

VEDLEJŠÍ ÚČINKY IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ II: REAKCE NEOZÁŘENÝCH BUNĚK V OKOLÍ OZÁŘENÝCH OBLASTÍ NA GENOVÉ A PROTEINOVÉ ÚROVNI

¹Jan ÖSTERREICHER, ²Jürgen VOGT, ²Tilman BUTZ, ³Leoš NAVRÁTIL, ⁴Aleš MACELA

¹Katedra radiobiologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

²Abteilung für Nukleare Festkörperphysik, Fakultät für Physik und Geowissenschaften, Universität Leipzig, SRN

³Katedra radiologie Zdravotně sociální fakulty Jihočeské univerzity, České Budějovice

⁴Ústav molekulární patologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

Souhrn

Práce stručně pojednává o jednotlivých mechanismech, které jsou indukovány v neozářených buňkách a tkáních v sousedství ozářených oblastí. Jelikož ve výzkumu vedlejších účinků nebyly popsány všechny molekulární změny, jsou zde nastíněny možné mechanismy u těch molekul, u kterých byla zjištěna zvýšená exprese v neozářených buňkách po ovlivnění látkami vyvolávajícími vedlejší účinky.

Klíčová slova: Ionizující záření; Vedlejší účinky; Mechanismus.

The Bystander Effect of Ionizing Radiation II: Reactions of Bystander Cells at the Gene and Protein Levels

Summary

This study presents briefly the bystander effect mechanisms in bystander cells and tissues at the genetic and protein level. The possible actions of overexpressed molecules in bystander cells are explained step by step, i.e. RAD 51, TP 53, CDKN1A (p21, WAF-1), Cyclin B1, p34 (cdc 2), beta 1 integrin, and interleukin 1 alpha actions in bystander mechanisms.

Key words: Irradiation; Bystander effects; Mechanisms.

Reakce neozářených buněk, tkání

Pravděpodobnost navození vedlejších účinků je ovlivňována schopností buněk a tkání reagovat na látky uvolněné ozářenými buňkami. Četnost vedlejších účinků, tj. absolutní četnost vedlejších účinků zmenšená o hodnoty kontrolní skupiny, se liší podle typu účinku. Nejmenší poměr 0,05 % mutací jako vedlejší účinek byl naměřen při pokusech s fibroblastovou linií (40). Větší poměrné zastoupení, 1–2 %, vedlejších účinků bylo zjištěno při měření výskytu apoptotických buněk a incidence mikrojader (2, 33). Vysokého poměru výskytu vedlejších účinků, do 10 % všech buněk, jsme dosáhli v našich experimentech při měření exprese beta 1 integrinu u endoteliálních buněk (30). Nejvyššího poměru poškození buněk vlivem vedlejších účinků ionizujícího záření, kolem 30 %, bylo zjištěno při měření výskytu poškození DNA typu výměny sesterských chromatid (27).

Pro lepší názornost jsou reakce vedlejších buněk a tkání schematicky rozděleny na úroveň genovou, proteinovou, buněčnou a tkáňovou, i když v praxi je takový typ odpovědi vždy komplexní.

Úroveň genová

Poprvé byly vzneseny odůvodněné obavy neplatnosti lineárně-kvadratického modelu právě na základě práce Nagasawy a Littleho (27) publikované v roce 1992, kdy autoři popsali výskyt poškození DNA typu výměny sesterských chromatid (častý následek dvojího zlomu DNA) do 30 % buněk v buněčných populacích, kde bylo ozářeno pouhé 1 % všech buněk dávkami 3–25 mGy. Tato práce je dosud jedinou, která přesně kvantifikuje vedlejší účinky na genové úrovni v závislosti na dávce záření.

Úroveň proteinová

Dosud se můžeme opírat o výsledky nemnoha experimentů sledujících změny v proteinovém složení neozářené sousední tkáně. V buňkách sousedících s ozářenými byla dosud popsána vyšší exprese TP 53 (dříve p53) (23), CDKN1A (dříve WAF-1, p21, p21^{WAF-1}) (23); p34, cyklinu B1 (dříve cyklin B), RAD 51 (1); β1 integrinu a IL-1α (30). I když jde o relativně chudé informace, je možné si na sché-

matu jednotlivých mechanismů odvodit jednotlivé typy reakcí, které pak mohou vyústit v odpověď na úrovni buněčné a tkáňové.

RAD 51

RAD 51 je protein vázaný na DNA (34). Jde o označení rodiny proteinů kódovaných na 15. chromozomu (19). Je nezbytným při opravách poškozené DNA, zejména pak u dvojitých zlomů DNA, ke kterým při ozáření dochází. RAD 51 přímo vyhledává dvojitě zlomy DNA a aktivuje proces jejich výměny (17). Svůj účinek zvyšuje zablokováním buněčného cyklu v G₁ fázi prostřednictvím nadprodukce WAF-1 (35). Tím chrání ozářenou buňku před nežádoucími následky, jakými jsou například tvorba mikrojader či maligní transformace způsobené dvojitými zlomy DNA (36). Navíc negativní korelace mezi tvorbou mikrojader a hladinami RAD 51 byla prokázána (3). I když příliš vysoké hladiny RAD 51 tlumí rychlost, s jakou se DNA opravuje (9), lze obecně považovat tuto molekulu za ochranný faktor, který brání zániku buňky v důsledku velkého počtu dvojitých zlomů DNA (34). V neposlední řadě je zajímavý mechanismus zvýšení hladin RAD 51 při inhibici kaspázy 3 (38), jednoho z nejdůležitějších enzymů v procesu apoptózy, který spouští nevratné procesy (11). Tedy pozastavením programované buněčné smrti je urychlováno vyhledávání a následná oprava dvojitých zlomů DNA.

Ochranný vliv RAD 51 neomezuje svojí působnost jen v postradiačních pochodech, případně u vedlejších účinků. Jeho aktivace byla prokázána u celé řady příčin majících za následek vznik dvojitých zlomů DNA, jako jsou UV-záření (3) a chemické mutageny (cis-platina a mitomycin C) (36). V neposlední řadě poškození genu kódujícího RAD 51 bylo prokázáno u významné subpopulace žen s karcinomem prsu (15).

Cyklin B a p34

Cyklin B je molekulou přítomnou v jádře, která je zvýšeně tvořena při přechodu buňky z G₂ fáze do mitózy (31). Spolu s p34 (cyklin dependentní kinázou 2 – cdc 2) vytváří maturační faktor (v originále maturation promoting factor – MPF) (39). Cyklin B1 je zakódován v 5. chromozomu (26). *In vitro* byl prokázán programovaný úbytek cyklinu B1 závislý na generačním stáří buňky, kdy nízké hladiny cyklinu B1 v poslední generaci zapříčinily blok buněk v G₂ fázi a zastavení dalšího dělení buňky (22).

Cyklin dependentní kináza 1 (p34) je druhou částí dimeru označovaného jako maturační faktor (39). Tento protein je kódován v 10. chromozomu (28). Svojí interakcí s cyklinem B1 kontroluje přechod buněk z G₂ fáze do mitózy a samotný pak je klíčový pro přechod buňky z G₁ do S fáze (20).

Pokud máme informace o zvýšené produkci cyklinu B1 v neozářených buňkách, které jsou ovlivněny látkami indukující vedlejší účinky, pak je možné se domnívat, že jde o kompenzační mechanismus. Ten dovoluje buněčné populaci s omezenou životností měřenou počtem generací ještě několik mitóz navíc tak, aby nově vzniklé buňky doplnily početní úbytek části buněčné populace způsobený poškozením DNA.

TP 53, p21 a WAF-1

Tumor supresorový protein TP 53 je přirozeně se vyskytujícím proteinem, bez něhož dochází k poruchám regulace buněčného cyklu a diferenciaci (5, 35), což může vést ke tvorbě nádoru. TP 53 koordinuje adaptivní odpověď na genotoxický stres, jakým je ozáření buňky (24). Podílí se především na vstupu buňky do programované buněčné smrti, apoptózy (5, 35), a také na blokádě buněčného cyklu, zejména v G₂ fázi (35).

Není bez zajímavosti, že zhášec kyslíkových radikálů WR-1065, který je přirozeným metabolitem jiné úspěšně vyzkoušené radioprotektivní látky WR-2721 (známý pod jménem gamafos či Ethylol) (18), normalizuje jeden typ mutantní formy TP 53 do funkční formy (29).

Názvy p21 či Cip-1 (cyclin dependent kinase – interacting protein 1) a WAF-1 (wildtype p53 – activated fragment 1) jsou dnes již zastaralé. Preferovaným označením těchto proteinů je 1A inhibitor cyklin dependentní kinázy (v originálu cyclin dependent kinase inhibitor 1A) s mezinárodně uznanou zkratkou CDKN1A (7).

Prostřednictvím TP 53 jsou aktivovány geny CDKN1A (5). Tyto se podílejí především na blokádě buněčného cyklu v G₂ fázi inhibicí cyklin-dependentních kináz (35). Tvorbu p21 lze také vyvolat růstovými faktory, což je nezbytnou podmínkou vyžrávání buněk (35).

Navíc protein CDKN1A (publikován jako p21) je úzce spjat s funkcí RAD 51. Bylo prokázáno, že při vysokých hladinách RAD 51 se zvyšuje tvorba CDKN1A (p21) a naopak při útlumu CDKN1A (p21) jsou hladiny RAD 51 sníženy (34). Tedy 1A inhibitor cyklin-dependentních kináz patří mezi významné regulátory buněčného cyklu.

Z výše uvedeného vyplývají některé mechanismy, které se odehrávají v buňkách s poškozenou DNA, a je možné je shrnout do následujícího scénáře: po ozáření jsou zvýšeně aktivovány signální cesty, v důsledku toho je syntetizován TP 53. Ten cestou zvýšení hladiny CDKN1A zablokuje buněčný cyklus v G₂ fázi. Zvýšením CDKN1A se také aktivuje zvýšená tvorba RAD 51, který napomáhá opravovat dvojitě zlomy dvoušroubovice DNA. RAD 51 zpětnou vazbou dále zvyšuje tvorbu CDKN1A a pomáhá bloko-

vat buňku v G_2 fázi do té doby, než se ozářením vyvolaná poškození opraví. Pokud na takto poškozenou buňku působí proliferační faktory, může vlivem CDKN1A diferencovat, anebo při vysokých hladinách TP 53 může vstoupit do apoptózy. U buněk s opravenou DNA je pak aktivován cyklin B1 a p34 (cdc 2), který jako maturační faktor umožní buňce vstup do mitózy. Vysoké hladiny cyklinu B1 a p34 (cdc 2) mohou zvýšit maximálně dosažitelný

počet dělení ve sledované buněčné populaci a tím do jisté míry nahradit odumřelou subpopulaci v důsledku poškozené DNA.

Je tedy zřejmé, že vedlejší účinky ionizujícího záření vyvolávají v buňkách v okolí ozářené tkáně stejné či podobné mechanismy jako v ozářené oblasti. Je jen otázkou, které mechanismy převládají v ozářených buňkách a které dominují v sousedních partiích.

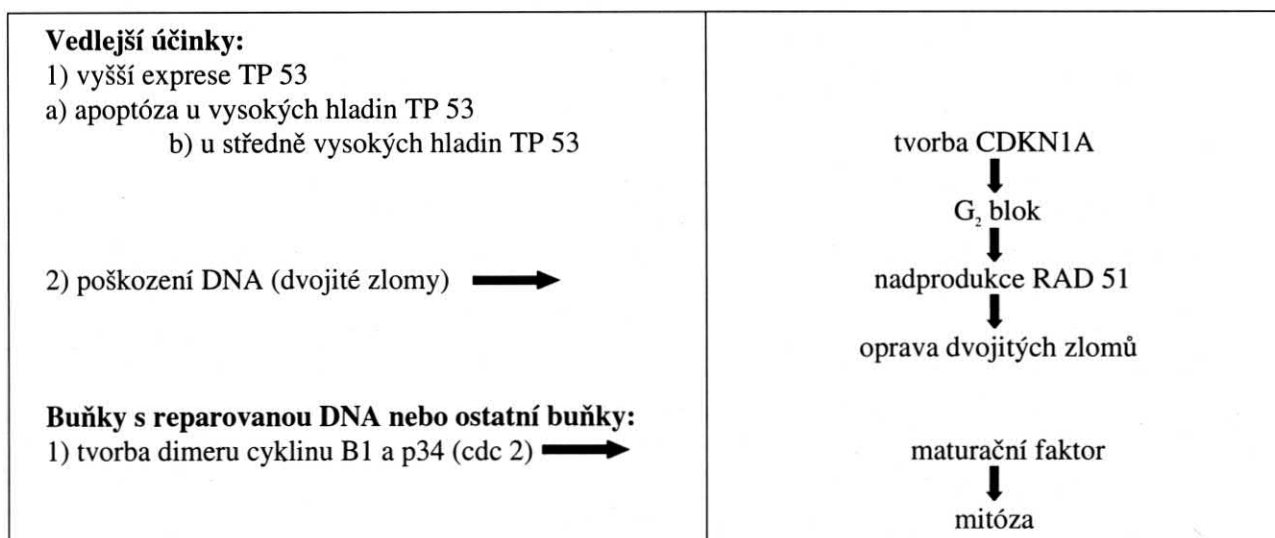


Schéma 1: Možné mechanismy aktivované vlivem vedlejších účinků

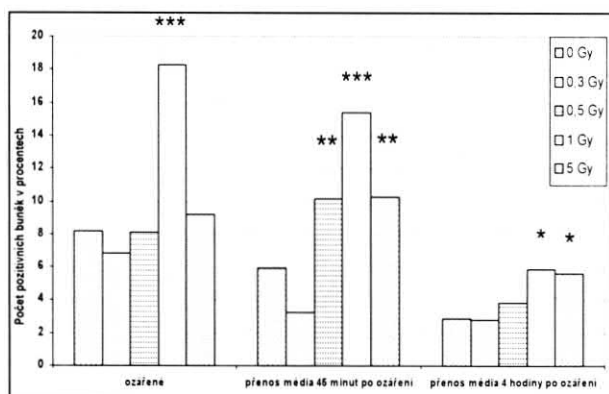
Integrin beta 1 (CD 29)

Proteiny integrinové rodiny patří do skupiny adhezních molekul reagujících zejména mezi imunokompetentními a endoteliálními buňkami a které svým působením umožňují penetraci leukocytů z cév do cílových tkání (13).

Integrin beta 1 je receptorem, který se vyskytuje především na membránách leukocytů a endoteliálních buněk a umožňuje zejména neutrofilním granulocytům vázat složky vmezeřené tkáně, jako jsou laminin, fibronectin, kolagen a denaturované proteiny (4, 8, 37). Zvýšená přítomnost integrinu na buněčných membránách je podmíněna aktivací buněk ve smyslu proběhnutí signální transdukce. Nejpozději do 20–30 minut po proniknutí signálu do buňky se zásobní molekuly integrinu přesunou z Bode-Palladeho tělísek situovaných v cytoplasmě na povrch buněčné membrány (6, 14, 32). Takovým signálem může být jakýkoli prozánětlivý stimul včetně ionizujícího záření (12). Dalším takovým signálem mohou být prozánětlivé cytokiny samotné, jejichž prostřednictvím se spouští úvodní fáze zánětlivé odpovědi organismu, ale jsou také schopné svůj účinek zvýraznit navozením vysoké přítomnosti integrinu na membránách endoteliálních buněk, což přispívá k dalšímu prohloubení zánětlivé reakce (16, 21).

Tento fakt však nevysvětluje zvýšené hladiny integrinu u sousedních buněčných populací. Zde by měly být signálem molekuly pocházející z ozářených buněk.

Zvýšené hladiny beta 1 integrinu byly pozorovány v našich experimentech s linií hybridních endoteliálních buněk, kdy vedlejší účinky byly navozeny přenosem média z ozářených buněčných populací (30). Z našich experimentů vyplývá (30), že hladiny beta 1 integrinu v neozářené populaci byly zvýšeny ve dvou fázích. Maximální hodnoty byly zjištěny v nejčasnějším měřeném časovém intervalu, tj. za hodinu po přenosu média. Druhé zvýšení hladin beta 1 integrinu bylo pozorováno za 24 hodin po přenosu média z ozářených buněčných populací. První zvýšení lze vysvětlit okamžitou reakcí buněk na látku vyvolávající vedlejší účinky. Pozdější vyšší přítomnost integrinu na buněčných membránách je možné interpretovat nepřímým mechanismem, kdy vysoké hladiny interleukinu 1 (viz dále) mohou být příčinou dalšího zvýšení hladin integrinu v buňkách sousedících s buňkami ozářenými. Toto pozdější zvýšení přítomnosti integrinu 24 hodin po přenosu kultivačního média však dosahuje zhruba polovičních hodnot časné nadprodukce integrinu naměřené hodinu po transportu média z ozářené populace.



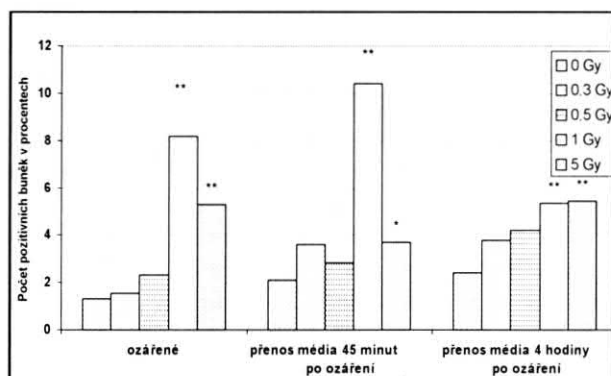
Graf 1: Expresí integrinu beta 1 hodinu po ozáření či přenosu média (30). Časný přenos média byl proveden 45 minut po ozáření a pozdější 4 hodiny po ozáření. Statistické významnosti jsou vztaheny k 0 Gy pro každou skupinu.

Interleukin 1 alfa

Interleukin 1 alfa (IL-1 alfa) je klíčovou molekulou rozvíjející akutní zánětlivou odpověď organismu. Patří do proteinové rodiny cytokinů, které se významně podílejí na mezibuněčné komunikaci. V případě klasické zánětlivé odpovědi na cizí antigen je IL-1 alfa uvolněn makrofágy po aktivaci antigenem a jeho hlavní funkcí je vyvolání chemotaxe T-lymfocytu. IL-1 alfa pak sám dokáže v místě působení navodit zvýšené hladiny ostatních cytokinů, jako jsou IL-2, IL-6, TNF-alfa, PDGF (25). Do souboru jeho funkcí také patří navození vyšších hladin integrinu na endoteliálních buňkách (10).

Při našem studiu vedlejších účinků byla také zjištěna vyšší produkce IL-1 alfa u neozařených populací po transportu média z ozářených buněk (30).

To znamená, že také u neozařených tkání sousedících s ozářenou oblastí lze očekávat přinejmenším vyšší citlivost na rozvoj zánětu nebo rozvoj zánětlivé odpovědi samotný. Tím je možné přiřadit rozvoj zánětlivé odpovědi organismu mezi vedlejší účinky ionizujícího záření.



Graf 2: Expresí IL-1 alfa u ozářených buněk a buněk ovlivněných vedlejšími účinky. Časný přenos média byl proveden 45 minut po ozáření a pozdější 4 hodiny po ozáření. Statistické významnosti jsou vztaheny k 0 Gy pro každou skupinu.

Literatura

1. AZZAM, EI. – De TOLEDO, SM. – GOODING, T., et al. Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat. Res.*, 1998, vol. 150, p. 497–504.
2. BELYAKOV, OV. – MALCOLMSON, AM. – FOLKARD, M., et al. Direct evidence for bystander effect of ionising radiation in primary human fibroblasts. *Br. J. Cancer*, 2001, vol. 84, p. 674–679.
3. BISHAY, K., – ORY, K., – OLIVIER, M.F., et al. DNA damage-related RNA expression to assess individual sensitivity to ionizing radiation. *Carcinogenesis*, 2001, vol. 8, p. 1179–1183.
4. BOHNSACK, J.F., – ZHOU, X.-N. Divalent cation substitution reveals CD18- and very late antigen-dependent pathways that mediate human neutrophil adherence to fibronectin. *J. Immunol.*, 1992, vol. 149, p. 1340–1347.
5. BOUVARD, V. – ZAITCHOUK, T. – VACHER, M., et al. Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene*, 2000, vol. 19, p. 649–660.
6. BURRIDGE, K., FATH, K., KELLY, T., et al. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1988, vol. 4, p. 487–525.
7. DAINO, K. – ICHIMURA, S. – NENOI, M. Early induction of CDKN1A (p21) and GADD45 mRNA by a low dose of ionizing radiation is due to their dose-dependent post-transcriptional regulation. *Radiat. Res.*, 2002, vol. 157, p. 478–482.
8. DAVIS, GE. The Mac-1 and p 150,95 beta 2 integrins bind denatured proteins to mediate leukocyte cell-substrate adhesion. *Exp. Cell Res.*, 1992, vol. 200, p. 242–252.
9. FORRESTER, K. – AMBS, S. – LUPOLD, SE., et al. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996, vol. 93, p. 2442–2247.
10. GAO, J.-X. – WILKINS, J. – ISSEKUTZ, AC. Migration of human polymorphonuclear leukocytes through a synovial fibroblast barrier is mediated by both beta2 (CD11/CD18) integrins and the beta 1 (CD29) integrins VLA-5 and VLA-6. *Cell Immunol.*, 1995, vol. 163, p. 178–186.
11. GODAR, DE. UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *J. Invest. Dermatol.*, 1999, vol. 112, p. 101–111.
12. HEMLER, ME. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, 1990, vol. 8, p. 365–400.
13. HYNES, RO. Integrins: Versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell*, 1992, vol. 69, p. 11–25.
14. INGBER, D. Integrins as mechanochemical transducers. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1991, vol. 3, p. 841–848.
15. KATO, M. – YANO, K. – MATSUO, F., et al. Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J. Hum. Genet.*, 2000, vol. 45, p. 133–137.
16. KIM, LT. – YAMADA, KM. The regulation of expression of integrin receptors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1997, vol. 214, p. 123–130.
17. KIM, PM. – ALLEN, C. – WAGENER, BM., et al. Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 2001, vol. 29, p. 4352–4360.

18. KUNA, P. *Chemická radioprotekce*. 1. vyd. Praha, Avicenum, 1985. 148 s.
19. LEASURE, CS. — CHANDLER, J. — GILBERT, DJ., et al. Sequence, chromosomal location and expression analysis of the murine homologue of human RAD51L2/RAD51C. *Gene*, 2001, vol. 271, p. 59–67.
20. LEE, MG. — NURSE, P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, 1987, vol. 327, p. 31–35.
21. LO, SK. — LEE, S. — RAMOS, RA., et al. Endothelial-leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha m beta 2) on human neutrophils. *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 173, p. 1493–1500.
22. LOCK, LF. — PINES, J. — HUNTER, T., et al. A single cyclin A gene and multiple cyclin B1-related sequences are dispersed in the mouse genome. *Genomics*, 1992, vol. 13, p. 415–424.
23. MATSUMOTO, H. — HAYASHI, S. — HATASHITA, M., et al. Induction of radioresistance by a nitric oxide-mediated bystander effect. *Radiat. Res.*, 2001, vol. 155, p. 387–396.
24. MATSUMOTO, H., — WANG, X., — OHNISHI, T. Binding between wild type p53 and hsp 72 accumulated after UV and gamma ray irradiation. *Cancer Lett.*, 1995, vol. 92, p. 127–133.
25. MAWATARI, M. — KOHNO, K. — MIZOKUCHI, H., et al. Effects of tumor necrosis factor and epidermal growth factor on cell morphology, cell surface receptors, and the production of tissue inhibitor of metalloproteinases and IL-6 in human microvascular endothelial cells. *J. Immunol.*, 1989, vol. 143, p. 1619–1627.
26. MILATOVICH, A. — FRANCKE, U. Human cyclin B1 *nol.*, 1989, vol. 143, p. 1619–1627.
26. MILATOVICH, A. — FRANCKE, U. Human cyclin B1 gene (CCNB1) assigned to chromosome 5 (q13-qter). *Somat. Cell Molec. Genet.*, 1992, vol. 18, p. 303–307.
27. NAGASAWA, H. — LITTLE, JB. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha particles. *Cancer Res.*, 1992, vol. 52, p. 6394–6396.
28. NAZARENKO, SA. — OSTROVERHOVA, NV. — SPURR, NK. Regional assignment of the human cell cycle control gene *CDC2* to chromosome 10q21 by in situ hybridization. *Hum. Genet.*, 1991, vol. 87, p. 621–622.
29. NORTH, S. — PLUQUET, O. — MAURICI, D. Restoration of wild-type conformation and activity of a temperature-sensitive mutant of p53 (p53(V272M)) by the cytoprotective aminothiol WR1065 in the esophageal cancer cell line TE-1. *Mol. Carcinog.*, 2002, vol. 33, p. 181–188.
30. ÖSTERREICHER, J. — JAHNS, J. — HILDEBRANDT, G., et al. The Beta 1 Integrin and Interleukin 1 alpha Expression on the Bystander Effect Model via Medium Transport. *Radiother. Oncol.*, 2002, in press.
31. PINES, J. — HUNTER, T. Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34(*cdc2*). *Cell*, 1989, vol. 58, p. 833–846.
32. PLOPPER, G. — INGBER, DE. Rapid induction and isolation of focal adhesion complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, vol. 193, p. 571–578.
33. PRISE, KM. — BELYAKOV, OV. — FOLKARD, M., et al. Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1998, vol. 74, p. 793–798.
34. RADERSCHALL, E. — BAZAROV, A. — CAO, J., et al. Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. *J. Cell Sci.*, 2002, vol. 115, p. 153–164.
35. REINKE, V. — LOZANO, G. Differential activation of p53 targets in cell treated with ultraviolet radiation that undergo both apoptosis and growth arrest. *Radiat. Res.*, 1997, vol. 148, p. 115–122.
36. SLUPIANEK, A. — SCHMUTTE, C. — TOMBLINE, G., et al. BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Molec. Cell*, 2001, vol. 8, p. 795–806.
37. SPRINGER, TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 1990, vol. 346, p. 425–434.
38. THORNBERRY, NA. — LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science*, 1998, vol. 281, p. 1312–1316.
39. TOYOSHIMA-MORIMOTO, F., — TANIGUCHI, E., — SHINYA, N., et al. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature*, 2001, vol. 410, p. 215–220.
40. WU, L-J. — RANDERS-PEHRSON, G. — XU, A., et al. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, vol. 96, p. 4959–4964.

Korespondence: Mjr. doc. MUDr. Jan Österreicher, Ph.D.
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: osterreicher@pmfhk.cz

Do redakce došlo 17. 6. 2002