

EWA WÓJCIK, ELŻBIETA SMALEC

*Instytut Bioinżynierii i Hodowli Zwierząt
Akademia Podlaska
B. Prusa 14, 08-110 Siedlce
E-mail: wojcik@ap.siedlce.pl*

WYMIANA CHROMATYD SIOSTRZANYCH W CHROMOSOMACH

WSTĘP

Zainteresowanie chromosomami rozwija się od początku XX w. Starano się przede wszystkim określić liczbę oraz prawidłowy obraz i funkcjonowanie chromosomów zarówno człowieka, jak i różnych gatunków zwierząt i roślin. Prawidłowe funkcjonowanie chromosomu w dużej mierze uzależnione jest od właściwej struktury i organizacji chromosomowego DNA. Wszelkie zmiany w cząsteczce DNA powodują zakłócenia w procesie replikacji i transkrypcji. Zaburzenia funkcjonowania komórki są efektem uszkodzenia DNA i chromosomu. Chromosomy

są strukturami wrażliwymi i podatnymi na uszkodzenia pod wpływem niekorzystnych czynników środowiskowych. W badaniach dotyczących oceny niestabilności chromosomowej szczególnie czołowym testem cytogenetycznym, wykrywającym uszkodzenia DNA, jest test SCE (ang. sister chromatid Exchange, wymiany chromatyd siostrzanych) (LATT i współaut. 1981). Daje on odpowiedź w jakim stopniu chromosomy są wrażliwe na czynnik uszkodzający i jakie jest natężenie jego genotoksycznego działania.

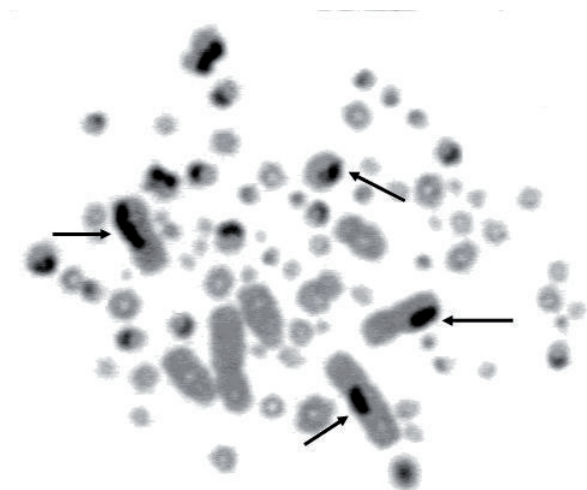
WYMIANA CHROMATYD SIOSTRZANYCH

Wymiana chromatyd siostrzanych, to obustronne wymiany homologicznych segmentów chromatyd tego samego chromosomu. Następują one po replikacji, w trakcie cyklu komórkowego, gdy chromatydy siostrzane są połączone obręczkami białek kohezyjnych, i między identycznymi sekwencjami DNA, znajdującymi się blisko siebie, dochodzi do wymian. SCE jest wynikiem semikonserwatywnej replikacji DNA z uszkodzonej matrycy i może pojawić się tylko wtedy, gdy zmiany w DNA nie zostaną usunięte zanim komórka wejdzie w fazę S (WÓJCIK i współaut. 2004, BAYANI i SQUIRE 2005). W komórkach hodowanych *in vitro* liczba SCEs w pierwszym cyklu komórkowym jest niższa niż w drugim, kiedy następuje kumulacja błędów powstałych podczas replikacji, oczekujących na naprawę w następnym cyklu komórkowym

(WÓJCIK i współaut. 2003, 2005) (hodowla komórkowa *in vitro* np. limfocytów, trwa 72 godziny, podczas której zachodzą pełne trzy cykle komórkowe). SCE jest odzwierciedleniem uszkodzeń DNA, chociaż do pewnego stopnia jest zgodna z normalnymi procesami komórkowymi (SHAFFER 1977, PAINTER 1980, WÓJCIK i współaut. 2004). Około 10 wymian chromatyd siostrzanych następuje spontanicznie w normalnym cyklu ludzkich komórek, co świadczy o powiązaniu SCE z replikacją DNA (SONODA i współaut. 1999).

Wymiana chromatyd siostrzanych jest zjawiskiem często zachodzącym w naturze i jest wyrazem znaczącego, biologicznego procesu, który zachował się w trakcie ewolucji (patrz WÓJCIK i współaut. 2004).

Tworzenie SCE jest skorelowane z naprawą rekombinacyjną, indukacją mutacji punk-



Ryc. 1. Wymiana chromatyd siostrzanych w chromosomach gęsi *Anser anser* – strzałkami zaznaczono chromosomy, w których doszło do wymiany fragmentów pomiędzy chromatydami siostrzanymi (WÓJCIK i współaut. 2007).

towych, amplifikacją genów i cytotoksycznością. Według GERMAN i ALHADEFF (2001) SCE może być rozpoznawana w postaci nagłych braków w ciągłości zabarwionych wzorów dwóch chromatyd tego samego chromosomu. Dowodem na istnienie SCE jest obecność chromosomów harlekinowych (jedna chromatyda w chromosomie jest ciemna, druga jasna) lub asymetrycznie wybarwionych chromatyd w chromosomie (Ryc. 1) (BAYANI i SQUIRE 2005).

MECHANIZM POWSTAWANIA SCE

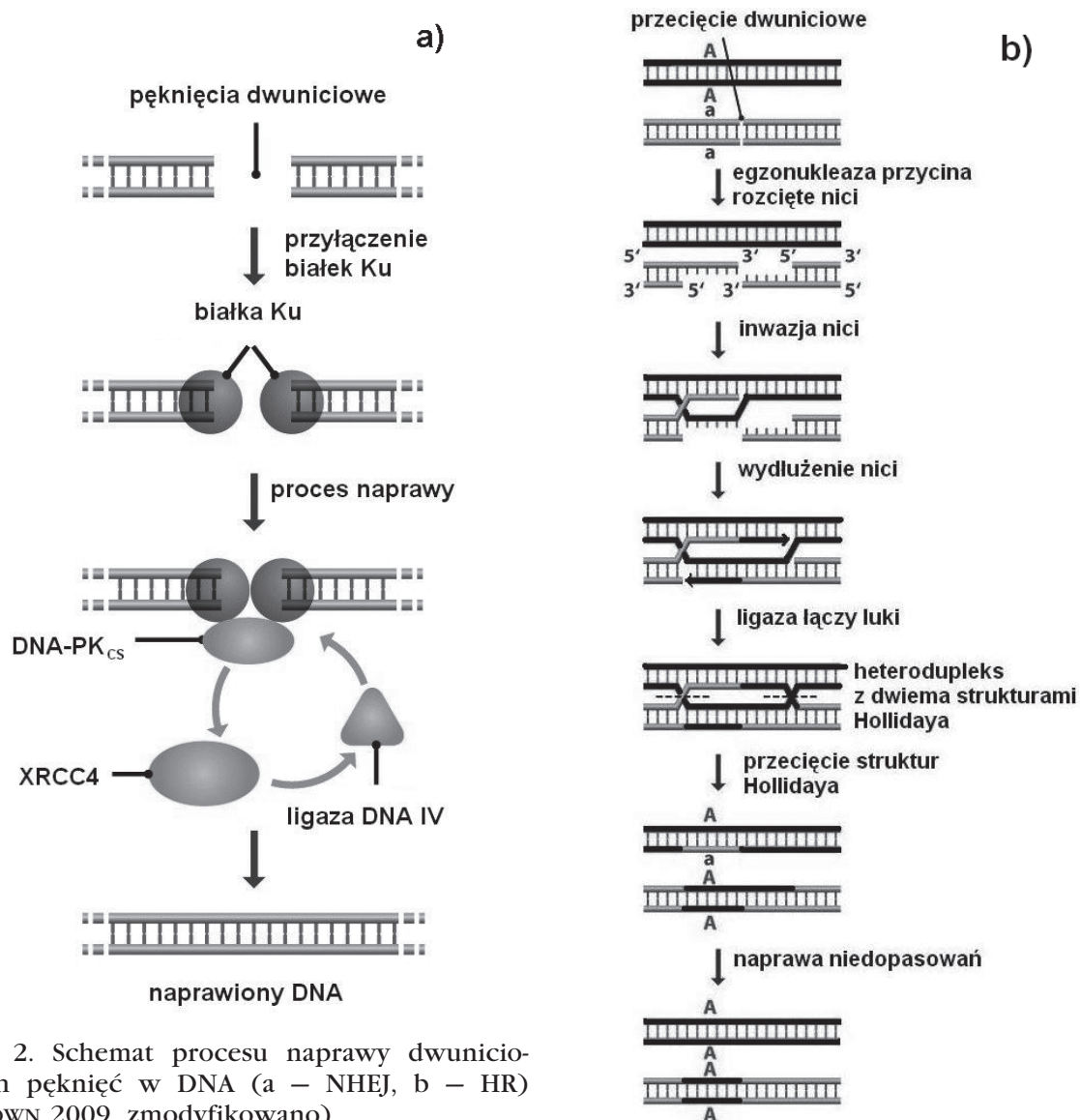
Molekularny mechanizm powstawania SCE nie jest do końca poznany i stanowi przedmiot wielu współczesnych badań. SCE spontaniczny i indukowany różnią się między sobą, co sugeruje, że może być więcej niż jedna droga molekularna, która prowadzi do powstawania SCE. Ponieważ SCE powstaje wtedy, gdy pośredni produkt połączenia Holliday rozkłada się w jednym z dwóch kierunków, zmiana kierunku powoduje niezgodności i błędy np. w komórkach mutanta (WILSON i THOMPSON 2007).

Spontaniczne lub indukowane SCEs są powiązane z replikacją DNA. Proces replikacji jest katalizowany przez polimerazę DNA, która wykorzystuje jednoniciowy DNA jako matrycę. Synteza zachodzi w widełkach replikacyjnych. Dwuniciowy DNA jest rozplatany przez helikazę, a następnie stan ten jest utrzymywany dzięki białkom SSB (ang. single-stranded binding protein). Każda no-

wopowstała dwuniciowa cząsteczka DNA zawiera jedną nić rodzicielską i drugą, zsyntetyzowaną na zasadzie komplementarności. Replikacja musi przebiegać z dużą dokładnością, ponieważ każdy błąd może prowadzić do utraty informacji genetycznej lub wygenerowania SCEs (SIMPSON i SALE 2006).

Wymiana chromatyd siostrzanych jest inicjowana przez pęknięcia nici DNA, do których dochodzi na skutek działania czynników endo- i egzogennych. Czynniki zaburzającymi ciągłość nici i powodującymi pęknięcia jednoniciowe (ang. single strand break SSB) są: niedobór genu naprawy DNA *XRCC1*, zahamowanie aktywności polimerazy poli(ADP-rybozy) 1 (PARP-1), działanie nadtlenu wodoru oraz zahamowanie syntezy DNA przez niektóre leki przyczyniające się do pęknięcia widełek replikacyjnych. A więc SSBs pośredniczą w powstawaniu SCE. Podczas procesu tzw. „załamania się widełek replikacyjnych” dochodzi do przetworzenia pękniętej jednej nici DNA w pęknięcie dwuniciowe. Gdy widełki replikacyjne napotyka na uszkodzenie dochodzi do ich zatrzymania. W noworeplikowanym fragmencie nici DNA powstaje przerwa w miejscu zatrzymania widełek lub w ich pobliżu. Efektem jest pęknięcie dwuniciowe. Takie uszkodzenie powoduje oddysocjowanie kompleksu replikacyjnego od DNA i rozpoczęcie replikacji DNA indukowanej pęknięciem (ang. break induced replication, BIR), zależnej od systemu homologicznej replikacji. W odróżnieniu od naprawy dwuniciowego pęknięcia DNA, BIR jest indukowana przez jeden koniec DNA. Wznowienie replikacji następuje po wypełnieniu luki w potomnej cząsteczce DNA spowodowanej przerwaniem procesu replikacji i, następującej po tym zdarzeniu, inwazji zakończenia uszkodzonego DNA na drugą homologiczną cząsteczkę DNA, powstałą na nieuszkodzonej nici matrycowego DNA. Do wygenerowania SCEs dochodzi w tym systemie w komórkach z wyłączonymi genami kodującymi białka, które są odpowiedzialne za naprawę pęknięć jednoniciowych (*XRCC1*, *PARP-1*) (patrz POPLAWSKI i BŁASIAK 2006).

Pęknięcia dwuniciowe (ang. double strand break, DSB) są najpoważniejszymi uszkodzeniami DNA, podczas których dwie komplementarne nici podwójnej helisy DNA ulegają jednoczesnemu przerwaniu w miejscach położonych blisko siebie. Pojedyncze nienaprawione DSBs mogą indukować proces apoptozy komórki. DSBs mogą występować w prawidłowych komórkach, np. pod-



Ryc. 2. Schemat procesu naprawy dwuniciowych pęknięć w DNA (a – NHEJ, b – HR) (BROWN 2009, zmodyfikowano).

czas różnicowania limfocytów czy komórek rozrodczych bądź też mogą powstawać pod wpływem różnorodnych czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych (patrz PODHORECKA 2009). Należą do nich między innymi wolne rodniki tlenowe, hydroksykarbamid, inhibitory replikacji DNA, np. afidokolina (PODHORECKA 2009). DSBs indukują także leki przeciwnowotworowe (np. etoposyd i kamptotecyna), które hamują ligację nici naciętych punktowo przez topoizomerazę I i topoizomerazę II, ponieważ hamują one odłączenie cząsteczek enzymów topo od nici DNA, a następnie indukują apoptozę komórki (w przeciwnym razie czynniki te działałyby raczej pro- niż antyapoptogennie).

Występują dwa mechanizmy naprawy dwuniciowych pęknięć w DNA.

1) Najczęściej występuje mechanizm niehomologicznego łączenia końców DNA (ang. nonhomologous end-joining, NHEJ) (Ryc. 2a). Naprawa DSB za pomocą NHEJ polega na połączeniu dwóch uszkodzonych końców DNA na drodze procesu ligacji. W NHEJ bierze udział kompleks białkowy, który kieruje ligazę DNA do miejsca pęknięcia. W skład kompleksu wchodzi dwie cząsteczki białka Ku, wiążące się z końcami DNA po obu stronach pęknięcia i powodujące zbliżanie do siebie obu końców przerwanej cząsteczki DNA. Ku wiąże się z DNA wraz z kinazą białkową DNA-PK_{CS}, aktywującą trzecie białko, XRCC4, które oddziałuje z ligazą DNA IV, kierując to białko naprawcze w miejsce dwuniciowego pęknięcia (BROWN 2009). Proces ten jest niedokładny i często powoduje

zmiany w sekwencji DNA, które mogą być rejestrowane jako wymiany chromatyd siostrzanych.

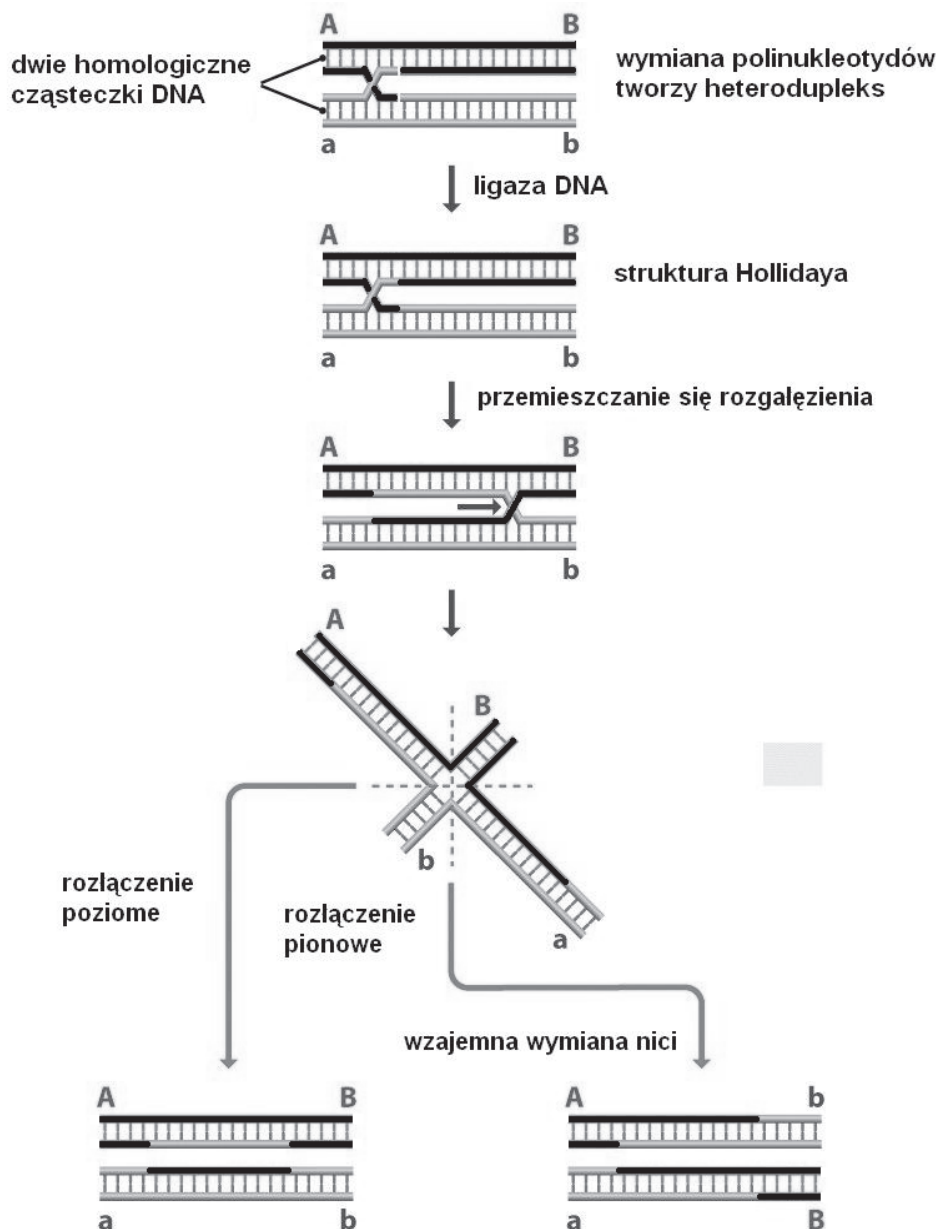
2) Drugim sposobem naprawy DSBs jest system rekombinacji homologicznej (ang. homologous recombination, HR). Rozpoczyna się on od dwuniciowego przecięcia. Po zajściu pęknięcia, na każdej z dwóch nici zachodzi wycięcie wielu nukleotydów. W efekcie pozostają w niej jednoniciowe końce 3'. Jeden z końców dokonuje inwazji homologicznej cząsteczki DNA (np. przez polimerazę DNA), tworząc strukturę Hollidaya, która może się przemieszczać wzdłuż heterodupleksu. Aby uzupełnić heterodupleks, druga z nici, która nie brała udziału w tworzeniu struktury Hollidaya, również jest wydłużana. W reakcji syntezy DNA wydłużanie nici odbywa się z użyciem odpowiednich obszarów nieprzeciętego elementu jako matrycy. Powstający po ligacji heterodupleks zawiera dwie struktury Hollidaya, które mogą być rozłączone wieloma sposobami. Niektóre mogą prowadzić do konwersji genu bądź do zwykłej wzajemnej wymiany nici (Ryc. 2b) (BROWN 2009). HR mediuje SCE poprzez ponowne uruchomienie widełek replikacyjnych pękniętego DNA, wówczas gdy napotykają one lukę w jednej z rodzicielskich nici. HR w podobny sposób przetwarza pęknięte widełki wytworzone przez genotoksyny, działające jak inhibitory replikacji. W komórkach, które miały niższy poziom HR, również poziom spontanicznego SCE był znacznie zredukowany (patrz WILSON i THOMPSON 2007). Także SONODA i współaut. (1999) uważają HR za jeden z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za wymiany chromatyd siostrzanych w komórkach kręgowców. Mechanizm wyboru pomiędzy NHEJ a HR jest jeszcze słabo poznany (POPŁAWSKI i współaut. 2009). Istnieje wiele hipotez dotyczących konkurencji jaka zachodzi między tymi dwoma systemami. System HR jest pobudzany w odpowiedzi na czynniki powodujące powstawanie DSBs, jak również przez związki alkilujące, jony metali ciężkich, promieniowanie UV czy związki sieciujące, w przeciwieństwie do NHEJ. Związki aktywujące HR mogą wpływać na proces replikacji i tym samym aktywować HR. HR jest odpowiedzialny za naprawę pęknięć dwuniciowych z dwoma końcami i jednym końcem, jak również za naprawę uszkodzeń DNA w pobliżu zatrzymanych widełek replikacyjnych. NHEJ bierze udział w naprawie tych uszkodzeń DNA, które zatrzymują widełki replikacyjne i zostają przekształco-

ne w DSBs. HR jest procesem efektywnym, charakteryzującym się dużą wiernością w odtwarzaniu informacji. Jednak naprawa w szlaku HR wymaga znacznie więcej czasu niż w systemie NHEJ, który częściej występuje u Eukariota. Naprawa typu HR wymaga występowania nieuszkodzonego, homologicznego, dwuniciowego fragmentu DNA. Chromatyd siostrzany, służący jako matryca do odtworzenia DNA, są obecne w późnej fazie S i G₂. W fazie G₀ i G₁ cyklu komórkowego NHEJ jest dominującym systemem naprawy. Ponadto, długi okres potrzebny do nacięcia nici z wytworzeniem wolnych końców 3' w HR sprawia, że wolne końce DNA są dostępne również dla składników NHEJ, ubiegając białka HR (POPŁAWSKI i BŁASIAK 2005, 2006).

PROCES CROSSING-OVER A SCE

Crossing-over polega na wzajemnej wymianie odpowiadających sobie położeniem odcinków chromatyd chromosomów homologicznych. Zachodzi w profazie I podziału mejotycznego, w pachytenie. Różnica między procesem crossing-over a wymianą chromatyd siostrzanych dotyczy czasu, miejsca i mechanizmu zachodzenia procesów. SCE zachodzi w obrębie chromatyd tego samego chromosomu, natomiast crossing-over dotyczy wymiany między dwiema niesiostrzanymi chromatydami chromosomów homologicznych. Proces crossing-over powstaje na skutek symetrycznych pęknięć w dwóch homologicznych cząsteczkach DNA i ponownego łączenia, prowadzących do utworzenia heterodupleksu. Powstałe przerwy są sklepane przez ligazę DNA i powstaje struktura Hollidaya. Rozłączenie struktury Hollidaya następuje poprzez przecięcie w miejscu rozgałęzienia. Przecięcie może nastąpić w jednej z dwóch orientacji: poziomo lub pionowo. Jeżeli nacięcie następuje poziomo, wówczas dochodzi jedynie do wymiany krótkiego fragmentu łańcucha polinukleotydowego. Przecięcie pionowe powoduje wzajemną wymianę nici. DNA zostaje wymieniony między cząsteczkami tak, że zmieniają się one końcami (Ryc. 3). Jest to wymiana obserwowana podczas crossing-over (rekombinacja genetyczna, wewnątrzchromatydowa) (BROWN 2009).

Proces crossing-over jest zdarzeniem losowym i zachodzi w przypadkowym miejscu. Jednak losowość wystąpienia tego zjawiska w określonym miejscu chromosomu wpływa ograniczająco na możliwość zajścia crossing-over w pobliżu (zjawisko interferencji). Proces crossing-over zachodzi w niektórych częściach



Ryc. 3. Schemat procesu crossing-over (BROWN 2009, zmodyfikowano).

chromosomu rzadziej, np. w pobliżu centromerów, albo częściej, np. w terminalnych częściach chromosomu, w obrębie prążków T, które są nasycone parami G-C. Są to tzw. gorące punkty rekombinacji (BROWN 2009). Crossing-over jest zjawiskiem obligatoryjnym i musi zajść w obrębie każdego bivalentu. Prowadzi do powstania nowych układów genowych. Chromatydy składają się z fragmentów o pochodzeniu ojcowskim i matczynym. Rekombinacja sprawia, że gamety nie są identyczne pod względem zestawu alleli. Obok mutacji, rekombinacja jest główną przyczyną zmienności genetycznej wśród organizmów.

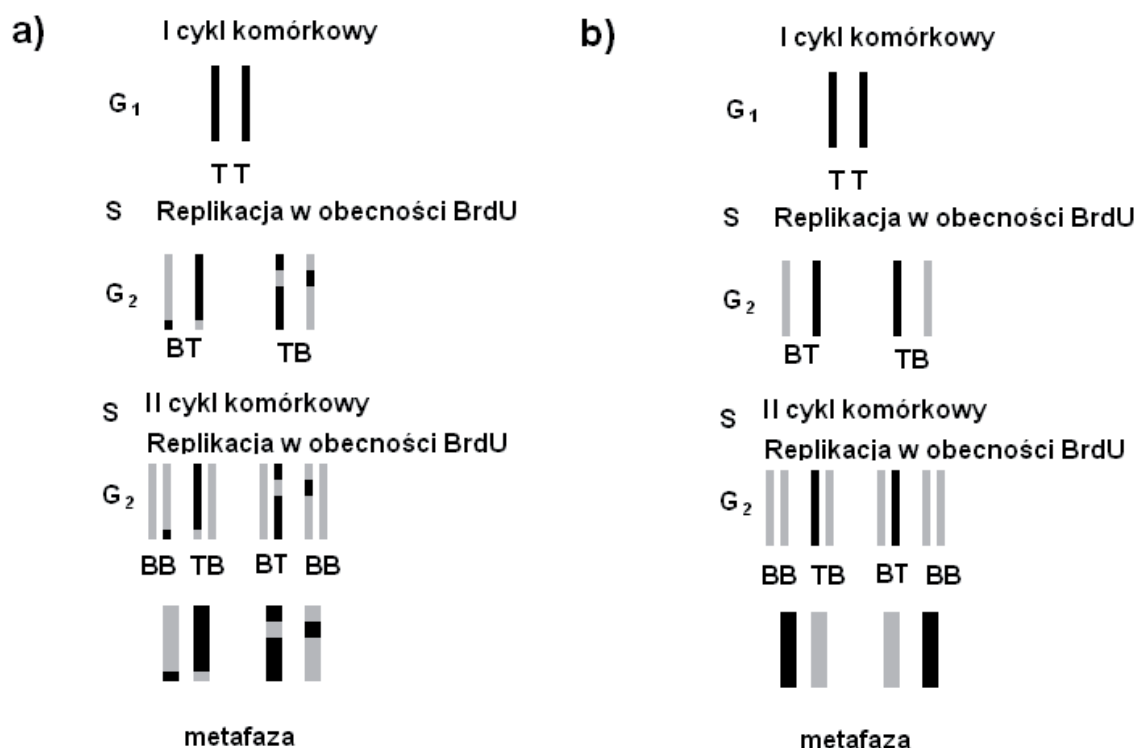
Sporadycznie występuje również somatyczny, czyli mitotyczny crossing-over. Konsekwencje mitotycznego crossing-over zależą od lokalizacji odcinka wymiany oraz położenia i rozdziału centromerów chromosomów, w których mitotyczny crossing-over zachodzi. Pojedyncza wymiana między sprzężonymi heterozygotycznymi *loci* (A/a i B/b) oraz rozdział centromerów do różnych biegunów prowadzi do utraty heterozygotyczności w obrębie dystalnych odcinków w stosunku do centromeru i punktu wymiany. Utrata heterozygotyczności (ang. loss of heterozygosity, LOH) jest jednym z przejawów niestabilności

genetycznej, prowadzącej do procesu nowotworowego. Homozygotyczny układ genów obserwuje się m.in. w zespole Blooma (opisany na końcu pracy) (DREWEY i FERENC 2005).

METODY DETEKCJI SCE

Wymiana chromatyd siostrzanych jest tematem wzbudzającym zainteresowanie od wielu lat. Prekursorem był TAYLOR (1958), dokonując szczegółowego opisu SCE komórek roślinnych, wyznakowanych ³H-tymidyną, podstawioną atomem trytu, w trakcie pierwszego cyklu replikacyjnego. Metoda detekcji SCEs poprzez autoradiografię trytem pozwala obserwować wielokrotne wymiany małych segmentów (np. około 4), które wystąpiły w obrębie 1 mikrona. Miejsca takie także były obserwowane przez TAYLOR (1958) oraz PEACOCK (1963) i odnotowane jako źródła zagadkowych, identycznych segmentów (patrz WÓJCIK i współaut. 2004). Wymiany chromatyd siostrzanych można identyfikować także metodami nieradioaktywnymi. LATT (1973) do identyfikacji SCE wykorzystał BrdU i fluorescencyjny Hoechst 33258. Hoechst, po związaniu z DNA, był tłumiony przez BrdU, w wyniku czego otrzymano chromatydy jasno wybarwione z BrdU

w jednym tylko łańcuchu polinukleotydów, zaś w obu, gdy chromatydy zostają przez ten barwnik przyciemnione. Podobnie odmienne zabarwienia chromatyd traktowanych BrdU lub BrdC (5-bromodeoksycytidyna) (ZAKHAROV i BAIRAMJAN 1980) można otrzymać barwiąc je Giemśą (ZAKHAROV i EGOLINA 1972, KORENBERG i FREEDLENDER 1974, WOLFF i PERRY 1974), oranżem akrydynowym (KATO 1974) lub DAPI (4,6-diamidyno-2-fenolindol) (LIN i ALFI 1976). Jedną z częściej stosowanych metod detekcji SCE jest równoczesne użycie barwników fluorescencyjnych i Giemsy (Fluorescencja plus Giemsa, FPG) (PERRY i WOLFF 1974). Część tymidyny w łańcuchu DNA zastąpiona jest przez BrdU. Nić, w której doszło do podstawienia tymidyny przez BrdU po zastosowaniu fluorochromów, np. Hoechststa 33258, oranżu akrydynowego lub barwnika Giemsy, barwią się słabiej. Chromatydy niepodstawione przez BrdU fluoryzują najmocniej i barwią się najciemniej Giemśą. Pośrednią fluoryzację i barwliwość wykazują chromatydy, które mają podstawioną tylko jedną nić DNA-TB- (T=DNA zawierające tyminę w jednej z nici; B=DNA, gdzie w miejscu tyminy znajduje się BrdU), podczas gdy chromatydy zawierające BrdU w obydwu niciach



Ryc. 4. Schemat wbudowania BrdU do DNA chromosomów (a – z wymianą odcinków chromatyd, b – bez wymian); T – tymina, B – BrdU.

-BB- fluoryzują i barwią się najslabiej (ROGAŁSKA i współaut. 1999) (Ryc. 4). Zarówno rutynowa metoda barwienia Giemsa, jak i techniki fluorescencyjne pozwalają odróżnić chromatyd pojedyncze, z podstawionym BrdU, od chromatyd z niepodstawionym BrdU. Niestety kontrast jest nieznaczny, a różnice w zabarwieniach można łatwo pomylić z wzorcami prążkowania, które przypadkowo powstały w czasie przeprowadzania techniki barwienia. W związku z tym, w badaniach częściej wykorzystuje się różnice między BB i TB niż TT i BB (KORENBERG i FREEDLENDER 1974).

Do detekcji SCE wykorzystywana jest ponadto technika FISH (ang. fluorescence *in situ* hybridization) (BRUCKMANN i współaut. 1999, WÓJCIK i współaut. 2004, RUDD i współaut. 2007, WILSON i THOMPSON 2007). W technice tej używane są fluorescencyjne sondy DNA. Są to fragmenty DNA, połączone z barwnikiem fluorescencyjnym, komplementarne do określonych sekwencji DNA badanego chromosomu. Dzięki zastosowaniu tej techniki można zwizualizować SCEs nawet w najmniejszych regionach chromosomu, np. w telomerach i subtelomerach, gdzie standardowa technika detekcji SCE jest zbyt mało czuła.

WPLYW CZYNNIKÓW FIZYCZNYCH I CHEMICZNYCH NA MECHANIZM POWSTAWANIA SCE

SCE jest indukowane przez wiele czynników, które zaburzają strukturę i metabolizm DNA oraz mechanizmy naprawy DNA. Częstość SCE zwiększa się w wyniku uszkodzenia DNA przez czynniki hamujące progresję widełek replikacyjnych w replikonach (SONODA i współaut. 1999). Niestety silnym induktorem SCE jest samo BrdU, który wbudowuje się w miejsce tymidyny. Im większe stężenie BrdU, tym trudniej określić częstość spontanicznego SCE. Za optymalną dawkę BrdU LEINBENGUTH i THIEL (1986) uznali stężenie 15-30 µg/ml, a VIJH i współaut. (1992), DI BERNARDINO i współaut. (1995, 1996) oraz ARIAS (2000) 5 µg/ml. Większe dawki powodowały spadek liczby SCE. Według WILSON i THOMPSON (2007) spontaniczne SCEs to takie, które występują przy bardzo niskim lub zerowym poziomie BrdU. Inkorporowane BrdU jest dehalogenowane do uracylu. Dehalogenacja polega na eliminacji jonu bromkowego z cząsteczki bromodeksyurydyny, przy pomocy glikozylazy uracylu-DNA, po czym następuje włączenie uracylu w uszkodzoną pojedynczą

nić albo przy pomocy abazowej endonukleazy lub dalszej dehalogenacji. Włączenie się BrdU powoduje wzrost SCE najprawdopodobniej przez zwiększenie poziomu uszkodzeń pojedynczej nici DNA.

Promieniowanie jonizujące powoduje szereg uszkodzeń materiału genetycznego. Może oddziaływać na DNA w sposób bezpośredni, wywołując jonizację zasad lub pośredni przez radiolizę cząsteczek wody obecnych w komórce. Najbardziej wrażliwa na uszkodzenia spowodowane promieniowaniem jonizującym jest część DNA w miejscach „odsłoniętych”, pozbawionych białek histonowych (ROSZKOWSKI i FOKSIŃSKI 2005). Promieniowanie jonizujące indukuje SCE, ale uważane jest za słaby induktor i działa tylko wtedy, gdy poddane są mu komórki w fazie G₁ cyklu komórkowego, w chromosomach, gdzie w jednej nici podstawiono BrdU (patrz WÓJCIK i współaut. 2003, 2004, 2005; WILSON i THOMPSON 2007). Promieniowanie jonizujące, przyczynia się do powstawania głównie pojedynczych i podwójnych pęknięć nici, które ulegają naprawie zanim komórka wejdzie w fazę S. Stopień uszkodzenia DNA zależy od wysokości i mocy dawki promieniowania. Wraz z gęstością jonizacji wzrasta liczba pęknięć dwuniciowych, w stosunku do jednociowych. Promieniowanie jonizujące powoduje radiolizę wody, produkując reaktywne formy tlenu. Głównym czynnikiem uszkadzającym jest rodnik hydroksylowy. W komórkach ludzkich i zwierzęcych, zawierających około 90% wody, znaczna proporcja uszkodzeń powstaje w wyniku działania rodników tlenowych (patrz DEPERAS-KAMIŃSKA i współaut. 2006). Promieniowanie jonizujące w znacznym stopniu wpływa na aberracje chromosomowe. WOLFF i współaut. (1977), przy niskich dawkach promieniowania jonizującego, nie obserwowali znacznego wzrostu SCE, podczas gdy miało to miejsce w przypadku aberracji. Autorzy stwierdzili ponadto, że mimo iż większość SCE jest prawdopodobnie genetycznie obojętna (ponieważ te same ilości fragmentów chromatyd siostrzanych ulegają wymianie), to może dochodzić do niewielu nierównych wymian prowadzących do delecji, insercji i mutacji zmiany ramki odczytu. LATT i współaut. (1981), a także LEINBENGUTH i THIEL (1986), badając zależność SCE na tempo aberracji chromosomowych, odnotowali, przy dużej częstości SCE, występowanie różnych aberracji: izochromatyd, translokacje, delecje chromosomu X, różne długości chromatyd i acentryczne odcinki.

Według WILSON i THOMPSON (2007) silnie działającym induktorem SCE jest krzyżowe łączenie czynników chemicznych i fizycznych. Chromosomy z inkorporowanym BrdU, a następnie potraktowane promieniowaniem UV-C oraz z wbudowaną biotyną-dUTP i naświetlane promieniowaniem jonizującym, charakteryzowały się większą liczbą SCEs niż te które zwierały mitomycynę C.

Wykrywanie „prawdziwych” SCE komplikują także tak zwane „fałszywe” SCE, które powstają w wyniku inwersji chromosomowych (WOLFF i PERRY, 1974, BRUCKMANN i współaut. 1999). Jeżeli inwersja zachodzi po zaznaczeniu jednej z dwóch chromatyd, to wówczas odwrócony fragment chromosomu może łączyć się z pozostałą jego częścią w taki sposób, że zaznaczony fragment połączy się z niezaznaczoną chromatydą mimikując prawdziwe SCE. BRUCKMANN i współaut. (1999), badając zjawisko zachodzenia wymiany chromatyd siostrzanych w obecności BrdU oraz biotyny-dUTP w różnicowo wybarwionych chromatydach, stwierdzili, że uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem X, w obecności BrdU, to „prawdziwe” SCE, natomiast z wbudowaną biotyną d-UTP, to „fałszywe” SCE, spowodowane chromosomowymi aberracjami. W komórkach zawierających biotynę-dUTP badacze obserwowali niższą częstość SCE, ponieważ w przeciwieństwie do BrdU, biotyna-dUTP nie dawała wzrostu rodników w czasie naświetlania. Hipotezę występowania fałszywego SCE potwierdzają również wyniki badań MÜHLMANN-DIAZ i BEDFORD (1995). Autorzy ci zare-

jestrowali podobną częstość interstycjalnych delecji i interstycjalnych SCE w fibroblastach wyznakowanych BrdU w pierwszym cyklu replikacji, a następnie poddanych promieniowaniu gamma w fazie G_1 . Na podstawie przypuszczeń, że stosunek interstycjalnych delecji do paracentrycznych inwersji wynosi 1:1, autorzy wnioskuje, że wszystkie interstycjalne SCE (zlokalizowane w środkowej części ramion p i q chromosomu) są paracentrycznymi inwersjami oraz, że ekspozycja komórek w fazie G_1 na promieniowanie jonizujące nie powoduje „prawdziwych” SCE. W celu sprawdzenia, ile interstycjalnych SCE jest „prawdziwych”, a ile „fałszywych”, WÓJCIK i współaut. (2004) oznakowali ludzkie limfocyty bromodeoksyurydyną na czas replikacji i poddali promieniowaniu X w fazie G_1 . Pozostała część cyklu komórkowego przebiegała bez obecności BrdU. Następnie do analizy chromosomów wykorzystano hybrydyzację *in situ* z zastosowaniem specyficznych sond DNA (patrz wyżej), co pozwalało na uwidocznienie inwersji chromosomowych. Badano paracentryczne i interstycjalne SCEs, które pojawiły się na ramieniu p trzeciego chromosomu. Wymianom chromatyd siostrzanych, wynikających z inwersji, towarzyszyła zmiana występowania sygnału hybrydyzacji. W przypadku „prawdziwego” SCE, miejsce sygnału hybrydyzacji pozostawało bez zmian. Konkluzje autorów były następujące: większość SCEs nie były inwersjami, a otrzymane wyniki wyraźnie wskazują, iż promieniowanie X indukuje „prawdziwe” SCE.

ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE TESTU SCE

Na częstość powstawania SCE mają wpływ różne antybiotyki. Chloramfenikol, to antybiotyk szeroko używany w ludzkiej i zwierzęcej terapii. Ponieważ jednak jego stosowanie wiąże się z zaburzeniami krążeniowymi, tj. aplastyczną anemią oraz właściwościami kancerogennymi, ograniczono użycie tego leku w medycynie. Niestety w praktyce weterynaryjnej wciąż zajmuje ważne miejsce. Głównym i wciąż narastającym problemem związanym z używaniem go w weterynarii jest fakt, iż chloramfenikol może przeniknąć do ludzkiej populacji przez łańcuch pokarmowy. Test SCE umożliwił określenie mutagennego potencjału tego antybiotyku w chromosomach bydła i świń (QUEINNEC i współaut. 1975), człowieka (PALMER 1985), szczurów (JOSHI i współaut. 1987) i bawo-

ła (ARRUGA i CATALAN 1992). ROSENKRANZ (1988) wykazał, iż antybiotyk ten może stać się kancerogeny z prawdopodobieństwem 0,02%. Jako powody wyjaśniające różnice odnotowane przez innych autorów podaje: różnice gatunkowe, typ komórek, czas ekspozycji oraz stężenie.

Monitoring różnych grup zawodowych, narażonych na ekspozycję czynników genotoksycznych i mutageny środowiskowe, jest jak najbardziej uzasadniony. BUYUKLEYLA i RENCUZOGULLARI (2009), przy pomocy testu SCE, zbadali genotoksyczne działanie tymolu na stabilność chromosomów. Wzrost częstości SCE obserwowano przy niższych stężeniach, w porównaniu z wyższymi stężeniami. Tymol jest organicznym związkiem chemicznym z grupy terpenów, stosowanym na sze-

roka skalę w medycynie, ze względu na silne działanie bakteriobójcze, przeciwgrzybicze, przeciwpornne, przeciwnilne oraz odwadniające. Wrażliwość na działanie tymolu wykazują także niektóre wirusy, saprofity oraz pasożyty. W związku z tym jest on bazą do wytwarzania leków magistralnych i galenowych.

Pestycydy i herbicydy są szeroko używane w rolnictwie, w celu ochrony plodów rolnych. Mogą stanowić potencjalne genotoksyczne źródło dla ludzi. ERGENE i współaut. (2007), badając populację ludzi narażonych na zanieczyszczenia pestycydami, stwierdzili wzrost liczby SCE. Znaczna liczba syntetycznych pestycydów z grupy węglowodorów chlorowanych, stosowanych do zwalczania szkodników, pozostaje w produktach żywnościowych (tj. ryby, małe i mleko) jako pozostałość środka owadobójczego. Światowa Organizacja Zdrowia ogłosiła, że ponad trzy miliony zatruć rocznie jest skutkiem obecności pestycydu, co w efekcie daje 220 000 zgonów na całym świecie. Pestycydy, przedostające się przez łańcuch pokarmowy do ludzkiej populacji, powodują genetyczne zmiany w organizmie (patrz ERGENE i współaut. 2007). Genotoksyczne właściwości pestycydów i herbicydów wykazali w swych badaniach: GARRETT i współaut. (1986), DUNKELBERG i współaut. (1994), KEVEKORDES i współaut. (1996), PIEŠOVÁ i ŠIVIKOVÁ (1997), obserwując wzrost chromosomowych uszkodzeń i wymian chromatyd siostrzanych. Zwiększające się z roku na rok użycie pestycydów i innych szkodliwych substancji chemicznych w

środowisku człowieka sprawia, że biologiczny monitoring jest narzędziem jak najbardziej pożądanym do wykrywania wczesnych biologicznych skutków uszkodzeń DNA (BO-NASSI i AU 2000, ERGENE i współaut. 2007).

Wielu ludzi jest nieustannie narażonych na działanie różnorodnych szkodliwych czynników, włączając kurz, dymy, związki organiczne i nieorganiczne. Są one są nieodłącznym elementem pracy w niektórych zakładach pracy czy fabrykach (np. branży odzieżowej). Wśród pracowników narażonych na działanie pyłu bawełnianego i węglowego oraz emitowanych cząsteczek spalinyowych odnotowano znaczny wzrost częstości SCE. Jest to grupa z ryzykiem chorób płuc i oskrzeli. Podwyższona liczba SCE może wskazywać, iż kurz bawełniany, z którym stykają się pracownicy, niesie ze sobą genotoksyczne skutki (ATMACA i współaut. 2004). Nikotyna również może być induktorem wywołującym SCE u ludzi. SINHA i współaut. (1985), LAZUTKA i współaut. (1994) oraz HUSUM i współaut. (2008) obserwowali znacznie większą częstość SCE u osób palących tytoń, w porównaniu z grupą niepalącą. Wzrost częstości SCE obserwowano u pacjentów z chorobą nowotworową (CAGGANA i KELSEY 1991), zapaleniem oskrzeli (EMINGIL i współaut. 2002), a także u osób z zespołem atopowego zapalenia skóry (KARAMAN i ALIAGA-OGLU 2006). Wyniki badań wskazują na to, że wzrost niestabilności chromosomowej może odgrywać ważną rolę w etiologii różnych chorób.

WPŁYW PŁCI, RASY I WIEKU NA MECHANIZM POWSTAWANIA SCE

Badania MARGOLIN i SHELBY (1985) wskazują, iż częstość SCE w chromosomach człowieka jest różna w zależności od płci. HUSUM i współaut. (2008) stwierdzili, że kobiety mają o 0,5 SCE na komórkę więcej niż mężczyźni. Ważnym aspektem jest stan hormonalny, odmienny wśród płci (HUSAIN i BAMEZAI 1988, JOSEPH-LERNER i współaut. 1993). W chromosomie płci X kóz, bydła, owiec i świń (odpowiednio DI MEO i współaut. 1993, IANNUZZI i współaut. 1991b, CIOTOLA i współaut. 2005, DI MEO i współaut. 2000, PERETTI i współaut. 2006) obserwowano większą liczbę SCEs w komórkach samic niż u samców, ale różnica nie była istotna statystycznie.

Czynnikiem wpływającym na częstość SCE jest rasa badanych gatunków. CATALAN i współaut. (1995), IANNUZZI i współaut. (1991a), CIOTOLA i współaut. (2005) u bydła, RUBES (1987), PERETTI i współaut. (2006) u świń, zaobserwowali różnice w częstości SCE w zależności od rasy. Obserwowane różnice w częstości SCE mogą wynikać z pochodzenia zwierząt (rasy autochtoniczne mają bardziej stabilny genom w porównaniu do innych ras zwierząt tego samego gatunku), doskonalenia genetycznego, a także z systemu utrzymania intensywnego bądź ekstensywnego. Z kolei WULFF i NIEBUHR (1985) u ludzi i DI MEO i współaut. (2000) u owiec, nie stwierdzili wpływu rasy na częstość SCE.

Niewiele informacji jest dostępnych odnośnie wpływu wieku na częstość SCE. PERETTI i współaut. (2006) stwierdzili, iż wiek istotnie wpływa na częstość zachodzenia SCE. U osobników starszych obserwowano znacznie

wyższą częstość SCE niż u młodszych. Taka zależność również była obserwowana u ludzi (SINHA i współaut. 1985, LAZUTKA i współaut. 1994, HUSUM i współaut. 2008).

MIEJSCE ZACHODZENIA SCE NA CHROMOSOMIE

Pomimo tego, iż występowanie SCE wydaje się być losowe, istnieje kilka symptomów, które mogłyby wskazywać, iż pojawienie się wymian w obrębie chromosomu nie jest do końca przypadkowe. LATT (1974), badając SCE zlokalizowane w euchromatynie i heterochromatynie, odnotował w swoich badaniach więcej wymian w prążkach G chromosomu. Z kolei CORRANO i WOLFF (1975) zaobserwowali znacznie więcej wymian w obszarze heterochromatynowym niż w obszarze euchromatynowym. Ponadto autorzy zarejestrowali w miejscach połączeń euchromatyny z heterochromatyną większą częstość SCE.

U chomika chińskiego (MARTIN i PRESCOTT 1964), szczura (GIBSON i PRESCOTT 1972) i myszy (LEE 1975, LIN i ALFI 1976) SCEs zlokalizowane są głównie w rejonach centromerowych, zaś u ludzi (LATT 1974) właśnie w tych miejscach jest ich najmniej. U myszy rejon centromerowy charakteryzuje się wysokim stopniem powtórzeń DNA i w tym rejonie dochodzi do większej liczby rekombinacyjnych pęknięć chromosomów oraz ich ponownego łączenia (LEE 1975, LIN i ALFI 1976). Według LINDAHL (1993), przyczyną odmiennych lokalizacji SCE u poszczególnych osobników mogą być różnice gatunkowe w układzie heterochromatyny w centromerach.

Terminalna część chromosomu, w skład której wchodzi telomery i subtelomery, jest 5-10 razy bardziej podatna na uszkodzenia spowodowane stresem oksydacyjnym niż inne regiony (KAWANISHI i OIKAWA 2004). W

wyniku narażenia na stres oksydacyjny wzrasta liczba przerw w jednoniciowym telomerycznym DNA. W przypadku lżejszych uszkodzeń komórka hamuje swoje podziały i uruchamia mechanizm naprawy DNA. Wszelkie niedociągnięcia w naprawie DNA są identyfikowane jako SCE. RUDD i współaut. (2007) odnotowali w terminalnej części chromosomu dużą częstość SCE, wynoszącą 17%. Zaobserwowana wysoka frekwencja SCE w telomerach i subtelomerach stanowiących 0,1% genomu człowieka mogła być zwizualizowana dzięki zastosowaniu techniki fluorescencyjnej CO-FISH (ang. chromosome orientation-fluorescence *in situ* hybridization).

Czynnikiem wpływającym na częstość zachodzącego SCE jest długość chromosomu. LATT (1974), IANNUZZI i współaut. (1991b) i ARIAS (2000) stwierdzili, iż częstość zachodzących wymian jest proporcjonalna do długości chromosomu – im dłuższy chromosom, tym więcej wymian. Podobny wniosek wysnuli CORRANO i WOLFF (1975) oraz VIJH i współaut. (1991). Liczba SCE jest proporcjonalna do zawartości DNA, im dłuższe DNA tym więcej wymian, w porównaniu z krótszym. Dotyczy to wszystkich badanych gatunków: ludzi, kóz, bydła czy kur. Z kolei DI MEO i współaut. (1993, 2000) stwierdzili, iż rozmieszczenie SCE w chromosomach różnych gatunków zwierząt jest nieregularne. Autorzy odnotowali na niektórych chromosomach wyższą lub niższą częstość SCE, w porównaniu do długości chromosomu.

ZESPÓŁ BLOOMA

Zespół Blooma (ang. Bloom syndrome, BS), to rzadka choroba uwarunkowana genetycznie, dziedziczona w sposób autosomalny recesywny, charakteryzująca się zwiększoną predyspozycją do uszkodzeń chromosomów, mutacjami, wymianą chromatyd siostrzanych, spontanicznymi wymianami między chromatydami homologicznymi i gene-

rowaniem hemizygot i homozygot. Komórki osób z BS są bardziej wrażliwe na czynniki fizyczne, takie jak promieniowanie np. jonizujące, UV, oraz związki chemiczne: etopozyd, bleomycynę, hydroksymocznik, cisplatynę, mitomycynę C, kamptotecynę (ŚLUPIAŃEK i współaut. 2007), które uszkadzają DNA. W wyniku naprawy pęknięć dwuniciowych na

matrycy DNA chromosomu homologicznego może dojść do utraty heterozygotyczności, poprzez delecję jednego z dwóch alleli tego samego genu. Proces ten może prowadzić do inaktywacji genów supresorowych transformacji nowotworowej (POPŁAWSKI i BŁASIAK 2006).

U osób z zespołem Blooma obserwuje się bardzo dużą liczbę mikrojąder, wytwarzaną podczas fazy S, wysoki poziom skupisk (*foci*) białka Rad 51 (podstawowe białko szlaku naprawy DNA przez HR) i nadprodukcję anionu ponadtlenkowego (AMOR-GUERET 2006). Anion ponadtlenkowy powoduje uszkodzenia nici RNA i DNA, preoksydację błon komórkowych, zmiany w cząsteczkach białek i węglowodanów przyczyniając się do stresu oksydacyjnego, uważanego za główną przyczynę chorób nowotworowych (PRZYBYSZEWSKI i RZESZOWSKA-WOLNY 2009).

Główną przyczyną zespołu Blooma jest mutacja w genie *BLM*, mającym *locus* na długim ramieniu 15 chromosomu człowieka. U osób z tym zespołem zidentyfikowano więcej niż 60 mutacji w genie, który koduje RecQ helikazę DNA. Między innymi mutację typu zmiany ramki odczytu, spowodowaną insercją pojedynczej pary zasad – A (adenina) w pozycji 1544 i tranzycją G (guanina) na A w pozycji 2702 w konserwatywnym wzorze helikazy, przyczyniającą się do katalitycznej inaktywacji białka BLM (patrz YOUSSEFIAN i PYERITZ 2002). Białko BLM bierze udział w procesie transkrypcji, katalizując reakcję rozplecenia podwójnej helisy DNA, a także uczestniczy w procesie naprawy DNA i w procesie utrzymania stabilności genomu. Utrata aktywności tego genu sprawia, że powstałe uszkodzenia, mutacje, błędy powstałe podczas replikacji nie zostają skorygowane, co zwiększa prawdopodobieństwo przeżycia komórek z uszkodzonym materiałem genetycznym, przyczyniając się do transformacji nowotworowej. Białko BLM bierze udział w odtwarzaniu widełek replikacyjnych ze struk-

tury Hollidaya po ich całkowitym wycofaniu, poprzez przemieszczenie się rozgałęzienia lub rozcięcie struktury Hollidaya (AMOR-GUERET 2006, POPŁAWSKI i BŁASIAK 2006). Przemieszczenie się rozgałęzienia struktury Hollidaya jest połączone z syntezą DNA i naprawą uszkodzonego DNA poprzez wznowienie replikacji bez rekombinacji i zachowanie stabilności genomu. Rozcięcie struktury Hollidaya może przebiegać w sposób klasyczny, połączony z wytworzeniem drugiej struktury Hollidaya, lub z wytworzeniem pęknięcia nici jednego końca DNA, co prowadzi do wznowienia replikacji przez białka systemu HR. Ponieważ proces ten generuje pęknięcia DNA mogące spowodować śmierć komórki, faworyzowana jest pierwsza forma naprawy, prowadząca do konwersji genu, która może przyczyniać się do niestabilności genomu (utrata heterozygotyczności, SCE). Wybór drogi naprawy zależy od białka p53, które uznawane jest za strażnika integralności genomu, między innymi poprzez promowanie wznowienia procesu replikacji przez białko BLM, po zatrzymaniu widełek replikacyjnych. Dlatego w komórkach nowotworowych, pozbawionych prawidłowego białka p53, obserwuje się wysoki poziom niestabilności genomowej, do której przyczynia się proces wznowienia replikacji po naprawie w szlaku HR (POPŁAWSKI i BŁASIAK 2006). W zespole Blooma obserwuje się anormalną replikację, związaną z upośledzeniem funkcji elongacji widełek replikacyjnych, i anormalną replikację pośrednią, opóźnienie w koordynacji replikacji połączoną ze wzrostem poziomu uszkodzeń DNA w środkowej do późnej fazy S. U osobników z mutacją genu *BLM*, podczas naprawy DSBs, zarejestrowano pięciokrotny wzrost spontanicznej HR i ponad dziesięciokrotny wzrost HR przy mutacji lub chemicznych modyfikacjach chromatyny (np. metylacji lub acetylacji) w obrębie genu kodującego białko p53 (AMOR-GUERET 2006).

SISTER CHROMATID EXCHANGE IN CHROMOSOMES

Summary

Sister chromatid exchange (SCE) is a reciprocal exchange of homologous chromatids of the same chromosome. SCEs result from replicating DNA from a damaged matrix and can occur only when changes in DNA have not been removed before the cell enters phase S of the cell cycle when condensed sister chromatids "pair" and exchanges take place between identical DNA sequences situated close to each oth-

er. Sister chromatid exchanges are often used in bio-monitoring of potentially carcinogenic substance genotoxicity. Due to their sensitivity they enable determining the degree of DNA damage or deficiencies in its repair. The SCE test answers the question of how much chromosomes are sensitive to the damaging factor and how strong the genotoxic impact of the factor is. The SCE is a reliable technique which

makes it possible to select from a populations the individuals which are genetically most prone to ill-

nesses and to remove them from further reproduction and breeding.

LITERATURA

- AMOR-GUERET M., 2006. *Bloom syndrom, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis*. Cancer Lett. 236, 1-12.
- ARIAS E., 2000. *Spontaneous sister chromatid exchanges in chicken embryos*. Hereditas 133, 263-266.
- ARRUGA M. V., CATALAN J., 1992. *Effect of chloramphenicol on sister chromatid exchange in bovine fibroblasts*. Vet. Sci. 52, 256-259.
- ATMACA M., BAGCI H., ACIKBAS I., GUMUS D., DUZCAN F., 2004. *Sister Chromatid Exchange Frequency in Lymphocytes Cultured from Cotton Gin Workers*. Turk. J. Med. Sci. 34, 247-250.
- BAYANI I., SQUIRE J. A., 2005. *Sister chromatid exchange*. Curr. Protoc. Cell Biol. 22, 22.7.
- BONASSI S., AU W., 2002. *Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction*. Mutat. Res. 511, 73-86.
- BROWN T.A., 2009. *Genomy*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- BRUCKMANN E., WÓJCIK A., OBE G., 1999. *X-irradiation of G1 CHO cells induces SCE which are both true and false in BrdU-substituted cells but only false in biotin-dUTP-substituted cells*. Chrom. Res. 7, 277-288.
- BUYUKLEYLA M., RENCUZOGULLARI E., 2009. *The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 943-947.
- CAGGANA M., KELSEY K. T., 1991. *Sister chromatid exchange frequency in Hodgkin's disease patients with elevated in vivo hprt mutant frequencies*. Carcinogenesis 12, 2141-2145.
- CATALAN J., MORENO C., ARRUGA M. V., 1995. *Sister chromatid exchanges in cattle: breed, sex, and BrdU dose effect*. Mutat. Res. 331, 205-211.
- CIOTOLA F., PERETTI V., DI MEO G. P., PERUCATTI A., IANNUZZI L., BARBIERI V., 2005. *Sister chromatid exchanges (SCE) in the Agerolese cattle population*. Vet. Res. Commun. 29, 359-361.
- CORRANO A. V., WOLFF S., 1975. *Distribution of sister chromatid exchange in the euchromatin and heterochromatin of Indian Muntjac*. Chromosoma 53, 361-369.
- DEPERAS-KAMIŃSKA M., SZUMIEL I., WÓJCIK A., 2006. *Elementy radiobiologii dla pilota Pirxa*. Kosmos 55, 337-345.
- DI BERARDINO D., LIOI M. B., SCARFI M. R., JOVINO V., MARIGLIANO P., 1995. *Spontaneous sister chromatid exchanges in mitotic chromosomes of cattle (Bos Taurus L.)*. Genet. Sel. Evol. 27, 385-393.
- DI BERARDINO D., JOVINO V., LIOI M. B., SCARFI M. R., BURGUETE I., 1996. *Spontaneous rate of sister chromatid exchanges (SCEs) and BrdU dose-response relationship in mitotic chromosomes of goat (Capra hircus L.)*. Hereditas 124, 137-143.
- DI MEO G. P., IANNUZZI L., PERUCATTI A., FERRARA L., PIZZILLO M., RUBINO R., 1993. *Sister chromatid exchange in the goat (Capra hircus)*. Hereditas. 118, 35-38.
- DI MEO G. P., PERUCATTI A., FORNATARO D., INCARNATO D., FERRARA L., MATASSINO D., IANNUZZI L., 2000. *Sister chromatid exchange in chromosomes of sheep (Ovis aries)*. Cytobios 101, 71-78.
- DREWY G., FERENC T., 2005. *Podstawy genetyki dla studentów i lekarzy*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław.
- DUNKELBERG H., FUCHS J., HENGSTLER J. G., KLEIN E., OESCH F., STRUDER K., 1994. *Genotoxic effect of herbicides alachlor, atrazine, pendimethalin and simazine in mammalian cells*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 52, 498-504.
- EMINGIL G., SAPMAZ G., BIÇAKCI N., OZKINAY F., 2002. *Sister chromatid exchange (SCE) analysis in periodontitis*. J. Clin. Periodontol. 29, 811-815.
- ERGENE S., CELIK A., CAVAS T., KAYA F., 2007. *Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges*. Environ. Int. 33, 877-885.
- GARRETT N. E., STADK H. F., WATERS M. D., 1986. *Evaluation of the genetic profiles of 65 pesticide*. Mutat. Res. 168, 301-325.
- GERMAN J., ALHADEFF B., 2001. *Analysis of sister-chromatid exchange*. Curr. Protoc. Hum. Genet. 8, 8.6.
- GIBSON D. A., PRESCOTT D. M., 1972. *Introduction of sister chromatid exchanges in chromosomes of rat kangaroo cells by tritium incorporated into DNA*. Exp. Cell Res. 74, 397-402.
- HUSAIN S. A., BAMEZAI R., 1988. *Sister chromatid exchange rate in normal and abnormal sexual development in males and females*. Mutat. Res. 206, 261-270.
- HUSUM B., WULF H., NIEBUHR E., 2008. *Sister chromatid exchange frequency correlated with age, sex and cigarette smoking in a 5-year material of 553 healthy adults*. Hereditas 105, 17-21.
- IANNUZZI L., DI MEO G. P., PERUCATTI A., FERRARA L., GUSTAVSSON I., 1991a. *Sister chromatid exchange in chromosomes of cattle from three different breeds reared under similar conditions*. Hereditas 114, 201-205.
- IANNUZZI L., DI MEO G. P., PERUCATTI A., FERRARA L., GUSTAVSSON I., 1991b. *Sister chromatid exchange in cattle marker chromosomes*. Caryologia 44, 145-152.
- JOSEPH-LERNER N., FEJGIN N. M., BEN-NUN I., LEGUM C., AMIEL A., 1993. *The correlation between the frequency of sister chromatid exchange and human reproductive hormones*. Mutat. Res. 300, 247-252.
- JOSHI S. K., KATPATAL B. G., SARKHEL B. C., 1987. *Effect of chloramphenicol on somatic chromosomes of rats*. Indian Vet. Med. J. 11, 129-134.
- KARAMAN A., ALIAGAOLU C., 2006. *Frequency of sister chromatid exchanges in the lymphocytes of patients with atopic dermatitis*. J. Dermatol. 33, 596-602.
- KATO H., 1974. *Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BrdU labeling method*. Nature (Lond) 251, 70-72.
- KAWANISHI S., OIKAWA S., 2004. *Mechanism of telomere shortening by oxidative stress*. Ann. Acad. Sci. 1019, 278-84.
- KEVEKORDES S., GABEL T., PAV K., ENDENHARDER R., DUNKELBERG H., 1996. *Genotoxicity of selected pesticides in the mouse bone-marrow micronucleus test*. Toxicol. Lett. 89, 35-42.
- KORENBERG J. R., FREEDLENDER F. E., 1974. *Giemsa technique for detection of sister chromatid exchanges*. Chromosoma (Berl) 48, 355-360.
- LATT S. A., 1973. *Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human meta-*

- phase chromosomes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3395-3399.
- LATT S. A., 1974. *Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes*. Science 185, 74-76.
- LATT S. A., ALLEN J., BLOOM S.E., CARRANO A., FALKE E., KRAM D., SCHNEIDER E., SCHRECK R., TICE R., WHITHFIELD B., WOLFF S., 1981. *Sister chromatid exchanges: A report of the GENE-TOX program*. Mutat. Res. 87, 17-62.
- LAZUTKA JR., DEDONYTE V., KRAPAVICKAITE D., 1994. *Sister-chromatid exchanges and their distribution in human lymphocytes in relation to age, sex and smoking*. Mutat. Res. 15, 306, 173-80.
- LEE C. S., 1975. *A possible role of repetitious DNA in recombinatory joining during chromosome rearrangement in Drosophila melanogaster*. Genetics 79, 467-470.
- LEIBENGUTH F., THIEL G., 1986. *BrdU- and EMS- dependent sister chromatid exchange and chromosomal breaks in cattle*. Arch. Zootech. 35, 301-330.
- LIN M. S., ALFI O. S., 1976. *Detection of sister chromatid exchanges by 4-6-diamidino-2-phenylindole fluorescence*. Chromosoma (Berl) 57, 219-225.
- LINDAHL T., 1993. *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature 362, 709-715.
- MARGOLIN B. H., SHELBY M. D., 1985. *Sister chromatid exchanges: A reexamination of evidence for sex and race differences in humans*. Environ. Mutagen. 7, 63-72.
- MARTIN G., PRESCOTT D. M., 1964. *The frequency of sister chromatid exchanges following exposure to varying doses of H3 thymidine or X-rays*. J. Cell Biol. 21, 159-167.
- MÜHLMANN-DIAZ M. C., BEDFORD J. S., 1995. *Comparison of gamma- induced chromosome ring and inversion frequencies*. Radiat. Res. 143, 175-180.
- PAINTER R. B., 1980. *A replication model for sister chromatid exchange*. Mutat. Res. 70, 337-341.
- PALMER R. G., 1985. *Drug induced chromosome damage*. Saudi. Med. J. 6, 424-434.
- PEACOCK W. J., 1963. *Chromosome duplication and structure as determined by autoradiography*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 49, 793-801.
- PERETTI V., CIOTOLA F., DARIO C., ALBARELLA S., DI MEO G. P., PERUCATTI A., BARBIERI V., IANNUZZI L., 2006. *Sister chromatid exchange for the first time in Casterana pig breed*. Hereditas 143, 113-116.
- PERRY P., WOLFF S., 1974. *New method for the differential staining of sister chromatid*. Nature 251, 156-158.
- PIEŠOVÁ E., ŠVIKOVÁ K., 1997. *Induction of micronuclei and sister chromatid exchanges in sheep lymphocyte cultures by herbicide chloridazon*. Acta Vet. Brno 66, 229-234.
- PODHORECKA M., 2009. *γH2AX jako marker dwuniciowych pęknięć DNA*. Post. Hig. Med. Dośw. 63, 92-98.
- POPLAWSKI T., BŁASIAK J., 2005. *Naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców*. Post. Bioch. 51, 328-338.
- POPLAWSKI T., BŁASIAK J., 2006. *Naprawa DNA przez rekombinację homologiczną w komórkach ssaków*. Post. Bioch. 52, 180-193.
- POPLAWSKI T., STOCZYŃSKA E., BŁASIAK J., 2009. *Naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców – nowe białka, nowe funkcje, nowe mechanizmy*. Post. Bioch. 55, 36-45.
- PRZYBYSZEWSKI W. M., RZESZOWSKA-WOLNY J., 2009. *Stres oksydacyjny w procesach przerostu i kancerogenezy gruczołu sterczowego*. Post. Hig. Med. Dośw. 63, 340-350.
- QUEINNEC G., BABILE R., DARRE R., BERLAND H. M., ESPINASSE J., 1975. *Induction d'anomalies chromosomiques par le furoxone ou le chloramphenicol*. Revue Med. Vet. 125, 1611-1626.
- ROGALSKA S., MAŁUSZYŃSKA J., OLSZEWSKA M.J., 1999. *Podstawy cytogenetyki roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- ROSENKRANZ H.S., 1988. *Chloramphenicol: magic bullet or double-edge sword?* Mutat. Res. 196, 1-16.
- ROSZKOWSKI K., FOKSIŃSKI M., 2005. *Wpływ promieniowania jonizującego na DNA komórki*. Współczesna Onkologia 9, 284-286.
- RUBES J., 1987. *Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in swine*. Mutat. Res. 191, 105-109.
- RUDD K., FRIEDMAN C., PARGHI S., LINARDOPOULU E., HSU L., TRASK B., 2007. *Elevated rates of sister chromatid exchange at chromosome ends*. PLoS Genet. 3, 0319-0323.
- SHAFFER D. A., 1977. *Replication bypass model of sister chromatid exchanges and implications for Bloom's syndrome and Fanconi's anemia*. Hum. Genet. 39, 177-190.
- SINHA A. K., LINScombe V. A., GOLLAPUDI B. B., JERSEY G. C., PARK C. N., 1985. *Analysis of sister chromatid exchanges in lymphocytes cultured from 71 healthy men*. Cell. Biol. Toxicol. 1, 333-342.
- SIMPSON L. J., SALE J. E., 2006. *Sister chromatid exchange assay*. Subcell. Biochem. 40, 399-403.
- SŁUPIANEK A., PYTEL D., MAJSTEREK I., 2007. *Rola onkogennych kinaz tyrozynowych w odpowiedzi komórek na terapię przeciwnowotworową*. Postępy Hig. Med. Dośw. 61, 818-827.
- SONODA E., SASAKI S. M., MORRISON C., YAMAGUCHI-IWAI Y., TAKATA M., TAKEDA S., 1999. *Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in Vertebrate Cells*. Mol. Cell. Biol. 7, 5166-5169.
- TAYLOR J. H., 1958. *Sister chromatid exchanges in tritium labeled chromosomes*. Genetics 43, 515-529.
- VIJH R. K., SAHAI R., SHARMA A., 1991. *Sister chromatid exchanges in Murrah buffaloes*. Indian J. Animal Sci. 61, 991-993.
- VIJH R. K., SAHAI R., SHARMA A., GUPTA I. D., 1992. *Sister chromatid exchange frequency in Sahiwal cattle (Bos indicus)*. Indian J. Animal Sci. 62, 473-476.
- WILSON D. M., THOMPSON L. H., 2007. *Molecular mechanisms of sister chromatid exchange*. Mutat. Res. 616, 11-23.
- WOLFF S., PERRY P., 1974. *Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography*. Chromosoma 48, 341-353.
- WOLFF S., RODIN B., CLEAVER J. E., 1977. *Sister chromatid exchange induced by mutagenic carcinogens in normal and xeroderma pigmentosum cells*. Nature 265, 347-348.
- WÓJCIK A., SONNTAG C., OBE G., 2003. *A pplication of the biotin-dUTP chromosome labelling technique to study the role of 5-bromo-29-deoxyuridine in the formation of UV-induced sister chromatid exchanges in CHO cells*. J. Photochem. Photobiol. B, Biol. 69, 139-144.
- WÓJCIK A., BRUCKMANN E., OBE G., 2004. *Insights into the mechanisms of sister chromatid exchange formation*. Cytogenet. Genome Res. 104, 304-309.
- WÓJCIK A., STOILOV L., SZUMIELA I., LEGERSKID R., OBE G., 2005. *Rad51C-deficient CL-V4B cells exhibit normal levels of mitomycin C-induced SCEs but reduced levels of UVC-induced SCEs*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 326, 805-810.
- WULF H. C., NIEBUHR E., 1985. *Different sister chromatid exchange rate in XX and XY cells of a*

- pair of human chimeric twins*. Cytogenet. Cell Genet. 39, 105–108.
- YOUSSEFIAN H., PYERITZ R. E., 2002. *Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in human*. Nat. Rev. Genet. 3, 748–758.
- ZAKHAROV A. F., EGOLINA N. A., 1972. *Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes*. BrdR-reversed differentiation in Chinese hamster chromosomes. Chromosoma (Berl) 38, 341–365.
- ZAKHAROV A. F., BAIRAMJAN T. L., 1980. *5-Bromodeoxycytidine in the study of Sister chromatid exchange in human lymphocytes*. Hum. Genet. 55, 259–263.