

## 방사선 피폭의 생물학적 선량측정에 어류(조피볼락, *Sebastes schlegeli*) 및 조류(닭)의 세포질분열 차단 세포 적용의 부적절성

김세라, 김태환<sup>1</sup>, 류시운<sup>2</sup>, 장종식<sup>3</sup>, 안미영<sup>4</sup>, 김성호<sup>\*</sup>  
전남대학교 수의과대학, <sup>1</sup>한국원자력병원, <sup>2</sup>충남대학교 수의과대학,  
<sup>3</sup>상주대학교 축산학과, <sup>4</sup>Texas A&M University 수의과대학  
(게재승인 : 2002년 12월 9일)

### Inadequacy of application of cytokinesis-blocked cells in fish (Rock fish, *Sebastes schlegeli*) and fowl(chicken) as biological dosimeter for radiation exposure

Se-Ra Kim, Tae-Hwan Kim<sup>1</sup>, Si-Yun Ryu<sup>2</sup>, Jong-Sik Jang<sup>3</sup>, Mi-Young An<sup>4</sup> and Sung-Ho Kim<sup>\*</sup>

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University,  
<sup>1</sup>Korea Cancer Center Hospital,

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Chungnam National University,

<sup>3</sup>Department of Animal Science, Sangju National University

<sup>4</sup>College of Veterinary Medicine, Texas A&M University

(Accepted : December 9, 2002)

**Abstracts :** The purpose of the present experiment was to investigate the micronuclei (MN) frequency in cytokinesis-blocked (CB) cells after various doses of gamma-rays in two species (fish and fowl) and so to contribute to the clarification of the question whether these species are suitable as a target organism in the test system. The frequencies of binucleated cells, and gamma-ray-induced MN in CB cells at several doses were measured in three donors of two species. No binucleated cell was noted in erythrocyte. The peaks of binucleated lymphocyte formation were found at a concentration of 2% phytohaemagglutinin (PHA) and 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cytochalasin B (Cyt-B) in fish at 144 hours after incubation and 2% PHA and 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cyt-B in fowl at 72 hours after incubation. But the micronucleus counts failed to show any evidence of radiation damage. Measurements performed after irradiation showed a dose-related decrease in the formation of binucleated cells in each of the donors studied. Results indicated that the assays were not suitable for this due to blastization inhibition (binucleation failure) after irradiation. We concluded that the use of CB cell from fish and fowl for detecting the results of radiation exposure was highly questionable.

**Key words :** Micronuclei, Fish, Fowl, Cytokinesis-blocked cell

## 서 론

방사선 피폭의 생물학적 선량 측정에는 각종 단백질 및

핵산의 변화를 중심으로 한 효소변화 측정 즉, 생화학적 방법<sup>1,2</sup>과 미성숙 염색체 응축 (premature chromosome condensation) 검사법을 비롯한 세포유전학적 방법<sup>3</sup>, 조

본 연구는 과학기술부 원자력연구개발사업의 지원으로 수행되었음.

\* Corresponding author: Sung-Ho Kim

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Yongbong-dong, Puk-ku, Kwangju, 500-757, Republic of Korea

E-mail : shokim@chonnam.ac.kr

혈세포<sup>4</sup>, 정자산생<sup>5</sup>, 체모의 변화<sup>6</sup>를 이용한 세포조직학적 방법, 기타 면역학적 변화 등을 관찰하는 방법들이 제시되고 있다. 생물학적 선량측정의 조건으로, 피폭량에 따른 반응의 일치(dose-dependence)와 전리 방사선에 대해 특징적인 반응을 보여 선량측정이 용이해야 하며 피폭 후 빠른 결과의 산출, 부분피폭의 검출과 피폭 후 피폭선량의 지속성, 만성피폭과 분할피폭의 적용성 및 다양한 선질에 대하여 모두 측정 가능하여야 한다. 그러나 현재 위의 조건을 모두 만족시킬 수 있는 지표는 없으나 개인용 계측기를 이용한 물리적 측정방법의 문제점을 보완하기 위하여 생물학적 선량 측정법이 중요시되고 있다<sup>7</sup>.

현 시점에서 가장 많이 적용되는 생물학적 선량측정은 혈액내 림프구의 숫적 변동이며<sup>4</sup> 이의 dicentric과 centric ring의 계측을 중심으로 한 염색체 분석법이 몇몇 방사선 사고시 적용 측정되었다<sup>8-12</sup>. 그러나 혈액세포의 숫적 변화는 원줄기세포(stem cell) 및 세포성숙계에서의 공급정도, 시간경과 후의 점차적인 세포사에 의한 수적 소실의 비율, 비장과 같은 혈액보유장기 상태 등의 변화에 따른 혈구수치의 차이 등으로 인하여 해석상의 단점이 있고<sup>4</sup>, 염색체분석법은 재료의 제작 및 분석에 많은 시간적, 노동적 투자가 있어야 하며, 상당한 기술을 요하는 것이 단점으로 지적되고 있다<sup>7,9</sup>.

골수세포를 이용하는 전통적인 미소핵 검사에 비하여 세포질분열 차단 림프구에서의 미소핵 검사는 일회 분열의 확인 및 미분열세포의 배제가 가능하여 방사선생물학분야에서의 선량측정 및 반응조절물질의 효과 검증 시험에 많이 적용되고 있다<sup>7,13-17</sup>. 대부분의 실험에서 인체 림프구가 사용되었으며 그 이유는 세포질분열차단세포(cytokinesis-blocked cell, CB세포)의 유도가 용이하기 때문이다. 그러나 인체에 대한 연구는 시험관내 시험을 통한 결과의 산출만이 가능하며 아직 사고 발생에 따른 미소핵 검사의 결과도 보고된 바 없다. 따라서 염색체 분석법을 적용한 실험들과 같이, 생체시험을 위한 방법의 모색 및 동물별 감수성의 차이 등이 미소핵 검사에서도 연구되어야 할 분야이다.

발암물질을 비롯한 각종 오염물질에 의한 생체 장해 연구가 조류<sup>18-21</sup> 및 어류<sup>22,23</sup>를 대상으로 많이 수행되고 있다. 방사선에 의한 장해 연구에도 조류 및 어류를 사용하며 특히 어류의 경우 수생환경의 오염측정에 주요한 대상동물로 적용된다<sup>22,23</sup>. 어류 및 조류를 대상으로 하는, 방사선을 비롯한 세포유전학적 독성을 관찰하는 연구에는 주로 염색체분석법과 고전적 방법으로서의 적혈구내 미소핵 형성을 주 실험법으로 적용하고 있다<sup>18,19,24-27</sup>. 최근 어류의 유핵적혈구를 이용하여, 포유류에

서 세포유전학적 장해의 시험지표로 많이 적용되고 있는 세포질분열차단 이핵세포를 유도하고 이를 적용한 중금속 오염의 장해 정도를 파악하였다는 보고<sup>26</sup>가 있었다. 만약 어류 또는 조류의 유핵적혈구 및 림프구를 사용한 이핵세포의 유도가 가능하고 이를 세포유전학적 연구에 적용할 수 있다면 이는 시료 채취의 용이성과 조류 및 어류의 생활 환경 오염 등의 연구에 유용하게 적용될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 변이 유발물질 검색의 최종 목표가 인체에 대한 직접적 효과 검사 또는 결국 인체에 대한 외삽 가능성이라는 관점에서 어류(조피볼락)와 조류(닭)의 적혈구 및 림프구를 사용하여 세포질 분열 차단세포의 유도 정도와 방사선에 의한 미소핵 발생양상을 관찰하고 방사선 피폭의 생물학적 선량측정 연구에 적용 가능한 실험동물로의 선택 가능성 등을 파악하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험세포 및 배양

조피볼락 및 닭의 말초혈액을 채취하고, 각 동물의 적혈구 및 림프구를 사용하였다. 림프구는 닭의 경우 Barta 등의 보고<sup>28</sup>에 따라 buffy-coat의 세포를 채취하였고, 조피볼락은 density gradient 방법으로 림프구를 채취하고 HBSS에 수세 후 heat inactivated foetal calf serum, L-glutamine, 2-mercaptoethanol과 항생제가 첨가된 RPMI1640 배지에 부유시켰다. 닭의 세포배양에는 Barta 등의 보고<sup>28</sup>에 따라 최적 조건인 5%의 serum을 첨가하였으며, 조피볼락의 세포배양에는 15%의 serum을 첨가 배양하였다. 림프구는 multi-well tissue culture plate (Corning, No. 25820, NY)를 사용하여 배지 ml당  $5 \times 10^5$ 개의 농도로, 닭은 40 °C, 조피볼락은 24 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배지 ml당 1% 및 2%의 phytohaemagglutinin (PHA, Sigma)을 첨가하고 3, 6 또는 9  $\mu$ g의 cytochalasin B (Cyt-B, Aldrich Chemical Co.)를 첨가한 후 이핵세포를 얻기 위한 최적 농도를 파악하였다. 배양시간은 조피볼락은 48-216 시간까지, 닭은 48-120 시간까지 24 시간 단위로 관찰하였다.

### 방사선 조사

적혈구 또는 분리된 림프구는 멸균된 polystyrene tube (Corning, No. 25310-15, NY)에 분주하여 PHA 첨가 직전에 100, 200 또는 400 cGy의 <sup>60</sup>Co 감마선을 1000 cGy/min의 선량율로 1회 조사(Gammacell 3000 Elan, Nordion International Co., Canada)하였다.

### Cytokinesis-blocked method

Cyt-B 는 dimethylsulphoxide에 ml당 2 mg의 량으로 원액을 만들어 -70℃에 보관하였으며 세포수확 전 24시간에 첨가하였다. Cyt-B 첨가 후 24시간에 세포를 수확하였으며 cytocentrifuge를 이용하여 검경용 표본을 만들고 건조 후 10% Giemsa 용액에 10분간 염색하였다.

### 미소핵의 검경

미소핵은 유침하에서 1000배 배율의 현미경으로 관찰하였다. 미소핵 판정은 주핵에서 분리된 구형으로 지름이 주핵의 50% 이하이고 이핵세포의 세포질내에 존재하여야 하며 빛의 반사와 같은 형상이 없고 염색성이 주핵에 비하여 진하지 않은 것을 기준으로 하였다<sup>13</sup>. 모든 성적의 분석은 Graph PAD In Plot program을 사용하였다.

## 결 과

CB 세포의 유도는 적혈구를 대상세포로 한 경우에는

조피볼락 및 닭에서 전혀 관찰되지 않았다. CB 림프구의 유도정도는 조피볼락에서 배양 72시간에 수확한 실험군에서 관찰되기 시작하여 PHA 2%, Cyt-B 3 및 6  $\mu\text{g}$  적용하여 144 시간 배양군에서 가장 높은 비율로 유도된 후 시간 경과에 따라 감소하였다 (표 1). 닭에서는 PHA 1% 또는 2%를 첨가하고, 배양 72 시간 및 96시간에 비슷한 정도의 높은 유도율을 보였다 (표 2). 방사선 조사 후 미소핵 발생을 관찰하기 위한 세포질 분열 차단법은, 조피볼락 유래 림프구는 PHA 2%로 120 시간 배양하고, Cyt-B를 4  $\mu\text{g}$  첨가하여 144시간에 수확하는 방법을 적용하고, 닭 유래 림프구는 PHA 2%로 48 시간 배양하고, Cyt-B를 4  $\mu\text{g}$  첨가하여 72 시간에 수확하는 방법을 적용하는 것이 최적조건이었다.

이상의 방법을 적용하여 각 방사선 조사 용량 별 미소핵의 발생을 관찰한 바 방사선 조사용량에 비례하여 이핵림프구의 유도율은 급격히 감소하였고, 조피볼락 및 닭의 림프구를 사용한 전 실험군에서 방사선 조사에 의한 미소핵의 발생은 관찰되지 않았다 (표 3, 4).

Table 1. The frequency of binucleated cells in lymphocyte of fish (rock fish)

Incubation time (hrs)	Concentration of PHA (%) and Cyt-B ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ of medium)					
	1%			2%		
	3	6	9	3	6	9
48	0	0	0	0	0	0
72	5	10	7	2	10	9
96	14	18	13	9	17	20
120	11	12	10	39	30	37
144	31	25	24	60	58	38
168	20	24	21	23	33	33
192	2	11	7	4	2	0
216	8	5	0	0	4	0

Table 2. The frequency of binucleated cells in lymphocyte of fowl (chicken)

Incubation time (hrs)	Concentration of PHA (%) and Cyt-B ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ of medium)					
	1%			2%		
	3	6	9	3	6	9
48	24	14	25	33	32	29
72	34	37	39	39	44	38
96	42	40	38	39	44	38
120	32	39	42	34	35	30

**Table 3.** Micronuclei (MN) per 500 cytokinesis-blocked lymphocyte following irradiation of fish

Experimental group	No. of cells without MN	Number of micronuclei per cell				Total number of MN
		1	2	3	4	
donor 1						
0 cGy	497	3				3
100 cGy	496	4				4
200 cGy	497	3				3
400 cGy	498	2				2
donor 2						
0 cGy	498	2				2
100 cGy	497	3				3
200 cGy	498	2	1			4
400 cGy	498	2				2
donor 3						
0 cGy	497	3				3
100 cGy	497	3				3
200 cGy	498	2				2
400 cGy	497	3				3

**Table 4.** Micronuclei (MN) per 500 cytokinesis-blocked lymphocytes following irradiation of fowl

Experimental group	No. of cells without MN	Number of micronuclei per cell				Total number of MN
		1	2	3	4	
donor 1						
0 cGy	498	2				3
100 cGy	497	3				3
200 cGy	499	1				1
400 cGy	498	2				2
donor 2						
0 cGy	498	2				2
100 cGy	498	2				2
200 cGy	497	3				3
400 cGy	498	2				2
donor 3						
0 cGy	497	3				3
100 cGy	498	2				2
200 cGy	498	2				2
400 cGy	498	2				2

## 고 찰

인체에 대한 유전독성 평가는 기타 생물학적 실험법을 이용하여 투여용량, 경로 및 세포의 유형 등을 근거로 수행되며 최종적으로 인체에 대한 결과 도출의 가능성을 확인하는 것이다. 세포유전학적 분석에 있어서 림프구는 주로 사용되는 세포로, 비교적 수명이 길고, 정상상태에서는 분열하지 않으며 표본의 채취가 용이하여 방사선 피폭에 대한 생물학적 선량측정 방법으로 많이 사용된다<sup>9,12</sup>. 기존의 염색체 분석법에 비하여 미소핵검사는 염색체 검사에 관한 특별한 숙련이나 기술 없이도 분석이 비교적 쉬우며 단기간에 수행될 수 있다. 특히 CB림프구의 사용에 따라 방사선생물학 분야의 연구는 더욱 용이하다<sup>13-17</sup>.

미소핵은 전리방사선의 직접효과 또는 free radical에 의한 염색체의 centromere의 부재(acentric fragment), 두 개 이상의 centromere 존재, kinetochore의 결손 또는 방추사의 손상 등에 의해 세포분열 시 주핵(main nucleus)에 포함되지 못해 형성되는 것으로 알려져 있다<sup>14,29,30</sup>.

어류 또는 조류의 혈액세포를 대상으로 한 세포유전학적 연구는 대부분의 적혈구의 미소핵측정방법을 적용하고 있으나 이는 최소 10,000개 이상의 세포를 검경하여야 하고, 세포분열의 과정에서 사망하는 세포의 빈도에 따른 성적의 부정확성 등이 문제가 된다<sup>23</sup>. 본 연구에서 닭의 적혈구 및 조피볼락의 적혈구에 PHA를 적용한 결과 모든 실험군에서 이핵적혈구는 전혀 관찰되지 않았다. 림프구를 대상으로 이핵세포의 유도는 조피볼락에서 144 시간, 닭에서 72 시간에 가장 높은 이핵세포의 유도율을 나타내어, 기존의 세포 배양 최적 조건에 대한 보고와 유사하였다<sup>26,28</sup>. 림프구에 대한 방사선 조사 후 이핵세포의 유도율은 급격히 감소되었고, 방사선 조사 용량에 따른 미소핵의 발생이 포유류에서의 결과와 달리, 전혀 증가되지 않은 것은 조류 및 어류와 같은 하등동물에서 염색체 손상에 따른 세포분열기간 중 사망(interphase death)이 일어나고 이에 따른 이핵세포의 형성 부전 및 미소핵 보유 이핵세포가 관찰되지 않는 것으로 추측된다.

Al-Sabri의 보고<sup>26</sup>외에는 어류 및 조류의 적혈구 또는 림프구를 사용한 세포질 분열차단 세포를 사용한 보고가 전혀 없으며, 특히 Knowles의 보고<sup>24</sup>에서 어류를 사용한 방사선 조사 후 장해 관찰 시험에서 고환을 지표로 한 성적은 심각한 장애가 관찰되었으나 혈액세포에서의 미소핵 시험과 혈액 DNA에 대한 flow-cytometric analysis에서는 유전독성의 결과를 얻을 수 없었다는 결과와 일치한다고 사료된다. Carrasco 등<sup>31</sup>은 어류에서

viral erythrocytic necrosis에 감염된 경우 적혈구내 미소핵으로 착각될 수 있다고 하였고, 이외 여러 가지 요인에 의해 apoptosis가 유발된 경우 미소핵과의 혼동이 있을 가능성을 보고하였다<sup>23</sup>. 대부분의 포유류 실험에서 세포질분열 차단 세포로서 림프구를 주로 적용하고 있는 상황에서, 조류 및 어류유래의 림프구를 대상으로 한 미소핵 관찰 시험이 전혀 보고된 바 없고, 유핵적혈구를 사용하여 세포질분열 차단 이핵세포를 유도하고, 이를 대상으로 수행한 유전독성 연구의 보고가 Al-Sabri에 의한 보고<sup>26</sup>에 한정된 사실과 함께, 본 연구의 결과에서 적혈구의 이핵세포로의 유도가 되지 않은 점과 세포질분열 차단 이핵림프구의 유도가 용이하였으나 방사선 조사에 따른 세포유전학적 관찰이 불가능하였던 결과를 참고로 할 때 어류 및 조류 혈액유래의 세포를 사용한 세포질 분열 차단세포에서의 미소핵 발생을 지표로 한 실험의 가능성은 희박하다고 사료된다. 따라서 어류 및 조류 혈액유래의 세포를 사용한 방사선 피폭의 세포유전학적 선량측정에는 기존의 염색체 분석법을 적용하는 것이 바람직하리라 생각된다.

## 결 론

변이 유발물질 검색의 최종 목표가 인체에 대한 직접적 효과 검사 또는 결국 인체에 대한 외삽 가능성이라는 관점에서 어류(조피볼락)와 조류(닭)의 적혈구 및 림프구를 사용하여 세포질 분열 차단세포의 유도 정도와 방사선에 의한 미소핵 발생 양상을 관찰하고 방사선 피폭의 생물학적 선량측정 연구에 적용 가능한 실험동물로의 선택 가능성 등을 파악하고자 하였다. CB 세포의 유도는 적혈구를 대상세포로 한 경우에는 조피볼락 및 닭에서 전혀 관찰되지 않았다. 세포질 분열 차단법을 적용한 이핵림프구의 유도는, 조피볼락 유래 림프구는 PHA 2%로 120 시간 배양하고, Cyt-B를 4  $\mu\text{g}$  첨가하여 144 시간에 수확하는 방법, 닭 유래 림프구는 PHA 2%로 48 시간 배양하고, Cyt-B를 4  $\mu\text{g}$  첨가하여 72 시간에 수확하는 방법이 최적 조건이었다. 각 방사선 조사 용량별 미소핵의 발생을 관찰한 바 조피볼락 및 닭의 림프구를 사용한 전 실험군에서 방사선 조사에 의한 미소핵의 발생은 관찰되지 않았다. 적혈구의 이핵세포로의 유도가 되지 않은 점과, 세포질분열 차단 이핵림프구의 유도가 용이하였으나 방사선 조사에 따른 세포유전학적 관찰이 불가능하였던 결과를 참고로 할 때 어류 및 조류 혈액유래의 세포를 사용한 세포질분열 차단세포에서의 미소핵 발생을 지표로 한 실험의 가능성은 희박하다고 사료되며 따라서 어류 및 조류 혈액 유래의 세포를

사용한 방사선 피폭의 세포유전학적 선량측정에는 기존의 염색체 분석법을 적용하는 것이 바람직하리라 생각된다.

## 참고문헌

1. UNSCEAR, Report : Sources and effects of ionizing radiation, Annex G, Early effects in man of high doses of radiation, chapter III : prognostic indicators and biological dosimetry (United Nations, New York), 583-612, 1988.
2. Kim SH, Cho CK, Kim TH, *et al.* Relationships between radiation-induced prostaglandin E<sub>2</sub> and natural killer cell activity in mice. *Korean J Vet Res*, 27:185-189, 1987.
3. Pantelias GE, Maillie HD. The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry. *Radiat Res*, 99:140-150, 1984.
4. Fieldner TM, Nothdurft W, Steinbach KH. Blood cell changes after radiation exposure as an indicator for hemopoietic stem cell function. *Bone Marrow Trans*, 3:77-84, 1988
5. Neel JV, Schull WJ, Awa AA, *et al.* The genetic effects of the atomic bombs: problems in extrapolating from somatic cell findings to risk for children, In Baverstock KF, Stather JW, ed *Low dose radiation : Biological Bases of Risk Assessment*, Taylor & Francis, London:42-53, 1989.
6. Potten CS, Geng L, Taylor P. Hair medullary cell counts : a simple and sensitive indicator of radiation exposure. *Int J radiat Biol*, 57:13-21, 1990.
7. Müller W-U, Streffer C. Biological indicators for radiation damage. *Int J Radiat Biol*, 59:863-873, 1991.
8. IAEA. Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. Vienna: IAEA-SM-199/4, 1969.
9. IAEA, Biological dosimetry : chromosomal aberration analysis for dose assessment, Technical report 260. IAEA publications, Vienna: 1986.
10. Guskova AK, Barabanova AV, Baranov AY, *et al.* Acute radiation effects in victims of the Chernobyl nuclear power plant accident. *UNSCEAR Report*, 613-631, 1988.
11. Ramalho AJ, Nascimento ACH, Natarajan AT. Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiania (Brasil) radiation accident. *Radiat Protect Dosimetry*, 25:97-100, 1988.
12. Brewen JG, Preston RJ, Littlefield LG. Radiation-induced human chromosome aberration yields following an accidental whole-body exposure to <sup>60</sup>Co gamma-rays. *Radiat Res*, 49:647-656, 1972.
13. Almasy Z, Krepinsky AB, Bianci A, *et al.* The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Appl Radiat Isot*, 38: 241-249, 1987.
14. Ramalho A, Sunjevaric I, Natarajan AT. Use of frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray-induced chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. *Mutat Res*, 207:141-146, 1988.
15. He JL, Jin HY, Jin LF, *et al.* Monitoring of human exposure to radiation with the binucleated lymphocyte micronucleus assay. *Biomed Environ Sci*, 13:32-36, 2000.
16. Thierens H, Vral A, Morthier R, *et al.* Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis*, 15:245-249, 2000.
17. Kim SH, Cho CK, Kim TH, *et al.* Frequency of micronuclei in lymphocytes following gamma and fast-neutron irradiations. *Anticancer Res*, 13:1587-1592, 1993.
18. Jena GB, Bhunya SP. Mutagenicity of an organophosphate insecticide acephate--an in vivo study in chicks. *Mutagenesis*, 9:319-324, 1994.
19. Bhunya SP, Jena GB. Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (gamma-BHC): an in vivo study in chicks. *Mutat Res*, 272:175-181, 1992.
20. Wooster WE, Fechheimer NS, Jaap RG. Structural rearrangements of chromosomes in the domestic chicken: experimental production by X-irradiation of spermatozoa. *Can J Genet Cytol*, 19:437-446, 1977.
21. Natarajan AT, van Zeeland AA, Verdegaal-Immerzeel EA, *et al.* Studies on the influence of photoreactivation on the frequencies of UV-induced chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and pyrimidine dimers in chicken embryonic fibroblasts. *Mutat Res*, 69:307-317, 1980.
22. De Flora S, Bagnasco M, Zanacchi P. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine

- environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutat Res*, 258:285-320, 1991.
23. Al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res*, 343:121-135, 1995.
  24. Knowles JF. Long-term irradiation of a marine fish, the plaice *Pleuronectes platessa*: an assessment of the effects on size and composition of the testes and of possible genotoxic changes in peripheral erythrocytes. *Int J Radiat Biol*, 75:773-782, 1999.
  25. Ilyinskikh NN, Ilyinskikh EN, Ilyinskikh IN. Micro-nucleated erythrocytes frequency and radiocesium bioconcentration in pikes (*Esox lucius*) caught in the Tom River near the nuclear facilities of the Siberian Chemical Complex (Tomsk-7). *Mutat Res*, 421:197-203, 1998.
  26. Al-Sabti K. Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. *Mutat Res*, 320:157-163, 1994.
  27. Maddock MB, Northrup H, Ellingham TJ. Induction of sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in hematopoietic tissue of a marine fish following in vivo exposure to genotoxic carcinogens. *Mutat Res*, 172:165-175, 1986.
  28. Barta O, Barta V, Pierson FW. Optimum conditions for the chicken lymphocyte transformation test. *Avian Dis*, 36:945-955, 1992.
  29. Littlefield LG, Joiner EE, Colyer SP, et al. Modulation of radiation-induced chromosome aberrations by DMSO, an OH radical scavenger, 1. Dose-response studies in human lymphocytes exposed to 220 kV X-rays. *Int J Radiat Biol*, 53:875-890, 1988.
  30. Thomson EJ, Perry PE. The identification of micro-nucleated chromosomes: a possible assay for aneuploid. *Mutagenesis*, 3:415-418, 1988.
  31. Carrasco KR, Tibury LK, Myers MS. An assessment of the piscine micronuclei test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci*, 47:2123-2136, 1990.