

EWA TYRKIEL, BOŻENA WIADROWSKA, JAN K. LUDWICKI

WPŁYW NUARIMOLU NA AKTYWNOŚĆ MUTAGENĄ  
N-NITROZODIMETYLOAMINY I 2-ACETYLOAMINOFLUORENU W  
ERYTROCYTACH MYSZY

THE EFFECT OF NUARIMOL ON MUTAGENIC ACTIVITY OF  
N-NITROSODIMETHYLOAMINE AND 2-ACETYLAMINOFUORENE IN MICE  
ERYTHROCYTES

Zakład Toksykologii Środowiskowej  
Państwowy Zakład Higieny  
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24  
Kierownik: prof. dr hab. J.K. Ludwicki

*Zbadano wpływ nuarimolu (200 mg/kg m.c.) na częstotliwość występowania mikrojader w erytrocytach szpiku kostnego i krwi obwodowej indukowanych przez N-nitrozodimetyloaminę podawaną w dawkach 2, 5, 14, 28 mg/kg m.c. oraz 2-acetyloaminofluoren podawaną w dawkach 250, 500, 1000 mg/kg m.c.*

WSTĘP

Szerokie stosowanie związków chemicznych, w tym pestycydów, prowadzi do wzrostu skażenia środowiska naturalnego substancjami obcymi o znacznej niekiedy aktywności biologicznej. Zjawisko to powoduje wzrost ryzyka narażenia człowieka na równoczesne oddziaływanie wielu związków chemicznych zwiększając prawdopodobieństwo występowania interakcji. Z tego też względu badanie łącznego oddziaływania związków chemicznych stało się jednym z ważniejszych problemów w toksykologii.

Nuarimol ( $\alpha$ -(2-chlorofenylo)-( $\alpha$ )-(4-fluorofenylo)-5-pirydynometanol) stanowiący przedmiot badań jest syntetycznym fungicydem wchodzącym w skład preparatu Trymitem. Budowa chemiczna nuarimolu jest zbliżona do DDT, który jak wykazano w warunkach eksperymentalnych powoduje uszkodzenia chromosomów w komórkach szpiku kostnego myszy szczepu Balb/c [11, 13, 17] oraz indukuje aberracje chromosomowe u *Drosophila melanogaster* [4]. Wyniki wcześniejszych badań własnych wskazują, że narażenie na nuarimol nie powoduje zmian klastogennych [26, 27] jednak jak dotąd nie wyjaśniono roli tego związku w biologicznej aktywacji promutagenów. Nuarimol, jako strukturalny analog DDT, podobnie jak inne aromatyczne węglowodory chlorowane, należy do induktorów typu fenobarbitalu oddziałujących na aktywność monooksygenaz związanych z cytochromem P-4502B [15].

N-nitrozodimetyloamina oraz 2-acetyloaminofluoren posiadają silne właściwości rakotwórcze i mutagenne [3, 7, 25]. Jednakże do ujawnienia tych właściwości niezbędna jest aktywacja metaboliczna. Wiadomo też, że genotoksyczne oddziaływanie promuta-

genów uwarunkowane jest poziomem aktywności monooksygenaz zlokalizowanych w retikulum endoplazmatycznym [8, 30]. Wcześniejsze narażenie na nuarimol może powodować wzrost aktywności tych enzymów zwiększając poziom aktywnych intermediatów. Celem niniejszej pracy było określenie wpływu wcześniejszego podawania nuarimolu na aktywność mutageną dwóch modelowych promutagenów: N-nitrozodimetyloaminy (NDMA) i 2-acetyloaminofluorenu (2-AAF).

## MATERIAŁ I METODY

### Badane związki

Nuarimol ( $\alpha$ -(2-chlorofenylo)- $\alpha$ -(4-fluorofenylo)-5-pyrimidynometanol) o czystości 98% firmy Elanco Lilly Research Centre Ltd., Aroclor 1254 firmy Anallabs Inc., N-nitrozodimetyloamina (NDMA) firmy Merck, 2-acetyloaminofluoren (2-AAF) firmy Koch-Light.

### Materiał biologiczny i przebieg doświadczenia

Badania wykonano na 8–10 tygodniowych samcach myszy szczepu Swiss pochodzących z hodowli Państwowego Zakładu Higieny.

Przed rozpoczęciem doświadczenia zwierzęta przechodziły dwutygodniową kwarantannę i aklimatyzację w pomieszczeniu z kontrolowaną temperaturą i 12 godzinnym cyklem świetlnym. Myszy otrzymywały standardową paszę i wodę wodociągową.

W pierwszym etapie doświadczenia nuarimol podawano zwierzętom w postaci zawiesiny olejowej *per os* w dawce wynoszącej 200 mg/kg m.c. przez 5 kolejnych dni.

Kontrolę pozytywną stanowiły myszy, którym podawano dootrzewnowo Aroclor 1254 w dawce 500 mg/kg m.c. jako induktor izoenzymów związanych z cytochromem P-4502B i P-4501A.

W drugim etapie doświadczenia zwierzętom narażonym na nuarimol lub Aroclor 1254 podawano N-nitrozodimetyloaminę w roztworze fizjologicznym soli w dawkach wynoszących 2, 5, 14, lub 28 mg/kg m.c., lub 2-acetyloaminofluoren doustnie w postaci zawiesiny olejowej w dawkach wynoszących 250, 500 lub 1000 mg/kg m.c., zachowując odpowiednie grupy kontrolne.

Zwierzętom, u których oceniano erytrocyty polichromatyczne w szpiku kostnym NDMA i 2-AAF podawano dwa razy w ciągu doby w odstępach 24 godzinnych. Natomiast zwierzętom, u których oceniano erytrocyty w krwi obwodowej, związki te podawano przez trzy kolejne dni. Poszczególne grupy zwierząt liczyły po 12 myszy.

### Ocena mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego i krwi obwodowej

Po upływie 24 i 48 godzin od zakończenia podawania badanych związków od części zwierząt pobierano szpik z kości udowej, wykonywano rozmazy wg metody *Schmida* [8, 10, 18, 23, 24] i barwiono barwnikiem *Giemsa*. Następnie oceniano występowanie mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych (MNPCE). Na jedno zwierzę oceniano po 1000 komórek. Oznaczano także stosunek erytrocytów polichromatycznych do normochromatycznych (PCE/NCE) umożliwiający ocenę cytotoksycznego działania badanych związków.

Od pozostałych zwierząt (4 samce na każdą grupę doświadczalną) pobierano przyżyciowo krew z żyły ogonowej po 24, 48, 72 i 96 godzinach od ostatniego podania badanych związków. Rozmazy z krwi wykonywano według metody *Schlegela* i *Mac Gregora* [20, 21, 22] oceniając je pod kątem występowania mikrojąder w dojrzałych erytrocytach (MNNE). Na jedno zwierzę oceniano po 2000 erytrocytów.

Analizy statystycznej otrzymanych wyników dokonano stosując metodę *Kastenbaum-Bowmana* [14].

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki badań wpływu nuarimolu na częstość występowania mikrojąder indukowanych przez N-nitrozodimetyloaminę przedstawiono na rycinach 1, 2 oraz w tabeli I.

W wykonanych doświadczeniach wykazano, że podawanie N-nitrozodimetyloaminy powoduje wzrost częstości występowania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego. Wzrost ten był zależny od wysokości stosowanej dawki i miał miejsce już po 24 i 48 godzinach od podania NDMA. Różnice między zwierzętami z grupy kontrolnej i grupy badanej były statystycznie istotne przy dawkach NDMA wynoszących 14 i 28 mg/kg m.c.

Liczba erytrocytów z mikrojądami w szpiku kostnym zwierząt otrzymujących tylko NDMA po uprzednim narażeniu na nuarimol nie różniły się w sposób istotny statystycznie, co świadczy, że nuarimol nie wpływał na częstość występowania mikrojąder indukowanych przez NDMA.

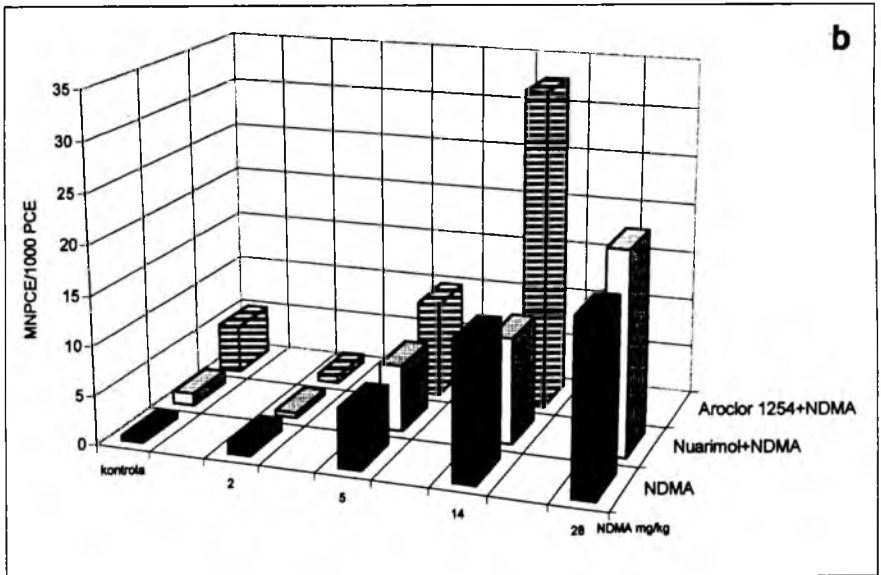
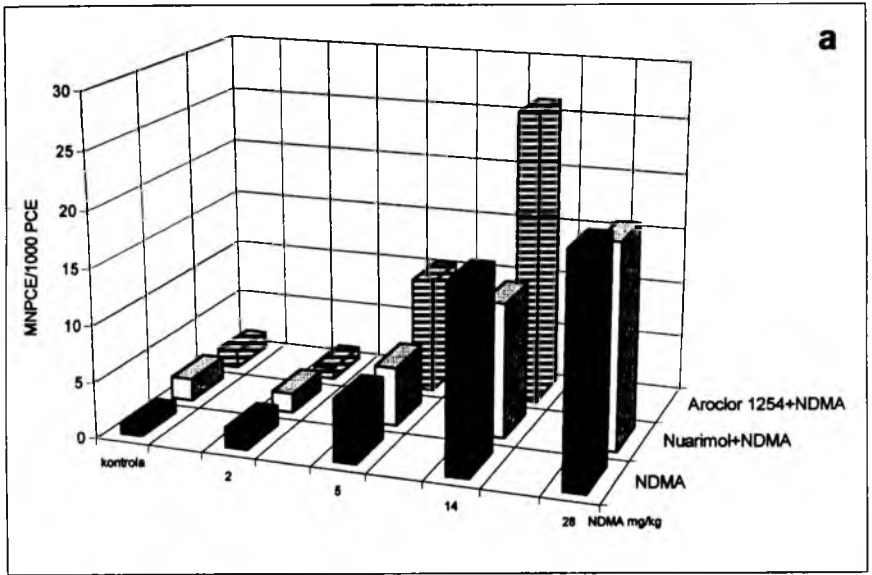
Poziom erytrocytów polichromatycznych z mikrojądami w szpiku kostnym zwierząt otrzymujących Aroclor 1254 przed podaniem N-nitrozodimetyloaminy był wyższy niż u zwierząt narażonych na działanie samego NDMA. Stwierdzone różnice były statystycznie istotne przy najwyższej z tolerowanych dawek NDMA, tj. przy 14 mg/kg m.c. Przy dawce wyższej (28 mg/kg m.c.) wcześniejsza intoksykacja Aroclorem 1254 powodowała silne toksyczne działanie obydwu związków prowadzące do śmierci wszystkich zwierząt w tej grupie.

Cytotoksyczne działanie badanych związków chemicznych, wyrażone stosunkiem PCE/NCE, na komórki szpiku kostnego przedstawiono na ryc. 2.

Wyniki te wskazują, że stosowane dawki NDMA nie wywierały toksycznego działania na badane komórki po pierwszej dobie od zakończenia narażenia. Obserwowany w tym czasie wzrost częstości indukowanych przez NDMA mikrojąder nie łączył się więc z jej cytotoksycznym działaniem. Wcześniejsze podawanie nuarimolu nie zwiększało cytotoksycznego działania NDMA, natomiast w przypadku wcześniejszego podawania Arochloru 1254 w badanej tkance obserwowano toksyczne działanie dawki 5 mg/kg m.c. Wzrost częstości występowania mikrojąder w komórkach szpiku kostnego u zwierząt otrzymujących Aroclor 1254 i NDMA, w przeciwieństwie do zwierząt otrzymujących samą NDMA, był połączony ze wzrostem cytotoksyczności.

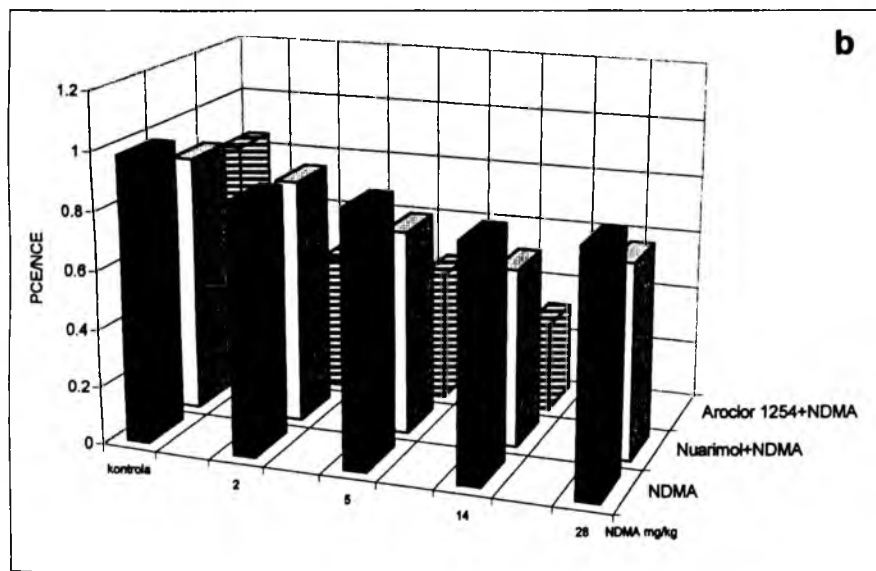
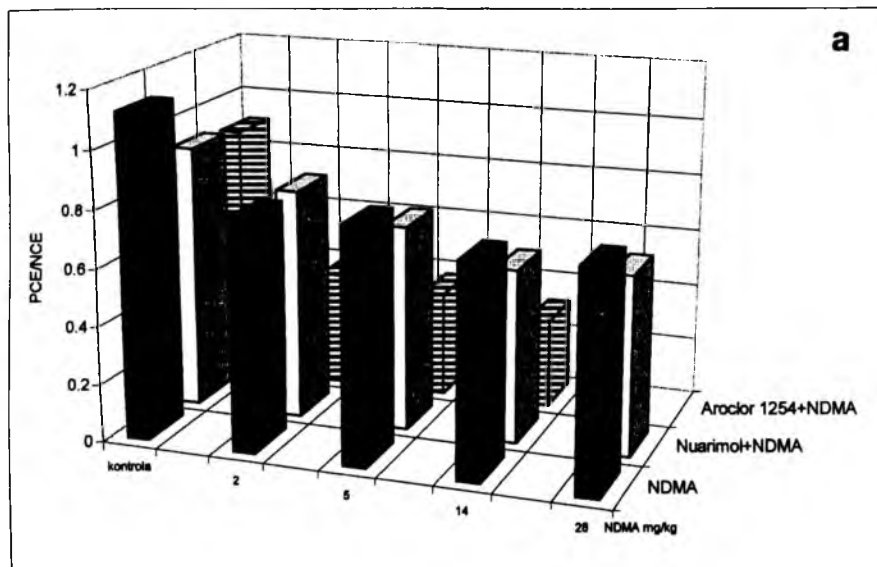
Wyniki badań wpływu nuarimolu na częstość występowania mikrojąder w komórkach szpiku kostnego potwierdzają dane uzyskane przy ocenie uszkodzeń indukowanych przez NDMA w erytrocytach krwi obwodowej.

Przyżyciowe pobieranie materiału do badań umożliwiło ocenę powstawania uszkodzeń w zależności od czasu, jaki upłynął od narażenia. Największą liczbę erytrocytów z mikrojądami we krwi zwierząt otrzymujących NDMA obserwowano po 48 godzinach od ostatniego podania tego związku. Utrzymywała się ona na zbliżonym poziomie przez dwa kolejne dni. Uprzednie podawanie nuarimolu nie zmieniło częstości pojawiania się mikrojąder. Natomiast wcześniejsze podanie Arochloru 1254 powodowało wzrost częstości występowania mikrojąder w erytrocytach zwierząt otrzymujących zaledwie 5 mg NDMA/kg masy ciała w stosunku do odpowiedniej grupy otrzymującej wyłącznie NDMA w tej samej dawce. Przy wyższych dawkach NDMA (14 i 28 mg/kg m.c.) następowała śmierć zwierząt w wyniku toksycznego działania badanych związków.



Ryc. 1. Wpływ nuarimolu na częstość występowania mikrojąder indukowanych przez NDMA w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego (PCE) myszy: a) po 24 godzinach; b) po 48 godzinach

Effect of nuarimol on incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes induced by NDMA in bone marrow cells of mice: a) after 24 h; b) after 48 h



Ryc. 2. Cytotoksyczne działanie NDMA na komórki szpiku kostnego, po uprzednim ich narażeniu na nuarimol lub Aroclor 1254: a) po 24 godz.; b) po 48 godz  
Cytotoxic effect of NDMA on bone marrow cells, after exposure on nuarimol or Aroclor 1254: a) after 24 h; b) after 48 h

Tabela I. Wpływ nuarimolu na częstość występowania mikrojąder indukowanych przez NDMA w erytrocytach krwi obwodowej myszy  
The influence of nuarimol on the micronuclei frequency induced by NDMA in mice peripheral blood erythrocytes

Badany związek	Dawka (mg/kg mc)	Liczba MNNCE na 1000 NCE (b)			
		24h	48h	72h	96h
Kontrola	0	0,62±0,31	1,0±0,4	0,87±0,37	1,12±0,42
Aroclor 1254	500	0,62±0,24	1,37±0,24	0,25±0,14	0,62±0,31
Nuarimol	200	0,87±0,37	0,62±0,37	1,37±0,43	1,00±0,35
	2	0,62±0,31	1,25±0,53	0,62±0,37	1,37±0,51
	5	1,62±0,24	2,37±0,47	2,00±0,2	1,87±0,37
	14	1,25±0,24	4,25±0,32**	4,12±0,65**	3,78±0,52**
	28	0,87±0,31	7,33±4,05**	7,37±1,37**	6,50±0,97**
Nuarimol i NDMA	200 i 2	0,62±0,31	1,75±0,24	1,00±0,2	1,05±0,2
	200 i 5	1,37±0,47	1,87±0,23	3,50±0,43	2,87±0,52
	200 i 14	1,37±0,31	3,75±0,48	5,50±0,5	5,00±0,33
	200 i 28	0,62±0,35	7,25±0,75	7,62±0,13	4,50±0,75
	500 i 2	0,50±0,20	0,75±0,14	0,65±0,36	0,65±0,31
Aroclor 1254 i NDMA	500 i 5	1,37±0,37	7,37±0,62**	9,50±1,35**	7,25±0,92**
	500 i 14	(a)	(a)	(a)	(a)
	500 i 28	(a)	(a)	(a)	(a)

\*\* P < 0,001

(a) – nie oceniano z uwagi na śmierć zwierząt

(b) – MNNCE (erytrocyty normochromatyczne z mikrojądrami); NCE (erytrocyty normochromatyczne)

Należy podkreślić, że działania takiego nie obserwowano przy oddzielnym podawaniu N-nitrozodimetyloaminy i Arocloru 1254.

Wyniki badań wpływu nuarimolu na częstość występowania mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego i krwi obwodowej indukowanych przez 2-acetyloaminofluoren przedstawiono na rycinach 3, 4 oraz w tabeli II.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że 2-acetyloaminofluoren indukował powstanie mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego i we krwi obwodowej. Wzrost częstości występowania mikrojąder w badanych komórkach zależał od dawki 2-AAF. Różnice w liczbie erytrocytów z mikrojądrami między zwierzętami grup kontrolnych i zwierzętami otrzymującymi dawki 500 i 1000 mg/kg m.c. były statystycznie znamienne. W erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego wzrost częstości występowania mikrojąder miał miejsce po 24 godzinach od zakończenia podawania 2-AAF, a w erytrocytach krwi obwodowej po 72 godzinach.

Wcześniejsze podawanie nuarimolu nie powodowało zwiększenia częstości występowania mikrojąder w ocenianych komórkach przy żadnej ze stosowanych dawek. Natomiast Aroclor 1254 nieznacznie zwiększał częstość występowania uszkodzeń indukowa-

Tabela II. Wpływ nuarimolu na częstość występowania mikrojąder indukowanych przez 2-AAF w erytrocytach krwi obwodowej myszy  
The influence of nuarimol on the micronuclei frequency induced by 2-AAF in mice peripheral blood erythrocytes

Badany związek	Dawka (mg/kg mc)	Liczba MNNCE na 1000 NCE (a)			
		24h	48h	72h	96h
Kontrola	0	0,75±0,36	0,85±0,36	0,65±0,30	0,95±0,40
Aroclor 1254	500	0,62±0,24	1,37±0,24	0,25±0,14	0,62±0,31
Nuarimol	200	0,87±0,37	0,62±0,37	1,37±0,43	1,00±0,35
	250	0,65±0,31	0,65±0,31	1,62±0,23	1,37±0,32
2-AAF	500	1,50±0,61	2,87±0,30*	3,87±0,42**	5,57±0,11**
	1000	2,50±0,35	2,00±0,93	5,12±0,55**	6,62±0,82**
Nuarimol i 2-AAF	200 i 2	0,50±0,35	0,87±0,42	2,00±1,18	1,60±0,42
	200 i 5	1,50±0,35	4,25±0,59	4,75±0,43	5,21±0,71
	200 i 14	1,87±0,47	3,62±0,23	6,12±0,85	5,87±0,42
Aroclor 1254 i 2-AAF	500 i 2	0,25±0,25	0,50±0,20	0,50±0,20	0,75±0,32
	500 i 5	1,85±0,24	4,50±0,61	4,50±1,30	8,37±0,96
	500 i 14	3,00±0,20	4,62±1,10	5,68±0,96	10,00±0,84

\* P < 0,01

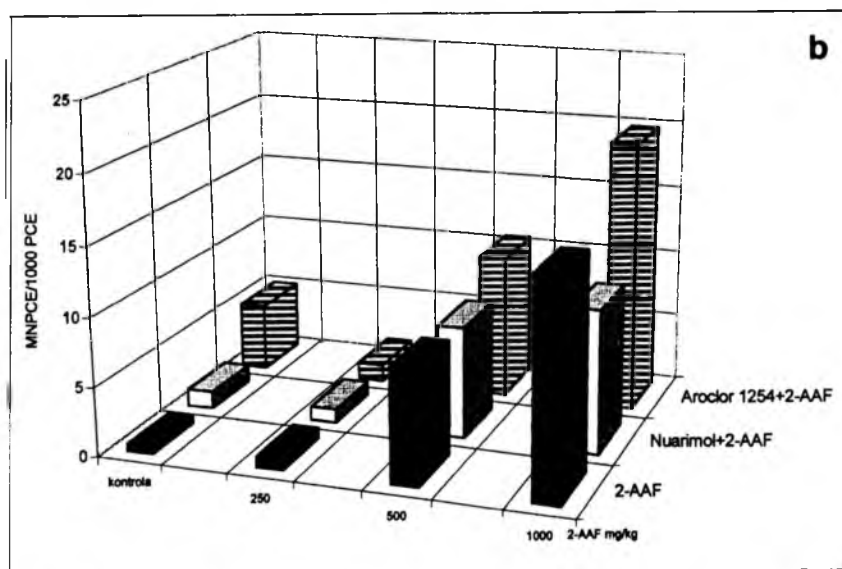
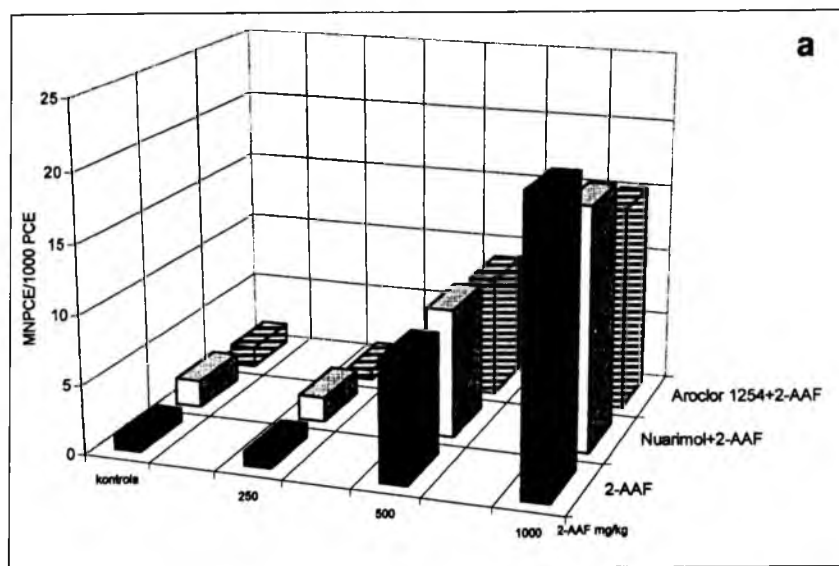
\*\* P < 0,001

(a) - MNNCE (erytrocyty normochromatyczne z mikrojądrami); NCE (erytrocyty normochromatyczne)

nych przez 2-AAF podawany myszom w dawce 1000 mg/kg m.c. zarówno w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego (po 48 godz.) jak erytrocytach krwi obwodowej (po 96 godz.). Porównując liczbę komórek z mikrojądrami u zwierząt otrzymujących sam 2-acetyloaminofluoren i zwierząt otrzymujących wcześniej Aroclor 1254 nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Nie stwierdzono także wyraźnego cytotoksycznego oddziaływania badanych związków na komórki szpiku kostnego.

Uzyskane wyniki dotyczące indukcji mikrojąder przez N-nitrozodimetyloaminę i 2-acetyloaminofluoren nie odbiegają od danych z piśmiennictwa [5, 28]. *Ashby* i wsp. [1] obserwowali znaczny wzrost częstości występowania mikrojąder w szpiku kostnym szczurów pod wpływem 2-AAF, badania międzylaboratoryjne prowadzone w Japonii [6, 9] wykazały, że związek ten indukuje mikrojądra w komórkach szpiku kostnego myszy. *Martelli* i wsp. [19], oraz *Krishna* i wsp. [16] stwierdzili zwiększenie liczby mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego i śledziona po narażeniu myszy na działanie NDMA.

Nuarimol, jak wykazały w swoich badaniach *Kostka* i *Palut* [15] powoduje wzrost aktywności O-demetylasy p-nitroanizolowej u szczurów już po jednorazowej dawce 65,2 mg/kg m.c. Aktywność uzyskana po pierwszym dniu utrzymywała się przez 5 kolejnych dni.

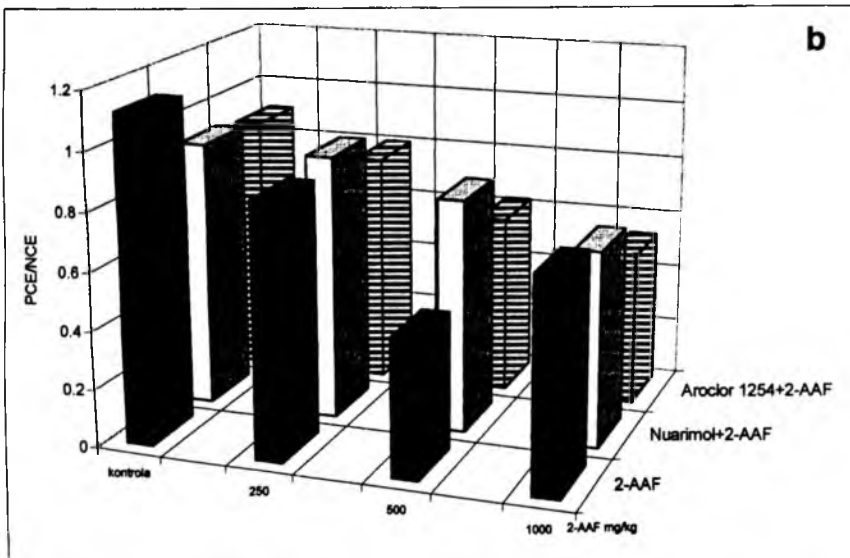
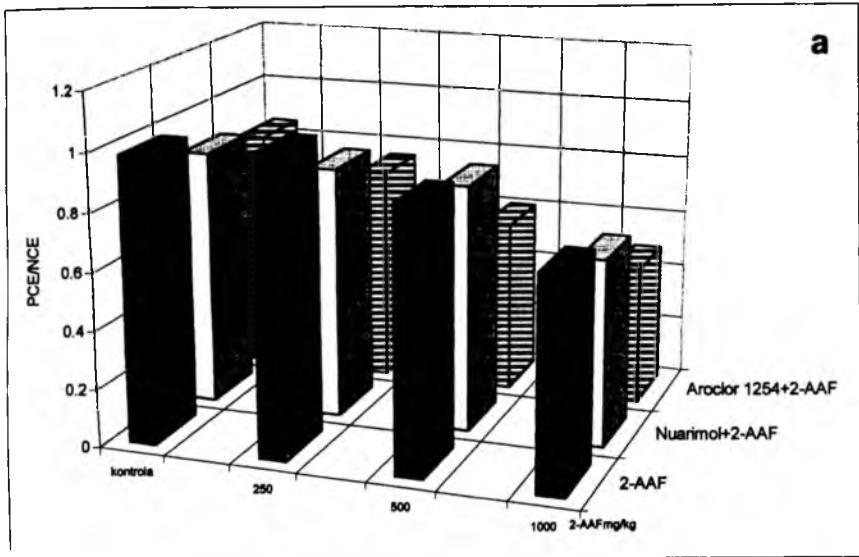


Ryc. 3. Wpływ nuarimolu na częstość występowania mikrojąder indukowanych przez 2-AAF w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego (PCE) myszy: a) po 24 godz.; b) po 48 godz

Effect of nuarimol on incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes induced by 2- AAF in bone marrow cells of mice: a) after 24 h; b) after 48 h

W niniejszych badaniach jednak związek ten nie spowodował zwiększenia częstości występowania mikrojąder indukowanych przez obydwa badane promutageny (NDMA i 2-AAF).





Ryc. 4. Cytotoksyczne działanie 2-AAF na komórki szpiku kostnego po uprzednim narażeniu ich na działanie nuarimolu lub Arochloru 1254: a) po 24 godz.; b) po 48 godz.  
Cytotoxic effect of 2-AAF on bone marrow cells, after exposure on nuarimol or Aroclor 1254: a) after 24 h; b) after 48 h.

Aroclor 1254 stanowiący w niniejszych badaniach kontrolę pozytywną wyraźnie zwiększał częstość występowania mikrojąder indukowanych przez N-nitrozodimetyloaminę natomiast nieznacznie wpływał na zwiększenie liczby komórek z mikrojądrami indukowanymi przez 2-acetyloaminofluoren. Różnice te mogą wynikać z faktu, iż

Aroclor 1254 jest mieszaniną polichlorowanych bifenyli, będących induktorami zarówno izoenzymów związanych z cytochromem P-4502B (typ fenobarbitalu) jak i P-4501A (typ 3-metylocholantrenu) [12, 29]. Nuarimol natomiast należy do induktorów typu fenobarbitalu oddziałując wyłącznie na aktywność monoooksygenaz związanych z cytochromem P-4502B.

Uzyskane wyniki pośrednio mogą sugerować, że narażenie myszy na nuarimol nie wpływało na wzrost poziomu klastogennych metabolitów zarówno N-nitrozodimetyloaminy jak i 2-acetyloaminofluorenu.

#### WNIOSKI

1. N-nitrozodimetyloamina i 2-acetyloaminofluoren posiadają właściwości klastogenne.
2. Klastogenne działanie NDMA i 2-AAF nie ulega wzmożeniu pod wpływem nuarimolu.
3. Wcześniejsze narażenie na Aroclor 1254 powoduje istotny wzrost klastogennej aktywności NDMA.

E. Tyrkiel, B. Wiadrowska, J.K. Ludwicki

#### THE EFFECT OF NUARIMOL ON MUTAGENIC ACTIVITY OF N-NITROSODIMETHYLAMINE AND 2-ACETYLAMINOFLUORENE IN MICE ERYTHROCYTES

##### Summary

Nuarimol, the structural analogue of DDT, similarly to other polychlorinated aromatic hydrocarbons, induces monooxygenase activity. N-nitrosodimethylamine (NDMA) and 2-acetylamino fluorene (2-AAF) belong to chemical compounds exhibiting strong mutagenic and carcinogenic properties followed the metabolic activation. Genotoxic activity of promutagens, including NDMA and 2-AAF depends on the activity of monooxygenase enzymes. The study aimed at clarification of the effect of nuarimol on the mutagenic activity of NDMA and 2-AAF in *in vivo* micronucleus test. The experiments were performed on Swiss mice, which were exposed to nuarimol or Aroclor 1254 (as the positive control) followed by the exposure to NDMA or 2-AAF. The micronuclei were counted in the bone marrow polychromatic erythrocytes and in the erythrocytes of the peripheral blood. The results show that NDMA as well as 2-AAF induce failures in the genetic material in the bone marrow cells. Nuarimol given to the mice before the exposure to NDMA or 2-AAF did not cause changes in the micronuclei frequency. However, the prior intoxication by Aroclor 1254 resulted in the increase of the number of erythrocytes with micronuclei induced by NDMA in bone marrow and peripheral blood. This effect has not been observed in the mice intoxicated by 2-AAF prior to Aroclor 1254.

#### PIŚMIENICTWO

1. Ashby J., Beije B.: Contaminant observations of UDS in the liver and micronuclei in the bone marrow of rats exposed to cyclophosphamide or 2-acetylamino fluorene. *Mutation Res.* 1985, 150, 383.
2. Ashby J., Tinwel H.: The serial dosing rodent bone-marrow micronucleus assay test protocol. Context, purpose and design of the collaborative study. *Mutation Res.* 1990, 234, 111.
3. Carlton W.W., Rice P.S.: Dietary copper and the induction of neoplasms in the rat by 2-acetylamino fluorene and dimethylnitrosamine. *Food Cosmet. Toxicol.* 1973, 11, 827.

4. *Clarc J.*: Mutagenicity of DDT in mice, *Drosophila melanogaster* and *Neurospora crassa*. Aust. J. Biol. Sci. 1974, 27, 427.
5. Collaborative study for the micronucleus test. Sex difference in the micronucleus test. Mutation Res. 1986, 172, 131.
6. The Collaborative Study Group for the micronucleus test: Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining. The summary report of the 5-th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. Mutation Res. 1992, 272, 83.
7. *Fahmy O.C., Fahmy M.J.*: Mutagenic selectiviti of carcinogen nitrosocompounds. II. N,N-dimethyloitrosamine. Chem. Biol. Inter. 1975, 11, 385.
8. *Franz C.N., Malling H.Y.*: Factors effecting metabolism and mutagenicity of dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine. Cancer Res. 1975, 35, 2307.
9. *Hayashi M., Sutou S., Shimada H., Sato S., Sasaki Y.F., Wakata A.*: Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test. The 3-rd collaborative study by CSGMT/JEMS. Mutation Res. 1988, 223, 329.
10. *Heddle J.A., Stuart E., Salomone M.F.*: The bone marrow micronucleus test. W: Handbook of mutagenicity test procedures. II ed. B.S. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel 1984, 441-457.
11. IARC (1991) Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risk to Humans. 53: Occupational Exposure in Insecticide Application and some Pesticides. 1991, 53, 179.
12. *Ikegwuonu F.I., Ganem L.G., Larsen M.C., Shen Xin, Jefcoate C.R.*: The regulation by gender, strain, dose, and feeding status of the induction of multiple forms of cytochrome P-450 izoenzymes in rat hepatic microsomes by 2, 4, 5, 2, 4, 5, -hexachlorobiphenyl. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1996, 139, 33.
13. *Johnson G.G., Jalal S.*: DDT induces chromosomal damage in mice. J. Hered. 1973, 64, 7.
14. *Kastenbaum M.A., Bowman K.O.*: Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutation Res. 1970, 9, 527.
15. *Kostka G., Palut.*: Early hepatic changes induced by nuarimol in rats. J. Appl. Toxicol. 1994, 14, 5, 337.
16. *Krishna G., Kropko M.L., Thess J.C.*: Dimethylnitrosamine induced micronucleus formation in mouse bone marrow and spleen. Mutation Res. 1990, 242, 345.
17. *Larsen K, Jalal S.*: DDT induced chromosome mutation in mice. Further testing. Can. J. Genet. Cytol. 1974, 16, 491.
18. *Mac Gregor J. T., Heddle J.A., Margolin B.H., Salamone M.F., Tice R.R., Wild D.*: Guidelines for the conduct of micronucleus in mammalian bone marrow erythrocytes. Mutation Res. 1987, 189, 103.
19. *Martelli A., G. Brambilla Campart, Benvenuto F., Fresu A.N., Brambilla G.*: Comparison of micronucleus in mouse bone marrow and spleen. Mutation Res. 1993, 292, 63.
20. *Mavourmin K.H., Blakey D.H., Cimino M.C., Salamone M.F., Heddle J.A.*: The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res. 1990, 239, 29.
21. *Schlegel R., Mac Gregor J.T.*: The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes detection of chronic chromosome breakage in mice. Mutation Res. 1982, 104, 367.
22. *Schlegel R., Mac Gregor J.J.*: A rapid screen for cummulative chromosomal damage in mice accumulation of circulating micronucleated erythrocytes. Mutation Res. 1983, 113, 481.
23. *Schmid W.*: Micronucleus test. Mutation Res. 1975, 31, 9.
24. *Schmid W.*: The micronucleus for cytogenetic analysis. W: Chemical mutagens; principle and method for their detection, 1976, vol 4, 31-53.

25. *Syrowatka T., Tyrkiel E., Nazarewicz T.*: Wpływ równoczesnego podawania DDT na toksyczność dwumetylonitrozoaminy dla szczurów w doświadczeniu chronicznym. Roczn. PZH 1979, 30, 11, 67.

26. *Tyrkiel E., Ludwicki J.K.*: Wpływ analogów DDT (nuarimolu i fenarimolu) na częstość występowania mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego i śledziony myszy. Roczn. PZH 1992, 43, 331.

27. *Tyrkiel E., Wiadrowska B., Ludwicki J.K.*: Indukcja mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego i krwi obwodowej myszy laboratoryjnych w warunkach ostrej lub podostrej ekspozycji na analogi DDT (nuarimol i fenarimol). Roczn. PZH 1996, 47, 151.

28. *Wild D.*: Cytogenetic effects in the mouse of 17 chemical mutagens and carcinogens evaluated by the micronucleus test. Mutation Res. 1978, 56, 319.

29. *Wolff M.S., Toniolo P.G.*: Environmental organochlorine exposure as a potential etiologic factor in breast cancer. Environ. Health Persp. 1995, 103 suppl 7, 141.

30. *Wright W.S.*: The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. Mutation Res. 1980, 75, 215.

Otrzymano: 1997.11.21