

# Radiobiología

Revista electrónica

---

ISSN 1579-3087

<http://www-rayos.medicina.uma.es/rmf/radiobiologia/revista/radiobiologia.htm>

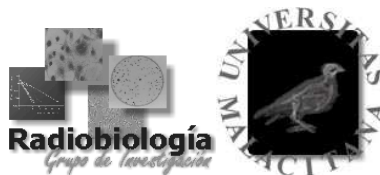
[http://www-rayos.medicina.uma.es/rmf/radiobiologia/revista/numeros/RB7\(2007\)166-173.pdf](http://www-rayos.medicina.uma.es/rmf/radiobiologia/revista/numeros/RB7(2007)166-173.pdf)

Radiobiología 7 (2007) 166-173

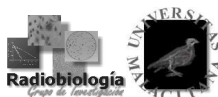
## **Evaluación del efecto genotóxico por exposición crónica a dosis bajas de radiación ionizante a través de un modelo *in vitro***

**Alba M. Güerci, Claudia A. Grillo**

CIGEBA (Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada)  
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata, Argentina



**Edita:** Grupo de Investigación de Radiobiología.  
Dpto. Radiología y Medicina Física. Universidad  
de Málaga (España)



Edita: Grupo de Investigación de Radiobiología  
Dpto. Radiología y Medicina Física  
Universidad de Málaga (España)

Radiobiología 7 (2007) 166-173

Radiobiología

Revista electrónica

<http://www.rayos.medicina.uma.es/rmf/radiobiologia/revista/radiobiologia.htm>

## Evaluación del efecto genotóxico por exposición crónica a dosis bajas de radiación ionizante a través de un modelo *in vitro*

Alba M. Güerci \*, Claudia A. Grillo

CIGEBA (Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada). Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Nacional de La Plata, Calle 60 y 118, CC 296 B1900AVW La Plata, Argentina  
Tel./Fax: 054-0221-4211799 \* E-mail: [albaguerci@fcv.unlp.edu.ar](mailto:albaguerci@fcv.unlp.edu.ar)

### Resumen

Está ampliamente aceptado que los efectos genotóxicos producidos por exposición a radiación ionizante surgen como consecuencia de la inducción en forma directa y/o indirecta de rupturas en la molécula de ADN. Se evaluó el efecto mutagénico producido por exposición crónica a rayos X en sistemas celulares normales (CHO-K1) y deficientes en mecanismos de reparación (*xrs-5*) mediante la versión alcalina del ensayo cometa. Las células se sometieron a 10 exposiciones diarias de 10 mGy cada una e inmediatamente después se dividieron en dos fracciones: una de ellas para continuar el tratamiento crónico y la otra para la implementación del ensayo. Las células sin daño (grado 0) se compararon con células con bajo nivel de daño (grado 1 y 2) y con alto nivel de daño (grados 3, 4 y apoptosis). Para cada punto experimental se realizaron dos experimentos independientes analizando un total de 200 imágenes por tratamiento. Teniendo en cuenta el diseño empleado, los resultados obtenidos corroboraron la mayor sensibilidad esperada en la línea *xrs-5*. Por otro lado, la evaluación grupal y comparativa entre las líneas estudiadas mostró un incremento significativo ( $p < 0,001$ ) en cuanto a la cantidad de células con daño para las células sensibles a la radiación. Específicamente, la magnitud del mismo se manifestó predominantemente por la observación de cometas de grado 1 y 2, no detectándose figuras apoptóticas y/o necróticas. Lo expuesto podría ser atribuido a la exposición de la cromatina en el momento de la irradiación, debido a la organización nuclear diferencial entre ambas líneas.

**Palabras clave:** Efecto genotóxico, radiación, dosis bajas, exposición crónica, ensayo cometa

### INTRODUCCIÓN

Es un hecho ampliamente aceptado que la radiación produce efectos genotóxicos en los organismos expuestos. No obstante, se conoce poco acerca de la exposición crónica a dosis bajas de radiación ionizante (RI). La estimación de los diversos tipos de daño a nivel subcelular, celular y supracelular inducidos por estas dosis generalmente está basada en la extrapolación lineal de datos provenientes de exposiciones simples a dosis relativamente altas (Rozgaj et al., 1999; Natarajan et al., 1998; Hagelström et al., 1995). Consecuentemente, la evaluación del riesgo se sustenta sobre eventos puntuales y agudos.

Si bien existen estudios que refieren a este tipo de exposición, éstos han sido llevado a cabo *in vivo* con poblaciones humanas expuestas, como por ejemplo, los realizados en trabajadores hospitalarios del área de radioterapia y radiodiagnóstico (Güerci et al., 2006; Angelini et al., 2005; Bonassi et al., 1997; Paz-y-Miño et al., 1995; Barquinero et al., 1993), en residentes de ambientes radioactivos (Hsieh et al., 2001) y en aeronavegantes (Cavallo et al., 2002; Ballard et al., 2000; Rafnsson et al., 2000; Heimers 2000; Obe et al., 1997; Romano et al., 1997; Heimers et al., 1995). Por lo tanto, los mecanismos de acción deben ser mejor dilucidados. Por otra parte, aunque se han realizado estudios *in vitro*, a fin de evitar la influencia de factores de confusión que afectan la interpretación de los estudios epidemiológicos, los mismos se han desarrollado con dosis altas y únicas.

De acuerdo a lo expuesto, se evidencia la necesidad de modelos experimentales *in vitro* que simulen la cronicidad de la radiación mediante ensayos específicos, a fin de detectar alteraciones celulares consecuentes a este tipo de exposición. En referencia, dentro de los test utilizados frecuentemente en radiobiología, el ensayo de electroforesis de células aisladas, también llamado Cometa, es un método rápido para la evaluación cuantitativa de rupturas de ADN de simple y doble cadena (SSB, DSB respectivamente) y sitios lábiles al álcali (Singh et al., 1988; Tice et al., 1990; Fairbain et al., 1995; Olive, 1999; Singh et al., 1994).

En el presente trabajo se desarrolló un modelo experimental *in vitro* que involucra la exposición secuencial a dosis bajas de radiación de baja transferencia lineal de energía (LET) de células de mamífero. El diseño consideró líneas celulares, salvajes y mutantes, utilizadas frecuentemente en estudios de mutagénesis. El uso de células mutantes, con una organización citoplásmica y nuclear diferencial, como así también patrones deficientes de reparación del ADN podría ser de suma utilidad en la identificación de los diferentes tipos de efectos biológicos inducidos.

El propósito de esta investigación fue evaluar el grado de daño inducido por exposición crónica a dosis bajas de rayos X a través del ensayo Cometa en la línea CHO-K1 y su mutante deficiente en la reparación de DSBs, xrs-5.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Líneas celulares

Se utilizó la línea celular CHO-K1 y su mutante radiosensible xrs-5. Las mismas se obtuvieron del Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, State University of Leiden, Netherlands. Se cultivaron en monocapa a temperatura (37° C) y atmósfera controlada (5 % de CO<sub>2</sub>) utilizando medio de cultivo Ham F-10 (GIBCO-BRL, Los Angeles, USA) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (Natocor, Carlos Paz, Córdoba, Argentina) y antibióticos (Penicilina 50 UI/ml, Estreptomina 50µg/ml).

Estas líneas se utilizan frecuentemente en estudios de mutagénesis, radiosensibilidad celular y metabolismo de macromoléculas. La xrs-5 deriva de la Chinese hamster ovary (CHO) K-1, es defectiva en recombinación V(D)J y fue la primera línea mutante de mamífero que se describió con defectos en la reparación de rupturas de doble cadena (DSB) (Jeggo y Kemp, 1983; Kemp et al., 1984; Taccioli et al., 1994).

### Diseño Experimental

El efecto genotóxico de la exposición crónica a bajas dosis de rayos X fue evaluado en las dos líneas celulares descritas, mediante el Ensayo de Electroforesis de Células Aisladas (Cometa). Previamente, células de ambos tipos fueron sometidas a pruebas de viabilidad mediante el método de exclusión de Trypan Blue (Sigma, St Louis, MO, USA). En todos los casos la viabilidad superó el 90 %.

Las células se expusieron de manera crónica a 10 ciclos de irradiación. El tratamiento radiante con rayos X se realizó una vez por ciclo cuando las células estaban en estado quiescente. Se utilizó un equipo odontológico modelo MCX, de 60 Kv y 10 mA (Dental San Justo, SA, Buenos Aires, Argentina) con una tasa de dosis de 1,66 mGy. De manera paralela cada serie experimental se acompañó con el correspondiente control negativo (células sin irradiar). La dosis de radiación empleada fue de 10 mGy teniendo en cuenta la dosimetría publicada en trabajos previos (Güerci et al., 2004) y estudios epidemiológicos (Barquinero et al., 1993, Paz-y-Miño et al., 1995, Balakrishnan y Rao 1999, Heimers 2000, Cardoso et al., 2001, Cavallo et al., 2002).

En todos los experimentos las células se lavaron dos veces con solución salina de PBS y se irradiaron en esta solución a temperatura ambiente y en condiciones de mínima exposición lumínica. Inmediatamente después los cultivos se tripsinizaron y resuspendieron en medio fresco. En cada punto del procedimiento serial se realizó una dilución 1:2 que permitió continuar con la exposición crónica y la implementación del ensayo Cometa.

### Ensayo Cometa

Es un método ampliamente utilizado en pruebas de Genética Toxicológica para evaluar daño y reparación del ADN inducido por diferentes agentes. Se realizó de acuerdo al método de Singh y colaboradores (1988) con modificaciones menores (Tice y Strauss, 1995).

Una fracción de 75  $\mu$ l de 0,5 % de agarosa de bajo punto de fusión (GIBCO BRL, Los Angeles, USA) se mezcló con aproximadamente  $1,5 \times 10^4$  células suspendidas en un volumen de 15  $\mu$ l. Esta suspensión se ubicó sobre un portaobjeto previamente cubierto con una lámina de agarosa normal (GIBCO BRL, Los Angeles, USA) al 0,5 % y se la protegió inmediatamente con un cubreobjeto. Después de la solidificación a 4° C por 10 minutos, los cubres se removieron y las laminas se sumergieron en solución de lisis, durante al menos dos horas a 4° C (2,5 M NaCl, (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA) 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA) 10 mM Tris, pH 10) conteniendo 1% Triton X-100 (Sigma, St Louis, MO, USA) y 10% dimetilsulfóxido (Merck Química Argentina SAIC), añadidos en el momento de uso. En una etapa posterior los portaobjetos se equilibraron en solución alcalina (1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaOH (Farmitalia Carlo Erba SpA, Milano, Italy), pH>13) por 20 minutos. La electroforesis fue llevada a cabo durante 25 minutos a 25 V y 250 mA (1,25 V/cm). A continuación, se neutralizaron lavando tres veces con solución tamponada de Tris (pH 7,5) cada 5 minutos y finalmente con agua destilada. Las láminas se tiñeron con una solución de 1/1000 SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) (Ward y Marples 2000).

Para cada punto experimental se realizaron dos experimentos independientes analizando un total de 200 imágenes por tratamiento (100 por repetición).

### Análisis de Imágenes

Las observaciones se realizaron con un aumento de 400X utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX 40, provisto con una lámpara de mercurio y un filtro de excitación de 515-560 nm) conectado a una cámara de video color Sony CCD-IRIS. Las imágenes de cada célula individual fueron capturadas y grabadas inmediatamente utilizando el programa Image Pro Plus 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Los cometas se clasificaron según la longitud de la cola en cinco categorías jerarquizadas desde 0 (cola no visible) a 4 (cabeza muy pequeña y máxima cantidad de ADN en la cola). Adicionalmente, un sexto grupo incluyó células apoptóticas con morfología particular (Figura 1) (Olive et al., 1998).

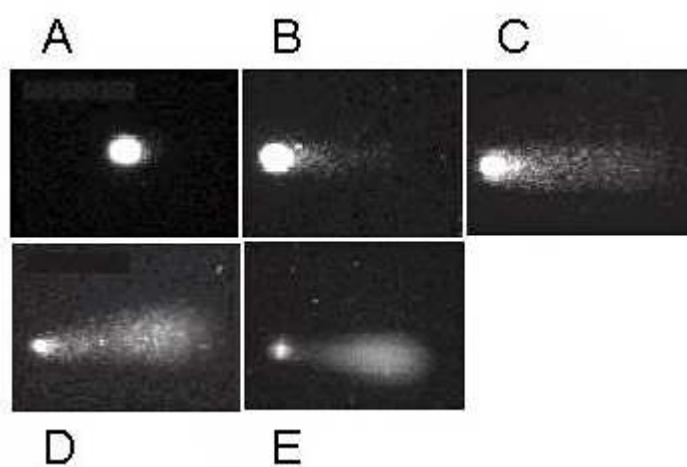


Figura 1. Categorías jerarquizadas del daño de los cometas analizados. A. Grado 1; B. Grado 2; C. Grado 3; D. Grado 4; E. Apoptosis.

### Análisis Estadístico

El efecto del tratamiento radiante sobre la frecuencia de células con daño se analizó usando el test de  $\chi^2$ . Las células sin daño (grado 0) se compararon con células con bajo daño (grados 1-2) y con daño severo (grados 3-4 y apoptosis).

## RESULTADOS

La figura 2 muestra los porcentajes de células con daño en las líneas estudiadas. En la línea CHO-K1 el tratamiento con 10 mGy de rayos X incrementó significativamente ( $p < 0,001$ ) la frecuencia de cometas de grado 1 y 2, con respecto a sus respectivos controles. La relación del daño entre células irradiadas y sus controles es 2,6. Con respecto a la mutante defectiva este cociente alcanza un valor de 2,25.

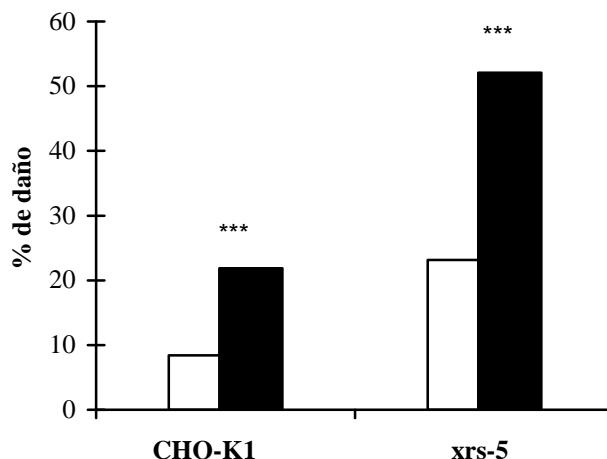


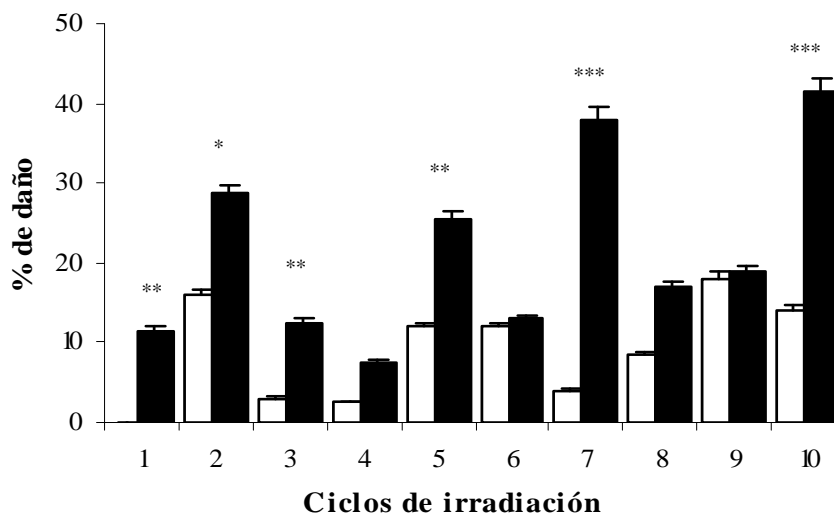
Figura 2. Porcentaje de daño en células de la línea CHO-K1 y xrs-5 durante los 10 ciclos de irradiación. Barras blancas, células sin tratar. Barras negras células tratadas con 10 mGy. La significancia estadística (usando  $\chi^2$ ) demuestra diferencias entre los tratamientos y sus respectivos controles. (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

El nivel de daño basal en las líneas celulares estudiadas mostró un incremento significativo ( $p < 0,001$ ) de las lesiones de bajo orden. El análisis comparativo del tratamiento radiante, evidenció un aumento 2,38 veces superior en la línea xrs-5. Además, no se detectaron aumentos de las frecuencias de células apoptóticas o necróticas ni tampoco de daño severo (grados 3 y 4) (Figura 2).

El análisis del daño a lo largo de los subsecuentes ciclos de irradiación tanto en la línea CHO-K1 como en su mutante no demuestra un efecto acumulativo dependiente del número de exposiciones. Consecuentemente, los valores de los coeficientes de correlación son 0,48 y 0,41 respectivamente.

La evaluación secuencial del daño en la línea salvaje (CHO-K1) muestra una tendencia cíclica a través de los 10 ciclos de irradiación. Se observa una magnificación del mismo en las poblaciones tratadas en referencia a cada uno de los respectivos controles (Figura 3 A). Con respecto a la línea mutante (xrs-5) sin bien el comportamiento es similar, la cuantificación del daño, en cada punto experimental alcanza valores superiores (Figura 3 B).

## A) CHO-K1



## B) xrs-5

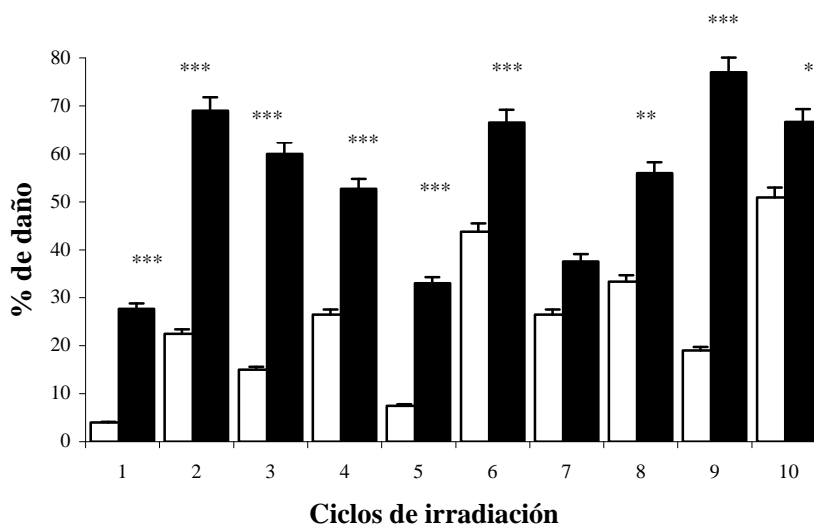


Figure 3. Porcentaje de daño en cada uno de los ciclos de irradiación. Barras blancas, controles. Barras negras células tratadas con 10 mGy. La significancia estadística (usando  $\chi^2$ ) demuestra diferencias entre los tratamientos y sus respectivos controles. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## DISCUSIÓN

El material genético de los organismos es particularmente sensible a la radiación, por lo tanto el daño genotóxico se manifiesta con dosis bajas de tan sólo 1 mGy (Bonner, 2003). La existencia de una variabilidad de respuesta, desde esta perspectiva, permite distinguir una radiosensibilidad particular en los diferentes niveles de organización, que repercute en el enfoque sistémico del daño en los individuos. De acuerdo a lo expuesto, se hace evidente la necesidad de ensayos *in vitro* que permitan clarificar los procesos y mecanismos moleculares implicados en la reconversión del daño a nivel celular.

El presente estudio se llevó a cabo a fin de investigar el grado de daño radioinducido por exposición crónica en células deficientes en mecanismos de reparación del ADN, en referencia a su línea de origen. De

esta manera, la utilización de líneas isogénicas específicas podría contribuir a la identificación de lesiones inducidas en el ADN, responsables de los distintos efectos biológicos. Particularmente, la línea xrs-5 presenta defectos en el mecanismo de recombinación no homóloga, como así también irregularidades en la estructura de la cromatina y morfología de la membrana nuclear (Darroudi y Natarajan, 1989; Yasui et al., 1991). Al respecto, Korte y Yasui (1993) evidenciaron una mayor separación de esta membrana que podría ser un factor importante para la radiosensibilidad. Por otra parte, se ha sugerido que la mayor compactación de la cromatina juega un papel protector reduciendo el acceso de radicales libres al ADN y contribuyendo en la estabilidad de la molécula frente a las radiaciones (Radulescu et al., 2004).

Es importante destacar, que en el momento de la implementación del ensayo, no es posible poner de manifiesto la deficiencia en los mecanismos de reparación de la línea, en tanto que el mismo se realizó de manera inmediata a cada uno de los ciclos de irradiación. Así, las lesiones observadas estarían representando la resultante entre el efecto directo e indirecto de la radiación y los mecanismos de recuperación celular que se activan para compensarlo.

En principio, teniendo en cuenta el nivel de daño basal, se asume que el observado en la línea mutante, alcanza valores superiores, en tanto su condición constituye un nivel de estrés oxidativo, más fácilmente alcanzable. Además, un análisis genérico del tratamiento radiante, considerando la cuantificación de células dañadas, demuestra que las xrs-5 presentan un incremento del daño que duplica al encontrado en la línea CHO-K1. Este hecho podría abordarse desde la organización diferencial de la cromatina entre ambas líneas.

La evaluación secuencial del daño, bajo la perspectiva del modelo crónico realizado, muestra un incremento significativo, exacerbado en ciertos ciclos, que podría ser justificado a través de efectos indirectos de la radiación como el "bystander effect". Al respecto, diversos autores mencionaron la relevancia de este fenómeno en las mismas líneas celulares, pero sólo desde la perspectiva de exposiciones simples (Nagasawa y Little, 2002; Kashino et al., 2007). De esta manera y coincidiendo con estos trabajos, se propone que un aumento en las especies reactivas de oxígeno (mediadoras del efecto) estaría contribuyendo cíclicamente a incrementar el daño previo observado. Así, el ambiente oxidativo constante al que estarían sujetas las células debido a la cronicidad de la exposición, podría constituirse por una retroalimentación de factores clastogénicos que reinician el ciclo, manifestado en nuestro estudio por un aumento del daño observado.

Teniendo en cuenta el valor de la dosis utilizada y el fenómeno mencionado, el tipo de daño encontrado podría responder, en parte, tanto a los bajos niveles de exposición como a la calidad de la radiación, en este caso de bajo LET (Güerci et al., 2003). Los resultados del presente trabajo muestran que las lesiones observadas corresponden a daño leve, lo cual podría ser atribuido mayoritariamente a lesiones de simple cadena y daño de bases. Coincidiendo con estudios previos, el nivel de daño impartido por estas condiciones no es suficiente para inducir mecanismos de señalización que involucren rutas hacia apoptosis (Güerci et al., 2005).

Considerando lo expuesto mediante el presente trabajo se propuso demostrar el efecto genotóxico de la exposición crónica a nivel celular a bajas dosis de radiación ionizante, intentando lograr una interpretación más acabada, sistemática y precisa de los mecanismos a través de los cuales este agente ejerce su acción.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del "Proyecto integrado de mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis ambiental" del "Programa de Incentivos para Docentes-Investigadores de Universidades Nacionales" (11V108 UNLP 2004 – 2007).

## REFERENCIAS

- Angelini S, Kumar R, Carbone F, Maffei F, Forti GC, Violante FS, Lodi V, Curti S, Hemminki K, Hrelia P. Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes. *Mutat Res*, 2005, 570:105–117.
- Balakrishnan S, Rao SB. Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of occupational workers exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat Res*, 1999, 442:37-42.

- Ballard T, Lagorio S, De Angelis G, Verdecchia A. Cancer incidence and mortality among flight personnel: a meta-analysis. *Aviat Space Environ Med*, 2000, 71:217-224.
- Barquinero J, Barrios L, Caballin M, Miro R, Ribas M, Subías A, Egozcue J. Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat Res*, 1993, 286: 275-279.
- Bonassi S, Forni A, Bigatti P, Canevarollo N, De Ferrari M, Lando C, Padovani P, Bevegni M, Stella M, Vecchio D, Puntoni R. Chromosome aberrations in hospital workers: evidence from surveillance studies in Italy (1963-1993). *Am J Ind Med*, 1997, 31:353-360.
- Bonner W. Low-dose radiation: Thresholds, bystander effects, and adaptive response. *PNAS*, 2003, 100:4973-4975.
- Cardoso R, Takahashi-Hyodo S, Peitl Pjr, Ghilardi-Neto T, Sakamoto-Hojo E. Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 2001, 21:431-439.
- Cavallo D, Marinaccio A, Perniconi B, Settini A, Palmi S, Iavicoli S. Chromosomal aberration in long-haul air crew members. *Mutat Res*, 2002, 513:11-15.
- Darroudi F, Natarajan AT. Cytogenetical characterization of Chinese hamster ovary X-ray sensitive mutant cells xrs-5 and xrs-6. III Induction of cell killing chromosomal aberrations and sister-chromatid exchange by bleomycin, mono- and bi-functional alkylating agents. *Mutat Res*, 1989, 212: 123-135.
- Fairbairn D, Olive O, O'Neill K. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, 1995, 175:37-59.
- Güerci AM, Dulout FN, Seoane AI. Cytogenetic analysis in Chinese hamster cells chronically exposed to low doses of X-rays. *Int J Radiat Biol*, 2003, 79:793-799.
- Güerci AM, Dulout FN, Seoane AI. DNA damage in Chinese hamster cells repeatedly exposed to low doses of x-rays. *Cytogen Genome Res*, 2004, 104:173-177.
- Güerci AM, Grillo CA, Dulout FN, Seoane AI. Assessment of genotoxic damage in lymphocytes of hospital workers exposed to ionizing radiation in Argentina. *Arch Environ Occup Health*, 2006, 61:163-9.
- Hagelstrom A, Gorla N, Larripa I. Chromosomal damage in workers occupationally exposed to chronic low level ionizing radiation. *Toxicol Lett*, 1995, 76:113-117.
- Heimers A, Schroder H, Lengfelder E, Schmitz-Feurhake I. Chromosome aberration analysis in air crew member. *Radiat Prot Dosim*, 1995, 60:171-175.
- Heimers A. Chromosome aberration analysis in Concorde pilots. *Mutat Res*, 2000, 467, 169-176.
- Hsieh WA, Lucas JN, Hwang JJ, Chang CC, Chang WP. Biodosimetry using chromosomal translocations measured by FISH in a population chronically exposed to low dose-rate 60 Co gamma irradiation. *Internat J Radiat Biol*, 2001, 77: 797-804.
- Jeggo PA, Kemp LM. X-ray-sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell line. Isolation and cross-sensitivity to other DNA-damaging agents. *Mutat Res*, 1983, 112:313-27.
- Kashino G, Suzuki K, Matsuda N, Kodama S, Ono K, Watanabe M, Prise KM. Radiation induced bystander signals are independent of DNA damage and DNA repair capacity of the irradiated cells. *Mutat Res*, 2007, 619:134-138.
- Kemp LM, Sedgwick SG, Jeggo PA. X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells defective in double-strand break rejoining. *Mutat Res*, 1984, 132:189-96.
- Korte CC, Yasui LS. Morphological characterization of the radiation sensitive cell line, xrs-5. *Scan Microscopy*, 1993, 7: 943-951.
- Nagasawa H, Little JB. Bystander effect for chromosomal aberrations induced in wild-type and repair deficient CHO cells by low fluences of alpha particles. *Mutat Res*, 2002, 508:121-9.
- Natarajan AT, Santos SJ, Darroudi F, Hadjidikova V, Vermeulen S, Chatterjee S, Berg M, Grigorova M, Sakamoto-Hojo ET, Granath F, Ramalho AT, Curado MP. 137Cesium-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization: eight years follow up of the Goiana accident victims. *Mutat Res*, 1998, 400: 299-312.
- Obe G, Johannes I, Johannes SC, Hallman K, Reitz G, Facius R. Chromosomal aberrations in blood lymphocytes of astronauts after long-term space flights. *Internat J Radiat Biol*, 1997, 72: 727-734.
- Olive PL. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol*, 1999, 75:395-405.
- Olive PP, Johnston J, Banáth R, Durand. The comet assay: a new method to examine heterogeneity associated with solid tumors. *Nature Med*, 1998, 4:103-105.
- Paz-y-Miño C, Leone P, Chavez M, Bustamante G, Córdoba A, Gutierrez S, Penaherrera MS Sanchez M. Follow up study of chromosome aberrations in lymphocytes in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat Res*, 1995, 335:245-251.



- Radulescu I, Elmoroth K, Stenerlow B. Chromatin organization contributes to non-randomly distributed double-strand breaks after exposure to high-LET radiation. *Radiat Res*, 2004, 161:1-8
- Rafnsson V, Hrafnkelsson J, Tulinius H. Incidence of cancer among commercial airline pilots. *Occupat Environ Med*, 2000, 57:175-179.
- Romano E, Ferrucci L, Nicolai F, Derme D, De Stefano G. Increased of chromosomal aberrations induced by ionizing radiation in peripheral blood lymphocytes of civil aviation pilots and crew members. *Mutat Res*, 1997, 337: 89-93.
- Rozgaj R, Kasuba V, Sentija K, Prlic, I. Radiation-induced chromosomal aberrations and hematological alterations in hospital workers. *Occup Med*, 1999, 49: 353-360.
- Singh N, Mc Coy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*, 1988, 175: 84-191.
- Singh NP, Stephens RE, Schneider EL. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol*, 1994, 66:23–28.
- Taccioli GE, Cheng HL, Varghese AJ, Whitmore G, Alt FW. A DNA repair defect in Chinese hamster ovary cells affects V(D)J recombination similarly to the murine scid mutation. *J Biol Chem*, 1994, 269:7439-42.
- Tice RR, Andrews PW, Singh NP. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: Sutherland BM, Woodhead AD, (Eds.) *DNA Damage and Repair in Human Tissues*. New York: Plenum Press, 1990, 291–301.
- Tice RR, Strauss GH. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells*, 1995, 13:207–214.
- Ward TH, Marples B. Technical report SYBR Green I and the improved sensitivity of the single-cell electrophoresis assay. *Int J Radiat Biol*, 2000, 76: 61-65.
- Yasui LS, Ling-Indek L, Johnson-Wint B, Fink TJ, Molsen D. Changes in the nuclear structure in the radiation sensitive CHO mutant cell, xrs-5. *Radiat Res*, 1991, 127:269-277.