

TEST MIKROJĄDROWY W RETROSPEKTYWNEJ DOZYMETRII BIOLOGICZNEJ

MICRONUCLEUS ASSAY IN RAPID RETROSPECTIVE BIOLOGICAL DOSIMETRY

Kamila Rawojć

Ewa Stępień

Instytut Fizyki M. Smoluchowskiego
Wydział Fizyki Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytet Jagielloński
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków
e-mail: kamila.rawojc@uj.edu.pl

Justyna Miszczyk

Zakład Fizyki Doświadczalnej Układów Złożonych
Instytut Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego
Polska Akademia Nauk
ul. Radzikowskiego 152
31-342 Kraków

Abstract: Rapid retrospective biological dosimetry allows absorbed dose evaluation post exposure to ionizing radiation. One of the main tools of biodosimetry is based on the analysis of the effects resulting from the impact of ionizing radiation on the cell. Various cytogenetic tests give possibility of the accurate dose estimation. To investigate cell response to radiation one performs the analysis of biomarkers approved by International Atomic Energy Agency e.g. the analysis of dicentric chromosomes or micronuclei frequency. Micronucleus test is relatively a faster and therefore more effective method to study changes in the genetic material, induced by various genotoxic agents. This study confirms that micronuclei frequency and nuclear division index analysis allows for appropriate absorbed dose estimation when it comes to ionizing radiation. In order to further optimize and facilitate the micronucleus assay and other cytogenetic tests in rapid retrospective biological dosimetry, the research are still ongoing.

Keywords: micronuclei, micronucleus assay, retrospective biological dosimetry, ionizing radiation, cell death.

Wprowadzenie

Promieniowanie jonizujące lub wzbudzenia atomów mogą prowadzić do zmian w strukturze molekularnej organelli komórkowych. Choć letalne uszkodzenie organizmu nie musi być związane z letalnym uszkodzeniem komórek, to może być ono spowodowane złośliwą ich transformacją – nowotworem. Niewątpliwie najbardziej czułym na promieniowanie jonizujące elementem komórki jest materiał DNA, który może być uszkodzany bezpośrednio i pośrednio – poprzez produkty radiolizy wody, rodniki: OH[•], HO[•] oraz H[•] i nadtlenki H₂O₂. Oddziaływanie na drodze pośredniej jonizacji innych atomów lub cząsteczek z wytworzeniem wolnych rodników jest procesem złożonym. W pierwszej kolejności foton promieniowania np. gamma oddziałuje z ośrodkiem (zjawisko fotoelektryczne, efekt Comptona czy kreacja par), na który pada w wyniku czego wyemitowany zostaje wysokoenergetyczny elektron. Elektron poruszając się w tkance uwodnionej

przyczynia się do powstania w niej reaktywnych form tlenu, są to głównie rodniki o charakterze tlenowym. Ze względu na to, iż wolne rodniki posiadają niesparowany elektron na powłoce walencyjnej są cząsteczkami silnie reaktywnymi. Wskutek tego mogą one zrywać wiązania fotodiastrowe oraz wodorowe w cząsteczce DNA. Oddziaływanie reaktywnych form tlenu pociąga za sobą zmianę struktury chemicznej ważnych biologicznie cząsteczek. Istotniejsze zmiany cytologiczne spowodowane są uszkodzeniem DNA w wyniku ekspozycji na promieniowanie jonizujące to m.in. czasowe zahamowanie zdolności proliferacyjnej, śmierć po jednokrotnym lub kilkukrotnych podziałach, śmierć natychmiastowa – nekroza, wystąpienie różnego typu mutacji, w tym także nowotworowych oraz czasowe lub trwałe uszkodzenie niektórych funkcji komórek [1-3].

Rodzaje śmierci komórkowej indukowanej promieniowaniem jonizującym

Istnieje kilka rodzajów śmierci komórkowej spowodowanej ekspozycją na działanie promieniowania jonizującego. Śmierć mitotyczna (reprodukcyjna) następuje w czasie pierwszej mitozy po napromienieniu, chociaż często zdarza się, że komórki potomne przechodzą jeszcze jeden, dwa lub trzy następne cykle komórkowe, które kończą się podziałami i pozornie nie różnią się od komórek nienapromienionych. Przyczyną śmierci mitotycznej są zaburzenia w morfologii chromosomów – aberracje chromosomowe. Uszkodzone chromosomy czy też fragmenty acentryczne, nie zawierające centromerów, nie będą włączone do jądra komórek potomnych. Struktury te pozostają w cytoplazmie, tworząc mikrojądra. Podczas interfazy, mikrojądra zostają utracone, co powoduje ubytek informacji genetycznej oraz śmierć komórki. Zatem dopóki komórka nie zacznie się dzielić, aberracje chromosomowe pozostają w stanie utajonym i często nie zmieniają morfologii czy metabolizmu komórki. Momentem krytycznym dla życia komórki staje się jej podział.

Nie każda aberracja chromosomowa prowadzi do śmierci komórki [6-8]. Translokacje (przemieszczenia chromosomowe) nie wpływają na przebieg podziału i mogą być przekazywane komórkom potomnym. Zwykle translokacjom towarzyszą zmiany na poziomie struktury DNA. Mutacji może ulec gen kodujący białko lub gen odpowiedzialny za kontrolę cyklu komórkowego lub naprawy DNA, co może zmienić komórkę prawidłową w nowotworową. Niestety nie można wykluczyć, że jedna mutacja wyzwoli kaskadę dalszych zmian genetycznych, które w konsekwencji prowadzić może do transformacji nowotworowej [6].

Istnieje również inny typ śmierci komórki – śmierć interfazalna, która następuje w dowolnej części cyklu komórkowego. Do śmierci interfazalnej dochodzi od kilku do kilkudziesięciu godzin po napromienieniu i może ona nastąpić w sposób dwojaki: jako śmierć nekrotyczna lub apoptotyczna. Apoptoza w odróżnieniu od innych form śmierci komórkowej jest formą aktywną tzw. samobójstwem komórki [6-9]. Apoptoza jest procesem uporządkowanym i prowadzi do obkurczenia komórki, kondensacji chromatyny oraz fragmentacji DNA. Ostatnim etapem apoptozy jest rozpad komórki na otoczone błoną komórkową ciała apoptotyczne, zawierające organella komórkowe. Ciała apoptotyczne trawione są przez makrofagi lub sąsiadujące komórki, dzięki czemu nie dochodzi do stanu zapalnego. Uważa się, że miarą skuteczności terapii przeciwnowotworowej, oprócz zahamowania proliferacji, jest zdolność wyindukowania w komórkach rakowych procesu apoptozy. Radioterapia, wywołuje stres komórkowy, który w efekcie powinien doprowadzić do śmierci komórki. Jednakże transformacja nowotworowa często prowadzi do nadekspresji czynników hamujących apoptozę lub/i zmniejszenie lub wręcz całkowity brak ekspresji czynników aktywiających apoptozę [7-9,10].

W odróżnieniu od apoptozy, nekroza spowodowana jest utratą zdolności zachowania równowagi wodno-elektrolitowej. Woda i jony wnikają do wnętrza uszkodzonej komórki i powodują jej pęcznienie i rozrywanie. Śmierć nekrotyczna komórki prowadzi do powstawania chronicznego stanu zapalnego w organizmie [10].

Skutki popromienne w organizmach żywych

Według Międzynarodowej Komisji Ochrony Radiologicznej (ICRP – *International Commission on Radiological Protection*) rozróżnia się dwie kategorie skutków popromiennych w żywych organizmach: skutki stochastyczne i deterministyczne. W radiobiologii efekty stochastyczne to takie, których prawdopodobieństwo wystąpienia, lecz nie stopień nasilenia, jest wprost proporcjonalne do dawki. Skutki stochastyczne to np. nowotwory lub inne dziedziczne schorzenia. Natomiast efekty deterministyczne to takie, których nasilenie zależy od wartości dawki: poniżej pewnej dawki progowej efekt nie występuje. Przykładem efektów deterministycznych może być choroba popromienna, zaćma, wypadanie włosów czy rumień skórny. Efekty deterministyczne nie są dziedziczne [7].

Wedle aktualnych teorii efekty dziedziczne i nowotwory mają swój początek w uszkodzeniu materiału genetycznego jednej komórki. Zjawiska tego typu mają charakter stochastyczny, jest tak dlatego, że ich zapoczątkowanie jest przypadkowe. Podczas napromieniania organizmu dowolną dawką promieniowania jonizującego, praktycznie nigdy nie można wykluczyć możliwości, że któraś komórka zostanie uszkodzona i zmieni się w komórkę nowotworową. Ze względu na to, że proces ten zaczyna się od jednej komórki, nie istnieje żadna dawka progowa, przy której prawdopodobieństwo wystąpienia nowotworu będzie równe zero, dlatego też efekty stochastyczne nie charakteryzuje progowa zależność od dawki. W zależności od rodzaju uszkodzenia materiału genetycznego komórki oraz jej funkcji w organizmie mamy do czynienia z różnym stopniem nasilenia i naturą efektu stochastycznego. Nie istota jest ilość uszkodzonych komórek, ponieważ nowotwór wywołany ekspozycją na 1 Sv nie różni się od nowotworu wywołanego ekspozycją na 100 mSv [8-10].

W przypadku efektów deterministycznych sytuacja jest odmienna, ze względu na to, że nazwa ta określa zmiany w tkankach i narządach wynikające ze śmiertelnego uszkodzenia pewnej liczby komórek. Śmierć organizmu następuje po zabiciu odpowiednio dużej ilości limfocytów macierzystych w szpiku kostnym. Z tego powodu istnieje konieczność osiągnięcia pewnej progowej dawki promieniowania, by efekty deterministyczne miały miejsce. Ich nasilenie wrasta wraz ze wzrostem dawki [10].

Retrospektywna dozymetria biologiczna

Zbiorem metod pozwalających na ocenę dawki pochłoniętej w wyniku ekspozycji na promieniowanie jonizujące jest retrospektywna dozymetria biologiczna.

Retrospektywnej dozymetrii biologicznej dokonuje się w oparciu o analizę skutków wynikających z oddziaływania promieniowania jonizującego na komórkę np. za pomocą analizy częstości występowania aberracji chromosomowych. W ocenie dawki pochłoniętej metody cytogenetyczne stanowią cenne uzupełnienie eksperymentalnych oraz teoretycznych metod fizycznych. Dozymetrię biologiczną stosuje się głównie w przypadku zdarzeń radiacyjnych z udziałem osób, nie posiadających dawkomierza indywidualnego lub gdy uległ on uszkodzeniu, skażeniu substancjami promieniotwórczymi, a w miejscu zdarzenia nie były prowadzone dozymetryczne pomiary kontrolne. Kolejnym wskazaniem do zastosowania biodozymetrii jest znaczne, nieuzasadnione przekroczenie dawek granicznych oraz praca w warunkach zmiennych pól promieniowania lub przewlekłego, wewnętrznego i zewnętrznego narażenia radiacyjnego [5].

Analiza chromosomów dicentrycznych w retrospektywnej dozymetrii biologicznej

Znajomość dawki otrzymanej przez osobę napromienioną jest potrzebna organom kontrolnym do oceny ryzyka wystąpienia skutków stochastycznych, głównie nowotworów, natomiast lekarzom do doboru odpowiedniej strategii leczenia zaburzeń somatostatycznych spowodowanych wystąpieniem efektów deterministycznych tj. ostry zespół popromienny. W przypadku narażenia zewnętrznego, metodą uznawaną międzynarodowo za „złoty standard” jest analiza częstości występowania chromosomów dicentrycznych w limfocytach krwi obwodowej człowieka. Wyznaczona w ten sposób dawka opiera się na ocenie częstości występowania tych aberracji chromosomowych w danej populacji limfocytów osoby narażonej. Ze względu na stałe krążenie limfocytów w organizmie człowieka można z precyzją wyznaczyć dawkę pochłoniętą podczas narażenia, nawet w przypadku napromienienia częściowego np. kończyny [5]. Metodyka testu chromosomów dicentrycznych opiera się na stymulacji pobranych limfocytów do podziału i ich utrwaleniu po pierwszym podziale popromiennym. Chromosomy podczas pierwszego podziału komórkowego są skondensowane i wyraźne, co pozwala na ich analizę pod mikroskopem. Próbkę krwi może być pobrana od osoby narażonej nawet tydzień po narażeniu [10]. W praktyce analizuje się 1000 komórek i zlicza ilość występujących chromosomów dicentrycznych. Następnie częstość występowania chromosomów dicentrycznych odnosi się do wystandaryzowanej przez laboratorium krzywej wzorcowej i wyznacza się dawkę pochłoniętą.

W przypadku wszystkich testów cytogenetycznych krzywą wyznacza się w oparciu o wartości uzyskane w procesie wzorcowania, który polega na określeniu zależności między wzorcowymi dawkami promieniowania, którego rodzaj, energia i moc dawki powinny być najbardziej zbliżone do promieniowania będącego przedmiotem oceny, a częstościami występowania chromosomów dicentrycznych w napromienionych *in vitro*

limfocytach krwi obwodowej zdrowych dawców w przedziale wiekowym 25 – 65 lat. Postępowanie takie jest możliwe dzięki podobieństwu częstości występowania chromosomów dicentrycznych na jednostkę dawki pochłoniętej po napromienieniu hodowli komórek *in vitro*, jak i populacji limfocytów *in vivo* [6].

Jako biomarker dawki pochłoniętej, częstość występowania chromosomów dicentrycznych w limfocytach krwi obwodowej posiada zalety tj. swoistość, tylko nieliczne związki indukują powstawanie chromosomów dicentrycznych, niska spontaniczna częstość ich występowania (1-2 na 1000 komórek), czułość na promieniowanie w zakresie mGy do kilku Gy, możliwość oszacowania dawki nawet w przypadku napromienienia części ciała. Wadą wskaźnika jest niestabilność chromosomów dicentrycznych. Aberracje tego rodzaju prowadzą do mitotycznej śmierci komórki, skutkiem czego w populacji komórek dzielących się marker zanika. Proces ciągłej wymiany dojrzałych limfocytów jest kompensowany przez młode limfocyty ze szpiku kostnego. Liczba komórek zawierających chromosomy dicentryczne maleje wykładniczo z czasem. Kolejną wadą tego testu jest jego pracochłonność i potrzeba zatrudnienia wykwalifikowanej kadry pracowników. Analiza częstości występowania chromosomów dicentrycznych wymaga doświadczenia w dziedzinie cytogenetyki. Zatem gdy zajdzie potrzeba analizy licznych próbek pochodzących od osób narażonych w niekontrolowanym zdarzeniu radiacyjnym test ten ma poważne ograniczenia [6].

Test mikrojądrowy

Wiele badań potwierdziło, iż liczba powstających mikrojąder indukowanych promieniowaniem jonizującym, jest silnie powiązana z rodzajem promieniowania oraz dawką. Dzięki temu częstość występowania mikrojąder jest dobrym markerem skutku biologicznego, co jest wykorzystywane w dozymetrii biologicznej. W retrospektywnej dozymetrii biologicznej krzywa dawka – efekt służy do rekonstrukcji dawki pochłoniętej, co realizowane jest przez analizę częstości występowania mikrojąder w limfocytach krwi obwodowej człowieka napromienionych *in vitro* w warunkach eksperymentalnych.

Mikrojądra występujące w limfocytach człowieka zostały opisane po raz pierwszy przez Countyman'a i Heddle'a. Jednakże w prezentowanej przez Countyman'a i Heddle'a metodzie nie próbowano ustalić, czy zliczone komórki z wyraźnym mikrojądrem zakończyły proces podziału jądrowego tzn. istniała wątpliwość czy faktycznie obserwowane mikrojądra nie są zwykłymi jądrami komórkowymi. W 1985 roku Fenech i Morley stosując dodatkowo w swojej procedurze inhibitor cytokinezy: cytochalazynę B, otrzymali limfocyty, które ukończyły jeden podział jądrowy tzw. komórki dwujądrazaste (z ang. *Binucleated BN Cells*). Następnie obliczając częstość występowania komórek BN (zarówno *in vitro* jak i po ekspozycji na dany czynnik genotoksyczny) uzyskano pełną informację o mechanizmie

powstawania MN i uznano je za istotny biomarker skutku biologicznego [7].

Powstawanie mikrojąder jest konsekwencją wystąpienia w komórkach aberracji chromosomowych, a dokładniej zaburzeń segregacji chromatyd siostrzanych podczas anafazy podziału mitotycznego. W wyniku uszkodzenia struktury chromosomów dochodzi do powstania acentrycznych fragmentów chromosomów lub też całych chromosomów o nieprawidłowej budowie, które podczas trwania procesu podziału, nie zostały przydzielone przez aparat mitotyczny do żadnego z zespołów chromosomów potomnych, pozostając w komórce macierzystej. W telofazie mitozy, oba zespoły chromosomów potomnych zostają otoczone otoczką jądrową, (również fragmenty chromosomów – powstają mikrojądra) i ulegają dekondensacji tworząc nici chromatynowe. Dzięki dodaniu cytochalazyny B nie następuje podział cytoplazmy, stąd możliwe do zaobserwowania pożądane komórki dwujądrowe. W celu oszacowania dawki pochłoniętej promieniowania jonizującego należy przeprowadzić analizę minimum 500 komórek BN [6]. Poza oceną ilości mikrojąder w komórkach BN istnieje także możliwość analizy Indeksu Podziału Komórkowego (z ang. *Nuclear Division Index* – NDI), który wnosi informacje o tempie proliferacji komórek. Przyjmuje się, iż wartość $NDI = 1$ oznacza, iż komórki w trakcie inkubacji z cytochalazyną B, pozostały jedno-jądrzaste i nie uległy żadnemu podziałowi, co świadczy o licznych uszkodzeniach materiału genetycznego. Natomiast, gdy NDI przyjmuje wartość równą 2, odczytuje się, że większość komórek w populacji przeszło dokładnie jeden podział w czasie blokady cytokinezy, co świadczy o ich prawidłowej proliferacji [7-9].

Częstość występowania mikrojąder oznaczana w teście mikrojądrowym po napromienieniu promieniowaniem o niskim LET np. promieniowaniem X i jest wprost proporcjonalna do kwadratu dawki, taka sama dla warunków *in vitro*, jak i w organizmie człowieka i dana jest wzorem [7]:

$$Y = A + \alpha D + \beta D^2 \quad (1)$$

gdzie:

- Y – liczba mikrojąder na komórkę,
- D – dawka [Gy],
- α – liniowy współczynnik dawki,
- β – kwadratowy współczynnik dawki,
- A – poziom tła.

Kalibracja polega na znalezieniu współczynników α , β oraz A równania na podstawie punktów pomiarowych uzyskanych podczas eksperymentów *in vitro*.

Niewątpliwą zaletą testu mikrojądrowego w limfocytach jest m.in. łatwość w pozyskaniu materiału biologicznego od osób narażonych na działanie promieniowania jonizującego – poprzez pobieranie pełnej krwi obwodowej. Wybór limfocytów, jako materiału biologicznego stosowanego w dozymetrii biologicznej jest uzasadniony ze względu na: czas życia komórek do 3,5 lat – możliwość analizy stabilnych i niestabilnych uszkodzeń DNA, synchronizację komórek w fazie G_0 cyklu komórkowego, reprezentatywność uszkodzeń – komórki mają zdolność recyrkulacji między krwią a organami

oraz możliwość stymulacji limfocytów do podziału – zastosowanie fitohemaglutyniny (PHA). Ponadto badanie zapewnia niską inwazyjność i jest etycznie akceptowalne, stosowane w rutynowej diagnostyce klinicznej. Test mikrojądrowy jest stosunkowo szybką i niedrogą metodą oceny aberracji chromosomowych, pozwalającą na podjęcie decyzji o dalszym postępowaniu w przypadku osoby najprawdopodobniej napromienionej. Przyjmuje się, że osoba napromieniona dawką do 1 Gy nie powinna być hospitalizowana [6]. Test mikrojądrowy jest odpowiedni do detekcji dawek pochłoniętych w zakresie 0,2–4,0 Gy. W przeciwieństwie do testu chromosomów dicentrycznych, częstość występowania spontanicznie utworzonych mikrojąder jest wyższa, jednakże na poziomie dokładności pozwalającym stosować tę metodę. W celu podniesienia specyficzności testu w zakresie niskich dawek można dodatkowo zastosować barwienie centromerów metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Mikrojądra powstałe spontanicznie zwykle charakteryzują się obecnością centromeru, co można stwierdzić za pomocą metody FISH [10]. Z racji swojej prostoty w interpretacji, test mikrojądrowy nadaje się do automatyzacji. Pierwsze próby automatyzacji tego testu podjęto podczas międzynarodowej współpracy MULTIBIODOSE w latach 2010–2013, efektem czego było opracowanie algorytmów pozwalających na analizę setki preparatów w ciągu jednego tygodnia. Powyższe zalety czynią test mikrojądrowy korzystniejszą metodą od analizy częstości występowania chromosomów dicentrycznych w przypadku, kiedy grupa osób narażonych jest liczna. Ponadto, analiza częstości występowania mikrojąder nie wymaga zatrudnienia doświadczonego personelu, co dodatkowo skraca czas oczekiwania na rezultaty testu.

Z drugiej strony należy zwrócić uwagę, że test ten wskazuje nie tylko uszkodzenia będące skutkiem działania promieniowania, lecz także ekspozycji na inne czynniki genotoksyczne np. palenie tytoniu, przez co jest mniej specyficzny od testu chromosomów dicentrycznych. Również, ilość spontanicznie powstających mikrojąder skorelowana jest z płcią, wiekiem oraz nawykami żywieniowymi. Mimo to, znajduje on zastosowanie w badaniach cytogenetycznych i z powodzeniem jest wykorzystywany w retrospektywnej dozymetrii biologicznej.

Podsumowanie

Jednym z kluczowych zadań dozymetrii biologicznej, istotnym nie tylko dla osób zawodowo narażonych na promieniowanie jonizujące, lecz również dla osób z ogółu populacji, jest możliwość określenia, ze stosunkowo dużą dokładnością, otrzymanej dawki promieniowania jonizującego i ocena stopnia zagrożenia utratą zdrowia. Metody oceny dawek pochłoniętych promieniowania jonizującego oparte na technikach cytogenetycznych znajdują szerokie zastosowanie. Ich dominującą zaletą, jest fakt, iż oceny dawki dokonuje się na podstawie rzeczywistych zmian w makrostrukturze materiału genetycznego, co pozwala na szybsze

przewidywanie skutków biologicznych ekspozycji na dawkę promieniowania jonizującego. Istotnym jest również to, że metody cytogenetyczne mogą być stosowane jako komplementarne.

Dozymetria biologiczna znajduje zastosowanie podczas różnego typu zdarzeń radiacyjnych np. awarii akceleratorów czy elektrowni atomowych. Stale prowadzone są badania nad ułatwieniem i szybszym wykonaniem

analizy aberracji chromosomowych. Ze względu na swoją prostotę w interpretacji obrazów mikroskopowych oraz efektywność, test mikrojądrowy staje się metodą wiodącą w szybkiej dozymetrii biologicznej. Aktualnie trwają badania nad poszukiwaniem i optymalizacją nowych testów, mogących mieć zastosowanie w szybkiej retrospektywnej dozymetrii biologicznej.

Literatura

1. Giebel, B., Wodarcz, A., Tumor suppressors: Control of signaling by endocytosis, *Curr. Biol.*, 2006, 16, pp. 91–92.
2. Kanada, M., Bachmann, M., Contag CH. Signalling by extracellular vesicles advances cancer hallmarks, *Trends in Cancer*, 2016, Vol. 2, Number 2, pp. 84-94.
3. Luzhna, L., Kathiria, P., Kovalchuk, O., Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond, *Front Genet*, 2013, 4:131.
4. Kopeć-Szlęzak, J., Rola komórek układu odpornościowego w mikrośrodkowisku nowotworów, *Postępy Nauk Medycznych*, 2012, 3, s.15-21.
5. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J.W., Sedgwick, A., D'Souza-Schorey, C., Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression, *Journal of Cell Science*, 2010, 123, pp.1603-1611.
6. Miszczyk, J., Panek, A., Rawojć, K., Swakoń, J., Gałaś, A., Prasanna, P.G.S., Rydygier, M., Effects of 60 MeV Protons and 250 kV X-Rays on Cell Viability, *Acta Physica Polonica, Series a*, 2016, 129(2), pp. 222-225.
7. Shibamoto, Y., Streffer, C., Fuhrmann, C., Budach, V., Tumor radiosensitivity prediction by the cytokinesis-blocked micronucleus assay, *Radiation Research*, 1991, 128(3), pp. 293-300.
8. Miszczyk, J., Rawojć, K., Panek, A., Swakoń, J., Prasanna, P.G., Rydygier, M., Response of human lymphocytes to proton radiation of 60 MeV compared to 250 kV X-rays by the cytokinesis-block micronucleus assay, *Radiother Oncol*, 2015, 115(1), pp. 128-134.
9. Rawojć, K., Tarnawska, D.M., Miszczyk, J., Swakoń, J., Stolarczyk, L., Rydygier, M., Application of the micronucleus assay performed by different scorers in case of large-scale radiation accidents, *Nukleonika*, 2015, Vol. 60, No. 3, part 2, pp. 643-649.
10. Mróz, A., Kornaś, A., Dozymetria promieniowania jonizującego w badaniach cytogenetycznych komórek ludzkich, *Postępy biologii komórki*, 2015, tom 42, nr 3, s. 491-504.