotnych zalet, takich jak mniejsza

toksyczność, szybsza regresja nacieków nowotworowych oraz lepsza tolerancja leczenia przez pacjentów [157, 158]. Ponadto nie odnotowano istotnego ryzyka ostrej radiotoksyczności, a długoterminowe ryzyko nowotworów wtórnych jest znikome u pacjentów, którzy nie byli poddani chemioterapii wysokodawkowej, co dodatkowo wzmacnia jego profil bezpieczeństwa [123]. TB-LDIR okazało się również skuteczne w przypadku pacjentów z nawrotem choroby lub opornością na chemioterapię, co czyni je jeszcze bardziej obiecującą opcją terapeutyczną. Wstępne wyniki wskazują, że TB-LDIR może wzmacniać naturalną odporność przeciwnowotworową poprzez stymulację mechanizmów immunomodulujących, co odróżnia je od innych metod leczenia nowotworów [91, 160]. Jednakże łączenie TB-LDIR z innymi terapiami wymaga ostrożnych badań, ponieważ obecne dane nie wykazują znaczących synergistycznych korzyści [161, 162].

Długoterminowe badania obserwacyjne dotyczące ekspozycji na LDIR w warunkach zawodowych są niezbędne do określenia bezpiecznych progów ekspozycji i identyfikacji grup wysokiego ryzyka, co pomoże w kształtowaniu polityk i interwencji równoważących terapeutyczne zastosowanie promieniowania z bezpieczeństwem zawodowym. Dalsze badania nad układem sercowo-naczyniowym powinny skupić się na mechanizmach patofizjologicznych, które łączą LDIR z chorobami serca, w tym na potencjalnym działaniu hormetycznym. Badania porównawcze z innymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego pomogą lepiej osadzić wpływ promieniowania w kontekście całościowego ryzyka i opracować skuteczne strategie zapobiegawcze.

Przyszłe badania kliniczne nad TB-LDIR powinny koncentrować się na optymalizacji schematów frakcjonowania dawki, aby zwiększyć skuteczność i zminimalizować ryzyko. Podejście to może uwzględniać zaawansowane techniki diagnostyczne pozwalające na personalizację terapii w zależności od stadium choroby i indywidualnych czynników ryzyka pacjenta. Priorytetem powinno być także badanie potencjalnych połączeń TB-LDIR z immunoterapiami (immunomodulacja), szczepionkami przeciwnowotworowymi oraz radioterapią miejscową, ponieważ chociaż dotychczasowe dane wskazują na ograniczoną synergię, dobrze zaplanowane badania kliniczne mogą ujawnić kombinacje zwiększające skuteczność leczenia bez jednoczesnego wzrostu toksyczności terapii. Wreszcie, konieczne są szeroko zakrojone randomizowane badania kliniczne, aby określić skuteczność i bezpieczeństwo TB-LDIR jako strategii terapeutycznej. Badania te powinny

spełniać współczesne standardy etyczne i metodologiczne oraz dostarczyć informacji o mechanizmach molekularnych i immunologicznych odpowiedzialnych za efekty terapeutyczne TB-LDIR. Rozszerzenie zastosowania TB-LDIR poza nowotwory hematologiczne na inne nowotwory układowe może otworzyć nowe możliwości terapeutyczne. Połączenie TB-LDIR z istniejącymi terapiami, takimi jak chirurgia czy wysokodawkowa radioterapia celowana, może prowadzić do lepszych wyników leczenia, szczególnie gdy funkcja układu odpornościowego może zostać wykorzystana po resekcji guza.

Podsumowując, niniejsza analiza badawcza omówiła różne skutki ekspozycji na niskie dawki promieniowania jonizującego, podkreślając konieczność zrównoważonego podejścia obejmującego ochronę zdrowia pracowników, redukcję ryzyka sercowo-naczyniowego oraz wykorzystanie potencjału terapeutycznego TB-LDIR w medycynie. W przyszłości kluczowe będzie prowadzenie solidnych badań klinicznych oraz współpraca interdyscyplinarna, aby w pełni wykorzystać korzyści płynące z LDIR i TB-LDIR oraz bezpiecznie i skutecznie zintegrować je z praktyką onkologiczną i zdrowiem publicznym.

## Literatura

1. Marazziti, D., et al., *Neuropsychological testing in interventional cardiology staff after long-term exposure to ionizing radiation*. Journal of the International Neuropsychological Society, 2015. **21**(9): p. 670-676.
2. Chen, J., et al., *Cumulative exposure to ionizing radiation from diagnostic and therapeutic cardiac imaging procedures: a population-based analysis*. Journal of the American College of Cardiology, 2010. **56**(9): p. 702-711.
3. Tang, F.R. and K. Loganovsky, *Low dose or low dose rate ionizing radiation-induced health effect in the human*. Journal of environmental radioactivity, 2018. **192**: p. 32-47.
4. Doll, R. and R. Peto, *The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 1981. **66**(6): p. 1192-1308.
5. Sumner, D., *Low-level radiation—How dangerous is it?* Medicine and war, 1990. **6**(2): p. 112-119.
6. Sumner, D., *Health effects resulting from the Chernobyl accident*. Medicine, Conflict and Survival, 2007. **23**(1): p. 31-45.
7. Pastel, R.H., *Radiophobia: long-term psychological consequences of Chernobyl*. Military medicine, 2002. **167**(suppl\_1): p. 134-136.
8. Ainsbury, E., et al., *Radiation cataractogenesis: a review of recent studies*. Radiation research, 2009. **172**(1): p. 1-9.
9. Busby, C., et al., *The evidence of radiation effects in embryos and fetuses exposed to Chernobyl fallout and the question of dose response*. Medicine Conflict and Survival, 2009. **25**(1): p. 20-40.
10. Shah, D.J., R.K. Sachs, and D.J. Wilson, *Radiation-induced cancer: a modern view*. The British journal of radiology, 2012. **85**(1020): p. e1166-e1173.
11. Cuttler, J.M., *Application of Low Doses of Ionizing Radiation in Medical Therapies*. Dose-response : a publication of International Hormesis Society, 2020. **18**(1): p. 1559325819895739-1559325819895739.
12. Hurlbert, M., et al., *People do not have high levels of knowledge of low dose ionizing radiation (LDIR)*. Journal of Environmental Radioactivity, 2024. **271**: p. 107311.

13. Peters, C.E., et al., *Exposure to low-dose radiation in occupational settings and ischaemic heart disease: a systematic review and meta-analysis*. Occupational and environmental medicine, 2023. **80**(12): p. 706-714.
14. Lau, Y.S., et al., *Low Dose Ionising Radiation-Induced Hormesis: Therapeutic Implications to Human Health*. Applied Sciences, 2021. **11**(19): p. 8909.
15. Paithankar, J.G., S.C. Gupta, and A. Sharma, *Therapeutic potential of low dose ionizing radiation against cancer, dementia, and diabetes: evidences from epidemiological, clinical, and preclinical studies*. Molecular biology reports, 2023. **50**(3): p. 2823-2834.
16. Dawood, A., C. Mothersill, and C. Seymour, *Low dose ionizing radiation and the immune response: what is the role of non-targeted effects?* International Journal of Radiation Biology, 2021. **97**(10): p. 1368-1382.
17. Schaue, D., *A Century of Radiation Therapy and Adaptive Immunity*. Frontiers in immunology, 2017. **8**: p. 431-431.
18. Mothersill, C. and C. Seymour, *Implications for human and environmental health of low doses of ionising radiation*. Journal of Environmental Radioactivity, 2014. **133**: p. 5-9.
19. Russo, G.L., et al., *Cellular adaptive response to chronic radiation exposure in interventional cardiologists*. European heart journal, 2012. **33**(3): p. 408-414.
20. *Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation to the General Assembly*, in *United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR) Reports*. 2010, UN. p. 1-20.
21. Delaney, G., et al., *The role of radiotherapy in cancer treatment*. Cancer, 2005. **104**(6): p. 1129-1137.
22. Jaffray, D.A., *Image-guided radiotherapy: from current concept to future perspectives*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2012. **9**(12): p. 688-699.
23. Yaromina, A., M. Krause, and M. Baumann, *Individualization of cancer treatment from radiotherapy perspective*. Molecular oncology, 2012. **6**(2): p. 211-221.
24. Kimball, A.S. and T.J. Webb, *The roles of radiotherapy and immunotherapy for the treatment of lymphoma*. Molecular and cellular pharmacology, 2013. **5**(1): p. 27.
25. Ang, K.K., *Altered fractionation trials in head and neck cancer*. Seminars in Radiation Oncology, 1998. **8**(4): p. 230-236.

26. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nature Immunology, 2002. **3**(11): p. 991-998.
27. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The Three Es of Cancer Immunoediting*. Annual Review of Immunology, 2004. **22**(1): p. 329-360.
28. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-1570.
29. Janiak, M.K., et al., *Cancer immunotherapy: how low-level ionizing radiation can play a key role*. Cancer immunology, immunotherapy : CII, 2017. **66**(7): p. 819-832.
30. Griffin, R.J., et al., *Understanding High-Dose, Ultra-High Dose Rate, and Spatially Fractionated Radiation Therapy*. International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics, 2020. **107**(4): p. 766-778.
31. Yilmaz, M.T., A. Elmali, and G. Yazici, *Abscopal effect, from myth to reality: from radiation oncologists' perspective*. Cureus, 2019. **11**(1).
32. Gudowska, I., et al., *Radiation burden from secondary doses to patients undergoing radiation therapy with photons and light ions and radiation doses from imaging modalities*. Radiation protection dosimetry, 2014. **161**(1-4): p. 357-362.
33. Casey, D.L., et al., *Second cancer risk in childhood cancer survivors treated with intensity-modulated radiation therapy (IMRT)*. Pediatric Blood & Cancer, 2015. **62**(2): p. 311-316.
34. Ng, J. and I. Shuryak, *Minimizing second cancer risk following radiotherapy: current perspectives*. Cancer management and research, 2014: p. 1-11.
35. Tubiana, M., *Can we reduce the incidence of second primary malignancies occurring after radiotherapy? A critical review*. Radiotherapy and Oncology, 2009. **91**(1): p. 4-15.
36. Albrecht, H., et al., *Transcriptional response of ex vivo human skin to ionizing radiation: comparison between low-and high-dose effects*. Radiation research, 2012. **177**(1): p. 69-83.
37. Yu, H., et al., *Different responses of tumor and normal cells to low-dose radiation*. Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia, 2013. **17**(4): p. 356-362.
38. Yang, G., et al., *Low-dose radiation may be a novel approach to enhance the effectiveness of cancer therapeutics*. International journal of cancer, 2016. **139**(10): p. 2157-2168.

39. Bauer, G., *Low dose radiation and intercellular induction of apoptosis: potential implications for the control of oncogenesis*. International Journal of Radiation Biology, 2007. **83**(11-12): p. 873-888.
40. Scott, B.R., *Radiation-hormesis phenotypes, the related mechanisms and implications for disease prevention and therapy*. Journal of cell communication and signaling, 2014. **8**: p. 341-352.
41. Feinendegen, L.E., M. Pollycove, and R.D. Neumann, *Hormesis by Low Dose Radiation Effects: Low-Dose Cancer Risk Modeling Must Recognize Up-Regulation of Protection*, in *Medical Radiology*. 2012, Springer Berlin Heidelberg. p. 789-805.
42. Cui, J., et al., *Hormetic Response to Low-Dose Radiation: Focus on the Immune System and Its Clinical Implications*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(2): p. 280.
43. Cha, E.S., et al., *Occupational radiation exposure and morbidity of circulatory disease among diagnostic medical radiation workers in South Korea*. Occupational and environmental medicine, 2020. **77**(11): p. 752-760.
44. Howe, G.R., et al., *Analysis of the Mortality Experience amongst U.S. Nuclear Power Industry Workers after Chronic Low-Dose Exposure to Ionizing Radiation*. Radiation Research, 2004. **162**(5): p. 517-526.
45. Ivanov, V.K., et al., *THE RISK OF RADIATION-INDUCED CEREBROVASCULAR DISEASE IN CHERNOBYL EMERGENCY WORKERS*. Health Physics, 2006. **90**(3): p. 199-207.
46. Kreuzer, M., et al., *Mortality from cardiovascular diseases in the German uranium miners cohort study, 1946–1998*. Radiation and Environmental Biophysics, 2006. **45**(3): p. 159-166.
47. Kreuzer, M., et al., *Low-dose ionising radiation and cardiovascular diseases – Strategies for molecular epidemiological studies in Europe*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2015. **764**: p. 90-100.
48. Little, M.P., A. Gola, and I. Tzoulaki, *A model of cardiovascular disease giving a plausible mechanism for the effect of fractionated low-dose ionizing radiation exposure*. PLoS computational biology, 2009. **5**(10): p. e1000539-e1000539.
49. Tomei, F., et al., *Vascular effects of occupational exposure to low-dose ionizing radiation*. American journal of industrial medicine, 1996. **30**(1): p. 72-77.
50. Andreassi, M.G., et al., *Subclinical carotid atherosclerosis and early vascular aging from long-term low-dose ionizing radiation exposure: a genetic, telomere, and*

- vascular ultrasound study in cardiac catheterization laboratory staff. *JACC: Cardiovascular Interventions*, 2015. **8**(4): p. 616-627.
51. Manenti, G., et al. *Low-Dose Occupational Exposure to Ionizing Radiation and Cardiovascular Effects: A Narrative Review*. in *Healthcare*. 2024. MDPI.
  52. Yan, X., et al., *Cardiovascular risks associated with low dose ionizing particle radiation*. *PloS one*, 2014. **9**(10): p. e110269-e110269.
  53. Zielinski, J., et al., *Low dose ionizing radiation exposure and cardiovascular disease mortality: cohort study based on Canadian national dose registry of radiation workers*. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 2009. **22**(1).
  54. Qu, S., et al., *Reparative effects after low-dose radiation exposure: Inhibition of atherosclerosis by reducing NETs release*. *Science of The Total Environment*, 2024. **947**: p. 174540.
  55. Chen, B., et al., *The relationship among occupational irradiation, DNA methylation status, and oxidative damage in interventional physicians*. *Medicine*, 2019. **98**(39): p. e17373.
  56. Kabilan, U., et al., *Ionizing radiation and translation control: A link to radiation hormesis?* *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. **21**(18): p. 6650.
  57. Tang, F.R. and W.K. Loke, *Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability*. *International journal of radiation biology*, 2015. **91**(1): p. 13-27.
  58. Mousavikia, S., et al., *Evaluation of micronuclei and antioxidant status in hospital radiation workers occupationally exposed to low-dose ionizing radiation*. *BMC Health Services Research*, 2023. **23**(1): p. 540.
  59. Wang, C., et al., *Occupational Low-Dose Radiation Affects the Expression of Immune Checkpoint of Medical Radiologists*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022. **19**(12): p. 7105.
  60. Calabrese, E.J., *Hormesis: path and progression to significance*. *International journal of molecular sciences*, 2018. **19**(10): p. 2871.
  61. Caratero, A., et al., *Effect of a continuous gamma irradiation at a very low dose on the life span of mice*. *Gerontology*, 1998. **44**(5): p. 272-276.

62. López-Martínez, G. and D.A. Hahn, *Early life hormetic treatments decrease irradiation-induced oxidative damage, increase longevity, and enhance sexual performance during old age in the Caribbean fruit fly*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e88128.
63. Cheda, A., et al., *Single low doses of X rays inhibit the development of experimental tumor metastases and trigger the activities of NK cells in mice*. Radiation research, 2004. **161**(3): p. 335-340.
64. Nowosielska, E.M., et al., *Effects of a unique combination of the whole-body low dose radiotherapy with inactivation of two immune checkpoints and/or a heat shock protein on the transplantable lung cancer in mice*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(12): p. 6309.
65. Lehrer, S., S. Green, and K.E. Rosenzweig, *Reduced ovarian cancer incidence in women exposed to low dose ionizing background radiation or radiation to the ovaries after treatment for breast cancer or rectosigmoid cancer*. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 2016. **17**(6): p. 2979.
66. Doss, M., *Evidence supporting radiation hormesis in atomic bomb survivor cancer mortality data*. Dose-response, 2012. **10**(4): p. dose-response. 12-023. Doss.
67. Hart, J., *Cancer mortality for a single race in low versus high elevation counties in the US*. Dose-Response, 2011. **9**(3): p. dose-response. 10-014. Hart.
68. Janiak, M.K., M. Pocięgiel, and J.S. Welsh, *Time to rejuvenate ultra-low dose whole-body radiotherapy of cancer*. Critical reviews in oncology/hematology, 2021. **160**: p. 103286.
69. Cuttler, J.M., et al., *Treatment of Alzheimer disease with CT scans: a case report*. Dose-response, 2016. **14**(2): p. 1559325816640073.
70. Cuttler, J.M., et al., *Second Update on a Patient With Alzheimer Disease Treated by CT Scans*. Dose-response : a publication of International Hormesis Society, 2018. **16**(1): p. 1559325818756461-1559325818756461.
71. Kojima, S., et al., *Radon Therapy for Autoimmune Diseases Pemphigus and Diabetes: 2 Case Reports*. Dose-response : a publication of International Hormesis Society, 2019. **17**(2): p. 1559325819850984-1559325819850984.
72. Dhawan, G., et al., *Low dose radiation therapy as a potential life saving treatment for COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS)*. Radiotherapy and

- oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 2020. **147**: p. 212-216.
73. Jiang, B., et al., *Effects of Localized X-Ray Irradiation on Peripheral Nerve Regeneration in Transected Sciatic Nerve in Rats*. Radiation Research, 2017. **188**(4): p. 455-462.
  74. Tsukimoto, M., et al., *Repeated 0.5-Gy  $\gamma$  Irradiation Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Up-regulation of Regulatory T Cells and Suppression of IL17 Production*. Radiation Research, 2008. **170**(4): p. 429-436.
  75. Chaoul, H. and K. Lange, *Ueber lymphogranulomatose und ihre behandlung mit röntgenstrahlen*. Munchen. Med. Wochenschr, 1923. **70**: p. 725-727.
  76. Mifsud, K.R., et al., *Epigenetic mechanisms in stress and adaptation*. Brain, Behavior, and Immunity, 2011. **25**(7): p. 1305-1315.
  77. Latimer, J.J., et al., *Preliminary evidence for a hormetic effect on DNA nucleotide excision repair in Veterans with Gulf War illness*. Military medicine, 2020. **185**(1-2): p. e47-e52.
  78. Chen, N., et al., *ROS/Autophagy/Nrf2 Pathway Mediated Low-Dose Radiation Induced Radio-Resistance in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cell*. International journal of biological sciences, 2015. **11**(7): p. 833-844.
  79. Shao, M., et al., *Multiple low-dose radiation prevents type 2 diabetes-induced renal damage through attenuation of dyslipidemia and insulin resistance and subsequent renal inflammation and oxidative stress*. PloS one, 2014. **9**(3): p. e92574-e92574.
  80. Tedesco, I., et al., *Protective Effect of  $\gamma$ -Irradiation Against Hypochlorous Acid-Induced Haemolysis in Human Erythrocytes*. Dose-response : a publication of International Hormesis Society, 2012. **11**(3): p. 401-412.
  81. Dessauer, F., *Eine neue anordnung zur Röntgenbestrahlung*. Archiv für physikalische Medizin und medizinische Technik, 1905. **2**: p. 218-23.
  82. Teschendorf, W., *Über Bestrahlung des ganzen menschlichen Körpers bei Blutkrankheiten*. Strahlentherapie, 1927. **26**: p. 720-728.
  83. Schwarz, G., *Über die theoretischen und praktischen Grundlagen einer Lang-Schwach-Bestrahlungsmethode*. Strahlentherapie, 1930. **37**: p. 709.
  84. Frimann-Dahl, J. and R. Forsberg, *Xanthomatosis with defects in the cranial bones*. Acta Radiologica, 1931(3): p. 254-262.

85. Dale, T., *Eine Neue Methode Der Rontgenbehandlung Von Leukamie*. Acta Radiologica, 1931. **12**(3): p. 263-286.
86. Devois, A., *La téléroentgenthérapie totale du corps humain*. J. belge Radiol., 1931. **20**: p. 269.
87. Sgalitzer, M., *Praktische Anwendung der Röntgentotalbestrahlung bei Polycythämie und chronischen Leukämien*. Strahlentherapie, 1936. **56**: p. 341.
88. Heublein, A.C., *A Preliminary Report on Continuous Irradiation of the Entire Body*. Radiology, 1932. **18**(6): p. 1051-1062.
89. Medinger, F.G. and L.F. Craver, *Total body irradiation with review of cases*. Am. J. Roentgenol., 1942. **48**(Nov.): p. 651-671.
90. Osgood, E.E., A.J. Seaman, and H. Tivey, *Comparative survival times of x-ray treated versus P32 treated patients with chronic leukemias under the program of titrated, regularly spaced total-body irradiation*. Radiology, 1955. **64**(3): p. 373-381.
91. Del Regato, J.A., *TOTAL BODY IRRADIATION IN THE TREATMENT OF CHRONIC LYMPHOGENOUS LEUKEMIA*. American Journal of Roentgenology, 1974. **120**(3): p. 504-520.
92. Jacobs, M.L. and F.J. Marasso, *A Four-Year Experience with Total-Body Irradiation*. Radiology, 1965. **84**(3): p. 452-456.
93. Andrews, G.A., et al., *Summary of clinical total-body irradiation program*. Oak Ridge Institute of Nuclear Studies. 1962, Medical Division, Research Report for.
94. Loeffler, R.K., *Therapeutic use of fractionated total body and subtotal body irradiation*. Cancer, 1981. **47**(9): p. 2253-2258.
95. Qasim, M., *Total body irradiation in non-Hodgkin lymphoma*. Strahlentherapie, 1975. **149**(4): p. 364-367.
96. Qasim, M., *Total body irradiation as a primary therapy in non-Hodgkin lymphoma*. Clinical radiology, 1979. **30**(3): p. 287-289.
97. Lybeert, M., J. Meerwaldt, and W. Deneve, *Long-term results of low dose total body irradiation for advanced non-Hodgkin lymphoma*. International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics, 1987. **13**(8): p. 1167-1172.
98. van Dijk-Milatz, A., *Total-body irradiation in advanced lymphosarcoma*. The British Journal of Radiology, 1979. **52**(619): p. 568-570.
99. Dobbs, H.J., et al., *Total-body irradiation in advanced non-Hodgkin's lymphoma*. The British Journal of Radiology, 1981. **54**(646): p. 878-881.

100. Meerwaldt, J., et al., *Low-dose total body irradiation versus combination chemotherapy for lymphomas with follicular growth pattern*. International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics, 1991. **21**(5): p. 1167-1172.
101. Roncadin, M., et al., *Total body irradiation and prednimustine in chronic lymphocytic leukemia and low grade non-Hodgkin's lymphomas. A 9-year experience at a single institution*. Cancer, 1994. **74**(3): p. 978-984.
102. Richaud, P.M., et al., *Place of low-dose total body irradiation in the treatment of localized follicular non-Hodgkin's lymphoma: results of a pilot study*. International journal of radiation oncology, biology, physics, 1998. **40**(2): p. 387-390.
103. Jacobs, P. and H.S. King, *A randomized prospective comparison of chemotherapy to total body irradiation as initial treatment for the indolent lymphoproliferative diseases*. 1987.
104. Leimert, J.T., et al., *Total body irradiation and cyclophosphamide, vincristine, prednisone in the treatment of favorable prognosis non-Hodgkin's lymphomas*. International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics, 1979. **5**(9): p. 1479-1483.
105. Weick, J.K., et al., *The combined modality therapy of diffuse histology non-Hodgkin's lymphoma with cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, prednisone (CHOP) and total body irradiation*. International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics, 1983. **9**(8): p. 1205-1207.
106. Safwat, A., et al., *Tumour burden and interleukin-2 dose affect the interaction between low-dose total body irradiation and interleukin 2*. European Journal of Cancer, 2004. **40**(9): p. 1412-1417.
107. Bayoumi, Y. and A. Radwan, *Low Dose Total Body Irradiation for Relapsed Low Grade Non-Hodgkin's Lymphoma: Experience of National Cancer Institute, Cairo*. Journal of Cancer Therapy, 2015. **06**(01): p. 25-33.
108. Sakamoto, K., *Radiobiological basis for cancer therapy by total or half-body irradiation*. Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine, 2004. **2**(4): p. 15401420490900254.
109. Sakamoto, K., et al., *Fundamental and clinical studies on cancer control with total or upper half body irradiation*. The Journal of JASTRO, 1997. **9**(3): p. 161-175.

110. Kojima, S., et al., *Treatment of Cancer and Inflammation With Low-Dose Ionizing Radiation: Three Case Reports*. Dose-response : a publication of International Hormesis Society, 2017. **15**(1): p. 1559325817697531-1559325817697531.
111. Kojima, S., et al., *Radon Therapy Is Very Promising as a Primary or an Adjuvant Treatment for Different Types of Cancers: 4 Case Reports*. Dose-response : a publication of International Hormesis Society, 2019. **17**(2): p. 1559325819853163-1559325819853163.
112. Kojima, S., et al., *Present and Future Prospects of Radiation Therapy Using  $\alpha$ -Emitting Nuclides*. Dose-response : a publication of International Hormesis Society, 2018. **16**(1): p. 1559325817747387-1559325817747387.
113. Johnson, R., *Management of generalized malignant lymphomata with "systemic" radiotherapy*. The British Journal of cancer. Supplement, 1975. **2**: p. 450.
114. Johnson, R.E., *Total body irradiation of chronic lymphocytic leukemia: Incidence and duration of remission*. Cancer, 1970. **25**(3): p. 523-530.
115. Johnson, R.E., *Remission induction and remission duration with primary radiotherapy in advanced lymphosarcoma*. Cancer, 1972. **29**(6): p. 1473-1476.
116. Johnson, R.E., *Total body irradiation of chronic lymphocytic leukemia. Relationship between therapeutic response and prognosis*. Cancer, 1976. **37**(6): p. 2691-2696.
117. Johnson, R.E., *Radiotherapy as primary treatment for chronic lymphocytic leukaemia*. Clinics in Haematology, 1977. **6**(1): p. 237-244.
118. Kazem, I., *Total body irradiation in the management of malignant lymphoma*. Radiologia Clinica, 1975. **44**(5): p. 457-463.
119. Chaffey, J.T., et al., *Total body irradiation as treatment for lymphosarcoma*. International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics, 1976. **1**(5-6): p. 399-405.
120. Choi, N.C., et al., *Low dose fractionated whole body irradiation in the treatment of advanced non-Hodgkin's lymphoma*. Cancer, 1979. **43**(5): p. 1636-1642.
121. Hoppe, R.T., et al., *The treatment of advanced stage favorable histology non-Hodgkin's lymphoma: a preliminary report of a randomized trial comparing single agent chemotherapy, combination chemotherapy, and whole body irradiation*. Blood, 1981. **58**(3): p. 592-598.

122. Mendenhall, N.P., W.D. Noyes, and R. Million, *Total body irradiation for stage II-IV non-Hodgkin's lymphoma: ten-year follow-up*. Journal of Clinical Oncology, 1989. **7**(1): p. 67-74.
123. Thar, T.L., R.R. Million, and W.D. Noyes, *Total body irradiation in non-Hodgkin's lymphoma*. International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics, 1979. **5**(2): p. 171-176.
124. Canellos, G., et al., *Therapy of advanced lymphocytic lymphoma a preliminary report of a randomized trial between combination chemotherapy (CVP) and intensive radiotherapy*. The British journal of cancer. Supplement, 1975. **2**: p. 474.
125. Yonkosky, D.M., et al., *Improvement of in vitro mitogen proliferative responses in non-Hodgkin's lymphoma patients exposed to fractionated total body irradiation*. Cancer, 1978. **42**(3): p. 1204-1210.
126. Kinsella, T.J., et al., *Intensive combined modality therapy including low-dose TBI in high-risk ewing's sarcoma patients*. International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics, 1983. **9**(12): p. 1955-1960.
127. D'Angio, G.J. and A.E. Evans, *Cyclic, low-dose total body irradiation for metastatic neuroblastoma*. International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics, 1983. **9**(12): p. 1961-1965.
128. Rees, G., et al., *Total body irradiation as a secondary therapy in non-Hodgkin's lymphoma*. Clinical Radiology, 1980. **31**(4): p. 437-439.
129. Carabell, S.C., et al., *Results of total body irradiation in the treatment of advanced non-Hodgkin's lymphomas*. Cancer, 1979. **43**(3): p. 994-1000.
130. O'Donnell, J.F., et al., *Acute nonlymphocytic leukemia and acute myeloproliferative syndrome following radiation therapy for non-hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: Clinical studies*. Cancer, 1979. **44**(5): p. 1930-1938.
131. Greene, M.H., et al., *Evidence of a treatment dose response in acute nonlymphocytic leukemias which occur after therapy of non-Hodgkin's lymphoma*. Cancer Research, 1983. **43**(4): p. 1891-1898.
132. Travis, L.B., et al., *Leukemia following low-dose total body irradiation and chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma*. Journal of clinical oncology, 1996. **14**(2): p. 565-571.
133. Ellis, M. and M. Lishner, *Second Malignancies Following Treatment in non-Hodgkin's Lymphoma*. Leukemia & Lymphoma, 1993. **9**(4-5): p. 337-342.

134. Kollmannsberger, C., et al., *Risk of secondary myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome following standard-dose chemotherapy or high-dose chemotherapy with stem cell support in patients with potentially curable malignancies*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 1998. **124**(3-4): p. 207-214.
135. Paule, B., J. Cosset, and J. Le Bourgeois, *The possible role of radiotherapy in chronic lymphocytic leukaemia: a critical review*. Radiotherapy and Oncology, 1985. **4**(1): p. 45-54.
136. Calabrese, E.J., *An abuse of risk assessment: how regulatory agencies improperly adopted LNT for cancer risk assessment*. Archives of Toxicology, 2015. **89**(4): p. 647-648.
137. Calabrese, E.J., *The Muller-Neel dispute and the fate of cancer risk assessment*. Environmental Research, 2020. **190**: p. 109961.
138. Cooke, M.S., et al., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. The FASEB Journal, 2003. **17**(10): p. 1195-1214.
139. Chaffey, J.T., et al., *Total-Body Irradiation in the Treatment of Lymphocytic Lymphoma*<sup>1</sup>. Cancer Treatment Reports, 1977. **61**(6): p. 1149-1152.
140. Welsh, J.S., *Waldenstrom's Macroglobulinemia treated with fractionated low-dose total body irradiation*. Case Rep Clin Pract Rev, 2004. **5**: p. 425-431.
141. Specht, L., *Does radiation have a role in advanced stage Hodgkin's or non-Hodgkin lymphoma?* Current treatment options in oncology, 2016. **17**: p. 1-13.
142. Chen, Z. and K. Sakai, *Enhancement of Radiation-induced Apoptosis by Preirradiation with Low-dose X-rays in Human Leukemia MOLT-4 Cells*. Journal of Radiation Research, 2004. **45**(2): p. 239-243.
143. Sellins, K.S. and J. Cohen, *Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes*. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 1987. **139**(10): p. 3199-3206.
144. Dewey, W.C., C.C. Ling, and R.E. Meyn, *Radiation-induced apoptosis: Relevance to radiotherapy*. International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics, 1995. **33**(4): p. 781-796.
145. Forrester, H.B., et al., *Computerized Video Time-Lapse Analysis of Apoptosis of REC:Myc Cells X-Irradiated in Different Phases of the Cell Cycle*. Radiation Research, 2000. **154**(6): p. 625-639.

146. Sharma, D., et al., *Differential activation of NF- $\kappa$ B and nitric oxide in lymphocytes regulates in vitro and in vivo radiosensitivity*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2010. **703**(2): p. 149-157.
147. C. Short, J.K., CR Mayes, M. Woodcock, MC Joiner, S, *Low-dose hypersensitivity after fractionated low-dose irradiation in vitro*. International journal of radiation biology, 2001. **77**(6): p. 655-664.
148. Seth, I., M.C. Joiner, and J.D. Tucker, *Cytogenetic low-dose hyperradiosensitivity is observed in human peripheral blood lymphocytes*. International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics, 2015. **91**(1): p. 82-90.
149. Fadok, V.A., D.L. Bratton, and P.M. Henson, *Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences*. Journal of Clinical Investigation, 2001. **108**(7): p. 957-962.
150. Marples, B., et al., *Low-dose hyper-radiosensitivity: a consequence of ineffective cell cycle arrest of radiation-damaged G2-phase cells*. Radiation research, 2004. **161**(3): p. 247-255.
151. Knoop, L., et al., *In vivo p53 response and immune reaction underlie highly effective low-dose radiotherapy in follicular lymphoma*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1116-1122.
152. Zappasodi, R., et al., *Improved clinical outcome in indolent B-cell lymphoma patients vaccinated with autologous tumor cells experiencing immunogenic death*. Cancer research, 2010. **70**(22): p. 9062-9072.
153. Ferlay, J., et al., *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*. International journal of cancer, 2019. **144**(8): p. 1941-1953.
154. Kamran, S.C., et al., *Therapeutic radiation and the potential risk of second malignancies*. Cancer, 2016. **122**(12): p. 1809-1821.
155. Luan, F.-J., et al., *Low Radiation X-rays: Benefiting People Globally by Reducing Cancer Risks*. International journal of medical sciences, 2021. **18**(1): p. 73-80.
156. Pollycove, M., *Radiobiological basis of low-dose irradiation in prevention and therapy of cancer*. Dose-response, 2007. **5**(1): p. dose-response. 06-112. Pollycove.
157. Oakley, P.A., *Is use of radiation hormesis the missing link to a better cancer treatment?* Journal of Cancer Therapy, 2015. **6**(7): p. 601-605.

158. Block, A.M., S.R. Silva, and J.S. Welsh, *Low-dose total body irradiation: an overlooked cancer immunotherapy technique*. Journal of Radiation Oncology, 2017. **6**(2): p. 109-115.
159. Pedersen-Bjergaard, J., *Therapy-related acute nonlymphocytic leukemia: Clinical aspects*. Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy, 1988. **5**: p. 207-209.
160. Holder, D.L., *Total-body irradiation in multiple myeloma*. Radiology, 1965. **84**(1): p. 83-86.
161. Rückert, M., et al., *Immunomodulierende Eigenschaften von Radiotherapie als Basis für wohldurchdachte Radioimmuntherapien*. Strahlentherapie und Onkologie, 2018. **194**: p. 509-519.
162. Menon, H., et al., *Influence of low-dose radiation on abscopal responses in patients receiving high-dose radiation and immunotherapy*. Journal for immunotherapy of cancer, 2019. **7**: p. 1-9.
163. Johnson, R.E., *Evaluation of Fractionated Total-Body Irradiation in Patients with Leukemia and Disseminated Lymphomas*. Radiology, 1966. **86**(6): p. 1085-1089.
164. Johnson, R.E., *Treatment of chronic lymphocytic leukemia by total body irradiation alone and combined with chemotherapy*. International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics, 1979. **5**(2): p. 159-164.
165. Hellman, S., et al., *The place of radiation therapy in the treatment of non-Hodgkin's lymphomas*. Cancer, 1977. **39**(S2): p. 843-851.