

MALGORZATA M. DOBRZYŃSKA

USZKODZENIA MATERIAŁU GENETYCZNEGO KOMÓREK
SOMATYCZNYCH MYSZY NARAŻANYCH NA MAŁE DAWKI
PROMIENIOWANIA X

DAMAGES OF GENETIC MATERIAL IN SOMATIC CELLS OF MICE
EXPOSED TO LOW DOSES OF X-RAYS

Zakład Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii
Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: dr *K.A. Pachocki*

W pracy przedstawiono wpływ subchronicznego napromieniania małymi dawkami promieniowania X na indukcję mikrojąder oraz pojedynczoniowych pęknięć DNA w komórkach szpiku kostnego myszy.

WSTĘP

Badania wpływu promieniowania jonizującego na organizm ssaków trwają od ponad 100 lat tj. niemal od momentu odkrycia w 1895 r. przez *W.K. Roentgena* promieni X. Szkodliwe działanie dużych dawek promieniowania znane jest od dawna. Spśród pierwszych badaczy promieniowania, którzy nieświadomi zagrożenia narażali się na napromienianie całego ciała dużymi dawkami, zmarło kilkaset osób. Głównymi przyczynami śmierci były nowotwory skóry i choroby krwi.

Promieniowanie jonizujące wywołuje zaburzenia i zmiany na wszystkich poziomach organizacji żywej materii, począwszy od cząsteczek, poprzez struktury wewnątrzkomórkowe, tkanki, narządy, aż do całego organizmu. W przeciwieństwie do dokładnie przebadanych skutków działania dużych dawek, efekty działania małych (tj. poniżej 0,5 Gy) dawek nie są jednoznaczne. Istnieją doniesienia świadczące o pozytywnym działaniu małych dawek promieniowania. Zjawisko to zwane hormezą obejmuje występowanie takich efektów jak stymulacja wzrostu i rozwoju, zwiększenie odporności immunologicznej, zmniejszenie wrażliwości na mutagenne i kancerogenne działanie późniejszego napromienienia dużymi dawkami [6, 22, 32, 34]. Wyniki innych badań świadczą natomiast, że nawet małe dawki mogą przyczyniać się do tworzenia bardzo aktywnych wolnych rodników, które powodują występowanie zaburzeń w strukturze i liczbie chromosomów [10, 16, 18, 19]. Wiadomo również, że małe dawki promieniowania jonizującego mogą powodować powstawanie nowotworów, chorób genetycznych i innych schorzeń [21, 24, 36, 37].

Skutek biologiczny zależy od wielkości i mocy dawki oraz od promieniowrażliwości poszczególnych komórek i tkanek. Największą wrażliwością charakteryzują się tkanki zło-

zione z młodych, intensywnie dzielących się komórek. Do grupy tej można zaliczyć m.in. komórki krwi dojrzewające w szpiku kostnym. U ludzi dawka progowa, po zastosowaniu której obserwuje się znaczne zmniejszenie produkcji krwinek wynosi w przypadku ostrego napromienienia całego szpiku kostnego 0,5 Gy, a w przypadku długotrwałej ekspozycji około 0,4 Gy w ciągu roku. Jednorazowe napromienienie dawkami pomiędzy 3 a 5 Gy powoduje śmierć połowy napromienionej populacji z powodu uszkodzenie szpiku kostnego [33].

Celem pracy było określenie wpływu subchronicznego napromieniania myszy małymi dawkami promieniowania X na indukcję pojedynczoniowych pęknięć DNA w limfocytach oraz na częstość występowania mikrojąder w retikulocytach i erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał doświadczalny stanowiły newsobne myszy Pzh:SFIS pochodzące z Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych Państwowego Zakładu Higieny. Zwierzęta przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze i wilgotności oraz z regulowanym automatycznie dobowym cyklem świetlnym (12 h ciemność/12 h światło). Przed rozpoczęciem badań myszy poddane były 7-dniowej aklimatyzacji. Samce w wieku 8 tygodni napromieniano na całe ciało 5 razy w tygodniu, przez 8 tygodni. Źródłem promieniowania X był terapeutyczny aparat rentgenowski THX-250 firmy Medicor (170 kV, 20 mV, filtracja dodatkowa 0,5 mm Cu, warstwa polówkowa 0,8 mm Cu). Moc dawki mierzona z pomocą dawkomierza Victoreen w MIX-D fantomie myszy umieszczonym w plastikowej tubie wynosiła 0,2 Gy/min. Każdorazowo dawki wynosiły 0,05 Gy; 0,10 Gy lub 0,20 Gy, tj. w ciągu 8 tygodni odpowiednio 2 Gy, 4 Gy i 8 Gy. Myszy nienapromieniane stanowiły grupę kontrolną. Myszy zabijano 24 h po ostatnim napromienieniu. Dokonano oceny indukcji mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych według metody *Schmida* [27] oraz w retikulocytach według metody *Hayashi* i wsp. [17] z niewielkimi modyfikacjami. Ponadto zastosowano metodę kometową do oceny pęknięć nici DNA w limfocytach zgodnie z procedurą opisaną przez *Singha* i wsp. [28] z modyfikacjami *Anderson* i wsp. [3].

Z myszy wypreparowywano kości udowe. Kanał szpikowy jednej z nich przepłukiwano surowicą płodową cielęcą. Po dokładnym wymieszaniu pobierano po 25 ml zawiesiny szpiku kostnego i nanoszono na szkiełka mikroskopowe pokryte wodnym roztworem oranżu akrydyny. Preparaty analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym zliczając po 1000 retikulocytów na mysz, jednocześnie oceniając liczbę retikulocytów z mikrojądrami. Pozostałą część zawiesiny szpiku kostnego w surowicy płodowej cielęcej wirowano i po usunięciu supernatantu wykonywano rozmary na szkiełkach mikroskopowych. Po wysuszeniu preparaty barwiono barwnikami May-Grunwalda i Giemsa, a następnie analizowano pod mikroskopem świetlnym. W celu oceny efektu cytotoksycznego, oceniano w nich stosunek erytrocytów polichromatycznych do normochromatycznych, zliczając 500 komórek obu typów. Oceniano również liczbę erytrocytów polichromatycznych z mikrojądrami w 2000 komórkach na mysz. Próby szpiku kostnego do oceny indukcji mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych szpiku kostnego pobierano również po upływie 72 h od zakończenia ekspozycji.

Myszy użyte do testu kometowego zabijane były po upływie 24 h, 1, 4 i 8 tygodni od ostatniego napromienienia. Szpik kostny pobrany z kości udowej i zawieszano w RMPI medium. Po dokładnym wymieszaniu, pobierano 10 ml zawiesiny i mieszano z 75 ml 0,5% agarozy o niskim punkcie topnienia (LMPA), następnie nanoszono na szkiełko mikroskopowe pokryte uprzednio agarozą o normalnym punkcie topnienia (NMPA). Preparaty przykrywano szkiełkami nakrywkowymi i umieszczano w lodówce na 5 minut w celu zestalenia się agarozy. Po usunięciu szkiełek nakrywkowych na preparaty nanoszono jeszcze jedną warstwę 0,5% agarozy i powtórnie zestalano w temperaturze

4°C. Następnie preparaty umieszczano w buforze lizującym na ok. 20 h w temperaturze 4°C. Po wyjęciu z buforu lizującego preparaty umieszczano w aparacie do elektroforezy zawierającym bufor do elektroforezy w środowisku alkalicznym (pH>13). Po 20 minutowej inkubacji komórek, przeprowadzano elektroforezę niskonapięciową (19 V, 300 mA) w temperaturze 4°C przez 20 minut. Preparaty neutralizowano buforem Tris, a następnie barwiono bromkiem etydydy (20 ml/ml). Preparaty analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Z każdej myszy zliczano po 200 komórek w dwóch preparatach. Zgodnie z zasadami opisanymi przez *Anderson* i wsp. [3], komórki dzielono wizualnie na 5 kategorii odpowiadających zawartości DNA w „ogonach komet”: A – nieuszkodzone (< 5%), B – z niewielkimi uszkodzeniami (5-20%), C – ze średnim poziomem uszkodzeń (20-40%), D – z wysokim poziomem uszkodzeń (40-95%), E – całkowicie uszkodzone (> 95%). Średnie uszkodzenie (migrację) DNA obliczano według wzoru:

$$\text{Średnie uszkodzenie DNA} = \% \text{ komórek kat. B} \times 2 + \% \text{ komórek kat. C} \times 3 + \\ \% \text{ komórek kat. D} \times 4 + \% \text{ komórek kat. E} \times 5$$

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono za pomocą testu *t-Studenta*, porównując wyniki uzyskane dla zwierząt z każdej z grup doświadczalnych z wynikami otrzymanymi dla zwierząt z grupy kontrolnej.

WYNIKI

Wyniki testu mikrojądrowego w retikulocytach oraz erytrocytach szpiku kostnego przedstawiono w tabeli I.

Po napromienianiu liczba retikulocytów z mikrojądrami zwiększyła się istotnie we wszystkich grupach doświadczalnych. Po narażeniu na dawkę 8x5x0,05 Gy liczba retikulocytów z mikrojądrami wzrosła prawie 3-krotnie, a po ekspozycji na dawkę 8x5x0,20 Gy ponad 4,5-krotnie w porównaniu do wartości obserwowanych u myszy kontrolnych.

Tabela I. Indukcja mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych oraz retikulocytach szpiku kostnego myszy
Induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes and reticulocytes of mouse bone marrow

| Dawka | Liczba komórek z mikrojądrami/1000 retikulocytów ± odchylenie standardowe (24h) | % erytrocytów polichromatycznych (24 h) | Liczba komórek z mikrojądrami/1000 erytrocytów polichromatycznych (24 h) | % erytrocytów polichromatycznych (72 h) | Liczba komórek z mikrojądrami/1000 erytrocytów polichromatycznych (72 h) |
|-------------|---|---|--|---|--|
| Kontrola | 2,2±1,79 | 45,9 | 4,4±1,95 | 45,9 | 3,0±0,94 |
| 8x5x0,05 Gy | 6,0±2,24* | 54,1 | 11,1±3,63** | 54,1 | 11,8±2,66*** |
| 8x5x0,10 Gy | 9,6±2,41** | 53,6 | 11,7±2,86*** | 53,6 | 8,5±1,77*** |
| 8x5x0,20 Gy | 10,2±3,70** | 53,4 | 12,2±6,01*** | 53,4 | 7,5±2,24** |

* – p<0,05; ** – p<0,01; *** p<0,001 – różnice statystycznie istotne w porównaniu do odpowiednich kontroli w teście *t-Studenta*

Tabela II. Uszkodzenia DNA w limfocytach szpiku kostnego myszy narażanych subchronicznie na promieniowanie X
DNA damages in bone marrow lymphocytes of mice subchronically exposed to X-rays

| Dawka | Czas po zakończeniu napromieniania | Średnie liczby komórek z różną zawartością DNA w ogonach komet ± odchylenie standardowe | | | Średnie uszkodzenie DNA | |
|-----------------|--|--|-----------|-----------|-------------------------------|-----------|
| | | >5 % | 5-20 % | 21-40 % | 41-95% <95% | |
| Kontrola | 24 h | 126,2±22,6 | 38,6±14,3 | 21,0±11,8 | 12,2±7,2 | 2,6±1,7 |
| 8 x 5 x 0.05 Gy | 24 h | 89,6±17,3 | 59,0±13,3 | 29,0±4,4 | 17,2±7,2 | 4,8±3,6 |
| 8 x 5 x 0.10 Gy | 24 h | 55,0±12,4 | 64,6±16,6 | 45,0±13,9 | 31,8±13,2 | 3,8±2,4 |
| 8 x 5 x 0.20 Gy | 24 h | 16,2± 2,6 | 56,8±12,2 | 66,8±14,2 | 51,6±18,0 | 8,4±4,7 |
| Kontrola | 1 tydzień | 112,0± 8,0 | 36,6±3,2 | 28,0±5,8 | 19,8±3,6 | 12,7±2,9 |
| 8 x 5 x 0.05 Gy | 1 tydzień | 71,2±19,1 | 59,0±10,6 | 29,0±12,8 | 32,8±5,5 | 7,6±3,4 |
| 8 x 5 x 0.10 Gy | 1 tydzień | 46,0±22,9 | 64,0±8,8 | 37,0±10,2 | 39,8±9,4 | 17,0±11,3 |
| 8 x 5 x 0.20 Gy | 1 tydzień | 34,2±12,3 | 70,2±8,2 | 37,4±10,5 | 41,8±9,6 | 14,4±4,5 |
| Kontrola | 4 tygodnie | 75,0±35,5 | 66,0±15,9 | 33,8±5,4 | 24,0±13,8 | 1,2±1,1 |
| 8 x 5 x 0.05 Gy | 4 tygodnie | 61,8±8,3 | 56,2±15,5 | 28,4±4,6 | 31,6±13,5 | 2,2±1,5 |
| 8 x 5 x 0.10 Gy | 4 tygodnie | 57,2±4,1 | 71,6±7,6 | 35,6±6,4 | 32,6±11,7 | 3,0±2,4 |
| 8 x 5 x 0.20 Gy | 4 tygodnie | 51,6±9,6 | 65,8±7,6 | 40,6±7,5 | 39,4±5,5 | 2,6± 1,8 |
| Kontrola | 8 tygodni | 85,6±9,3 | 58,0±4,9 | 30,8±4,9 | 25,4±4,8 | 0,2±0,5 |
| 8 x 5 x 0.05 Gy | 8 tygodni | 75,4±6,3 | 55,2±10,1 | 25,4±5,3 | 43,0±10,5 | 1,0±1,4 |
| 8 x 5 x 0.10 Gy | 8 tygodni | 63,2±5,3 | 61,0±7,2 | 32,5±7,7 | 43,8±5,1 | 0,5±0,6 |
| 8 x 5 x 0.20 Gy | 8 tygodni | 50,5±9,5 | 61,0±4,7 | 35,0±7,6 | 51,8±8,7 | 1,5±1,2 |

ns – brak różnic statystycznych; * p<0,05; ** p<0,01; *** – p<0,001 – różnice statystycznie istotne w porównaniu do odpowiednich kontroli w teście t-Studenta

Subchroniczna 8-tygodniowa ekspozycja myszy na małe dawki promieniowania nie powodowała zaburzeń w stosunku erytrocytów polichromatycznych do normochromatycznych szpiku kostnego. Liczba erytrocytów polichromatycznych z mikrojądrami po 24 h od zakończenia ekspozycji zwiększyła się we wszystkich grupach doświadczalnych ponad 2,5-krotnie w porównaniu do kontroli. Nie obserwowano jednak istotnych różnic pomiędzy grupami doświadczalnymi. Natomiast po 72 h liczba erytrocytów polichromatycznych z mikrojądrami w grupie narażonej na najmniejsze dawki pozostawała bez zmian, natomiast w dwóch pozostałych grupach zmniejszyła się o 30-40%.

Wyniki testu kometowego przedstawiono w tabeli II. Po upływie 24 h od zakończeniu napromieniania we wszystkich grupach doświadczalnych obserwowano zwiększoną migrację DNA. Procentowa zawartość DNA w „ogonach komet” zwiększała się wraz ze wzrostem dawki. Po upływie tygodnia od zakończenia ekspozycji obserwowano niewielkie zwiększenie migracji DNA zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupach 0,05 Gy i 0,10 Gy. Natomiast w grupie 0,20 Gy obserwowano zmniejszenie zawartości DNA w „ogonach komet” w porównaniu do rezultatów obserwowanych bezpośrednio po zakończeniu narażenia. Po 4 tygodniach od zakończenia narażenia stwierdzono zmniejszenie uszkodzeń DNA we wszystkich grupach. Po 8 tygodniach po zakończeniu ekspozycji średnie uszkodzenia DNA w grupie kontrolnej oraz po najmniejszej dawce powróciły do poziomu obserwowanego po upływie tygodnia od zakończenia ekspozycji. Natomiast w grupach 0,10 Gy oraz 0,20 Gy pozostały na poziomie podobnym do obserwowanego po 4 tygodniach.

DYSKUSJA

Wpływ napromieniania małymi dawkami na zdrowie człowieka jest przedmiotem dyskusji naukowych od wielu lat.

Zawodowe narażenie na promieniowanie jonizujące powoduje zwiększenie częstości występowania aberracji chromosomowych, nawet wtedy, kiedy otrzymane dawki roczne są niższe od przyjętych limitów [4, 5, 7, 9]. W badaniach wpływu zawodowego narażenia na małe dawki promieniowania jonizującego wykazano występowanie mikrojąder w hodowlach limfocytów krwi obwodowej różnych grup pracowników [15, 23, 26]. *Erexon* i wsp. [14] zanotowali występowanie mikrojąder w napromienionych promieniowaniem X limfocytach krwi obwodowej ludzi, myszy i szczurów.

W badaniach na zwierzętach laboratoryjnych obserwowano występowanie mikrojąder w erytrocytach szpiku kostnego lub krwi obwodowej po jednorazowym narażeniu na małe dawki promieniowania X lub γ . Efekt był najczęściej proporcjonalny do zastosowanej dawki, a największą częstość występowania mikrojąder notowano między 24 h a 30 h po zakończeniu napromieniania [1, 2, 11, 12, 20, 31]. We wcześniejszych badaniach własnych wykazano, że spośród zastosowanych w niniejszej pracy dawek, tylko jednorazowe narażenie na dawkę 0,05 Gy nie powodowało zwiększonej częstości występowania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych. Promieniowanie X w dawce 0,10 Gy było już mutagenna [11, 12]. Otrzymane w tej pracy rezultaty nie są więc niespodzianką, z drugiej jednak strony można byłoby spodziewać się sukcesywnej naprawy uszkodzeń. Badania *Plappert* i wsp., [25] wykazały, że w przypadku jednorazowego napromienienia dawka 1 Gy uszkodzenia były szybko naprawiane, natomiast w przypadku napromieniania frakcjonowanego, uszkodzenie były akumulowane, a szybkość naprawy znacznie malała.

U myszy napromienianych chronicznie małymi dawkami promieniowania γ obserwowano zwiększoną częstość występowania erytrocytów polichromatycznych i normochromatycznych z mikrojądrami w krwi obwodowej w trakcie oraz po zakończeniu narażenia [29, 38]. *Sypin* i wsp. [30] obserwowali zwiększoną częstość występowania mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych po rocznej ekspozycji myszy na dawkę 63 cGy promieniowania γ , nie było natomiast zwiększonej częstości występowanie mikrojąder w erytrocytach normochromatycznych.

Wyniki badań dotyczące indukcji mikrojąder przedstawione w niniejszej pracy stanowią więc potwierdzenie powyżej przedstawionych rezultatów. Zmniejszenie się częstości występowania mikrojąder po 72 h związane jest z przechodzeniem erytrocytów ze szpiku kostnego do krwi obwodowej.

Promieniowanie jonizujące było jednym z pierwszych przebadanych czynników, który charakteryzował się zdolnością do indukcji uszkodzeń DNA wykrywanych za pomocą testu kometowego. *Singh* i wsp. [28] wykazali zwiększoną migrację DNA limfocytów ludzkich napromienionych dawką 25 cGy promieniowania X. Również w badaniach własnych [13] obserwowano znaczną wrażliwość limfocytów szpiku kostnego myszy na indukcję uszkodzeń nici DNA wskutek jednorazowej ekspozycji. *Carrera* i wsp. [8] stwierdzili znaczną migrację DNA w komórkach wątroby myszy napromienionych jednorazowo dawkami od 0,5 Gy do 1,0 Gy promieniowania γ .

Vijalaxmi i wsp. [35] obserwowali rosnącą wraz z dawką długość ogonów komet w limfocytach ludzkich napromienionych dawkami od 0,1 Gy do 1 Gy promieniowania γ . Podobnie, w limfocytach ludzkich napromienianych dawkami od 0,05 Gy do 1 Gy promieniowania X obserwowano zwiększające się zależnie od dawki uszkodzenia DNA [25]. Zwiększoną częstość pęknięć nici DNA wykazano także w limfocytach myszy po rocznym napromienianiu całkowitą dawką 20 cGy [30].

Otrzymane rezultaty potwierdzają znaczną wrażliwość limfocytów krwi obwodowej na działanie małych dawek promieniowania X. Jakkolwiek, niewiele prac opublikowano na temat indukcji pojedynczoniowych pęknięć DNA w wyniku subchronicznej ekspozycji, efekty opisane po jednorazowym napromienieniu były wyraźne. W związku z tym, że limfocyty żyją zwykle kilka lat, a zaindukowane w nich zmiany utrzymują się przez dłuższy czas, wydają się być dobrymi komórkami wskaźnikowymi do oceny uszkodzeń powodowanych przez długotrwałe narażenie na czynniki szkodliwe.

WNIOSKI

1. 8-tygodniowe narażenie myszy na małe dawki promieniowania X powoduje uszkodzenia materiału genetycznego ich komórek somatycznych.

2. Efektem napromieniania myszy małymi dawkami jest występowanie zwiększonej liczby mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych oraz w retikulocytach szpiku kostnego.

3. Subchroniczna ekspozycja na promieniowanie X powoduje wystąpienie pojedynczoniowych pęknięć DNA w limfocytach szpiku kostnego. Uszkodzenia te mogą utrzymywać się co najmniej 8 tygodni po zakończeniu napromieniania.

4. Równoczesne zastosowanie testu mikrojądrowego i kometowego wydaje się być przydatne do badań populacji narażonych na małe dawki promieniowania jonizującego.

M. M. Dobrzyńska

DAMAGES OF GENETIC MATERIAL IN SOMATIC CELLS OF MICE EXPOSED
TO LOW DOSES OF X-RAYS

Summary

Pzh:SFIS mice were exposed during 8 weeks, 5 days per week to doses of 0,05 Gy; 0,10 Gy; 0,20 Gy of X-rays. Samples were taken at 24 h and at 72 h after the end of irradiation for micronucleus test, in the case of estimation induction of DNA damages also at 24 h and at 1, 4 and 8 weeks.

Subchronic exposure of mice to low doses of ionizing radiation induced damages of genetic material of theirs somatic cells. The enhanced frequency of micronuclei were observed in retikulocytes and polichromatic erythrocytes of bone marrow after each of dose. Subchronic exposure to X-rays induced also DNA single strand breaks in bone marrow lymphocytes. Damage were observed up to 8 weeks after the end of exposure. Results obtained in this study confirmed sensitivity of bone marrow cells to low doses of X-rays.

PIŚMIENNICTWO

1. *Abramsson-Zetterberg L., Zetterberg G., Grawe J.*: The time course of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutat. Res.* 1996, 350, 349-358.
2. *Abramsson-Zetterberg L., Grawe J., Zetterberg G.*: The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: the response to low doses of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. *Mutat. Res.* 1998, 423, 113-124.
3. *Anderson D., Yu T.-W., Philips B.J., Schmezer P.*: The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. *Mutat Res.* 1994, 370, 159-174.
4. *Balakrishnan S., Rao B.*: Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of occupational workers exposed to low levels of ionising radiation. *Mutat. Res.* 1999, 442, 37-42.
5. *Bauchinger M., Schmidt E., Braselmann H.*: Cytogenetic evaluation of occupational exposure to external g-rays and internal ²⁴¹Am contamination. *Mutat Res.* 1997, 280, 215-223.
6. *Calabrese E.J. and Baldwin L.A.*: Radiation hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. *Belle Newsletter* 1999, 8, 2-37.
7. *Cardoso R.S., Takahashi-Hyodo, S. Peitl P. Jr, Ghilardi-Neto T. and Sakamoto-Hojo E.T.*: Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 2001, 21, 431-39.
8. *Carrera P., de Miguel M., Lopez J., de la Torre C., Navarrete M.H.*: *In vivo* response of mouse liver to g-radiation assessed by the comet assay. *Mutat. Res.* 1998, 413, 23-31.
9. *Chung H.W., Ryu E.K., Kim Y.J., Ha S.W.*: Chromosome aberrations in workers of nuclear-power plants. *Mutat Res.* 1996, 350, 307-314.
10. *Dizdaroglu M.*: Measurement of radiation-induced damage to DNA at the molecular level. *Int. J. Radiat. Biol.* 1992, 61, 175-183.
11. *Dobrzyńska M.M. and Gajewski A.K.*: Induction of micronuclei in bone marrow and sperm head abnormalities after combined exposure of mice to low doses of X-rays and acrylamide. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 2000, 20, 133-140.
12. *Dobrzyńska M.M.*: Micronucleus formation induced by combination of low doses of X-rays and antineoplastic drugs in bone marrow of male mice. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 2000, 20, 321-327.

13. *Dobrzyńska M.M.*: An investigation of bone marrow and testicular cells in vivo using the comet assay. International Comet Workshop, Ulm, 2001, 29.
14. *Erexson G.L., Kligerman A.D., Bryant M.F., Sontag M.R., Halperin E.C.*: Induction of micronuclei by X-radiation in human, mouse and rat peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.* 1991, 253, 193-198.
15. *Fenech M., Morley A.A.*: Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 1985, 147, 29-36.
16. *Fuks Z. and Weichselbaum R.R.*: Radiation Therapy; w: The Molecular Basis of Cancer ed. J. Mendelsohn, P. Howley, M.A. Israel and L.A. Liotta, Saunders, Philadelphia, 1995, 401-431.
17. *Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T. and Ishidate Jr. M.*: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.*, 1990, 245, 245-249.
18. *Huttermann J., Lange M. and Ohlmann J.*: Mechanistic aspects of radiation-induced free radical formation in frozen aqueous solutions of DNA constituents: consequences for DNA? *Radiat. Res.* 1992, 131, 18-23.
19. *Huttermann J., Rohig M., Kohnlein W.*: Free radicals from irradiated lyophilized DNA: influence of water on hydration. *Int. J. Radiat. Biol.* 1992, 61, 299-313.
20. *Jageta G.C., Ganapathi N.G.*: Radiation-induced micronucleus formation in mouse bone marrow after low dose exposures. *Mutat. Res.*, 1994, 304, 235-242.
21. *Latarjet R., and Modan B.*: Low dose radiation carcinogenesis. *Eur J. Cancer* 1992, 28A, 1010-1012.
22. *Luckey T.D.*: Radiation Hormesis. CRC Press., Boca Raton FL, 1991.
23. *Mitchell J.C., Norman A.*: The induction of micronuclei in human lymphocytes by low doses of radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 1987, 52, 527-535.
24. *Morris J.A.*: Low dose radiation and childhood cancer. *J. Clin. Pathol.* 1992, 45, 378-381.
25. *Plappert U., Raddatz K., Roth S., Fliedner T.M.*: DNA-damage detection in man after radiation exposure – the comet assay – its possible application for human biomonitoring. *Stem Cells* 1995, 13, Suppl 1, 215-22.
26. *Ramalho A., Sunjevari I., Natarajan A.T.*: Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of methods, *Mutat. Res.* 1988, 207, 141-146.
27. *Schmid W.*: The micronucleus test. *Mutat. Res.* 1975, 31, 9-15.
28. *Singh N.P., MacCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L.*: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988, 175, 184-91.
29. *Sorensen K.J., Zetterberg L.A., Nelson D.O., Grawe J., Tucker J.D.*: The in vivo dose rate effect of chronic gamma radiation in mice: translocation and micronucleus analyses. *Mutat. Res.* 2000, 457, 1-2, 125-36.
30. *Sypin V.D., Osipov A.N., Elakov A.L., Pomarantseva M.D., Zaichkina S.I., Rozanova O.M., Ramaiia L.K., Klovov D.I., Puchkov P.V., Akhmadieva A.K., Apikaeva G.F., Miazin A.E., Sycheva L.P., Kiiatkina M.A.*: Estimation of genetic effects of chronic exposure to low-dose rate gamma-radiation by cytogenetic methods and DNA-comet assay. *Radiats Biol Radioecol.* 2003, 43, 2, 156-60.
31. *Uma Devi P., Sharma A.S.K.V.S.*: Mouse bone marrow response to low doses of whole-body gamma irradiation: induction of micronuclei. *Int. J. Radiat. Biol.* 1990, 57, 97-101.
32. UNSCEAR United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and Effects of Ionizing Radiation. United Nations. New York, 1982.
33. UNSCEAR United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and Effects of Ionizing Radiation. United Nations. New York, 1993.
34. *Upton A.C.*: Radiation Hormesis: Data and Interpretations. *Crit. Rev. Toxicol.* 2001, 31, 4&5, 681-95.

35. *Vijayalaxami, Tice R.R., Straus G.H..S.*: Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat. Res.* 1992, 271, 243-52.
36. *Vogel F.*: Risk calculations for hereditary effects of ionizing radiation in human. *Hum. Genet.* 1992, 89, 127-146.
37. *Weinstein I.B., Carothers R.M., Santella R.M. and Perera F.P.*: Molecular mechanisms of mutagenesis; w: *The Molecular Basis of Cancer* ed. J.P. J. Mendelsohn, P. Holwey, M.A. Israel and L.A. Liotta, Saunders, Philadelphia, 1995, 59-85.
38. *Zetterberg G. Grawe J.*: Flow cytometric analysis of micronucleus induction in mouse erythrocytes by γ -irradiation at very low dose-rates. *Int J Radiat Biol.* 1993, 64, 5, 555-564.

Otrzymano: 2004.05.05