

Evaluarea efectelor genotoxice datorate expunerii la doze joase de radiație ionizantă pentru populația din zona uraniferă Băița-Ștei

Raport octombrie – decembrie 2015

Cuprins

Realizarea bazei de date cu persoanele care vor fi incluse în lotul țintă.....	2
Elaborarea chestionarului.....	3
Aspecte etice – informarea participanților și acordul de participare.....	5
Confidențialitatea informațiilor.....	6
<i>Anexa I – Model chestionar</i>	7
<i>Anexa II – Protocol pentru testul cometei, varianta alcalină (pH >13)</i>	10
<i>Anexa III – Testul micronucleilor</i>	13
<i>Anexa IV – Protocolul de lucru pentru dozimetria retrospectivă a radonului pornind de la activitatea ²¹⁰Po pe suprafața obiectelor de sticlă</i>	15
<i>Anexa V - Informații pentru participanți</i>	19
<i>Anexa VI – Consimțământ informat</i>	23
Bibliografie.....	24

Efectele dozelor joase de radiație ionizantă post-Fukushima se vor face resimțite pentru următorii 40 de ani (Sage, 2012). Din această cauză, accidentul din 11 martie 2011 din Japonia a reorientat atenția publică spre mărturiile, respectiv rapoartele științifice emise după accidente de la Cernobîl sau Three-Mile Island. Studiile recente efectuate în domeniul expunerii cronice la doze joase de radiație ionizantă susțin documentele științifice publicate după accidente nucleare menționate și ilustrează apariția leziunilor la nivelul materialului genetic, alături de incapacitatea de reparare a leziunilor dublu catenare. Când rata de reparare a ADN-ului este inferioară celei în care materialul genetic este lezat, există posibilitatea ca mutațiile să fie menținute și acestea să contribuie la creșterea riscului de a dezvolta cancer (Sage, 2012).

Realizarea bazei de date cu persoanele care vor fi incluse în lotul țintă

Pentru selecția celor 35 de persoane care alcătuiesc lotul țintă s-a pornit de la baza de date obținută în cadrul proiectului POSCCE „Implementarea tehnicilor de remediere a radonului în locuințe din zona minei uranifere Băița - IRART”, proiect cofinanțat prin Fondul European de Dezvoltare Regională și desfășurat în perioada 15.06.2010 – 14.06.2013. Unul dintre obiectivele acestui proiect a fost realizarea unei baze de date detaliate privind măsurătorile de radon de interior în 303 case din zona uraniferă Băița-Ștei (localitățile Băița, Nucet, Fînațe, Câmpani). Media aritmetică obținută a fost 241 Bq/m^3 , aproximativ 30 % din case prezentând concentrații superioare valorii de 300 Bq/m^3 . Măsurătorile au fost efectuate preponderent în camerele cu factor de ocupanță ridicat (dormitor, sufragerie, bucătărie), însă s-au evaluat și alte încăperi, precum pivnița, birouri de lucru, anexe, etc. Rezultatele detaliate ale analizei rezultatelor obținute pot fi găsite în [Cucos et al. \(2012\)](#).

Pornind de la baza de date existentă s-a aplicat ca prim criteriu de filtrare selectarea caselor care prezintă, în cel puțin o încăpere, o concentrație de radon superioară valorii de 400 Bq/m^3 . În acest fel, din cele 303 case au fost păstrate doar 157. Ulterior, au fost eliminate acele case care nu prezentau concentrații $> 400 \text{ Bq/m}^3$ în camerele cu factor de ocupanță ridicat (bucătărie, dormitor/sufragerie). În acest fel, baza de date inițială a fost restrânsă la 134 de case, distribuția acestora funcție de concentrația de radon de interior fiind ilustrată în Figura 1.

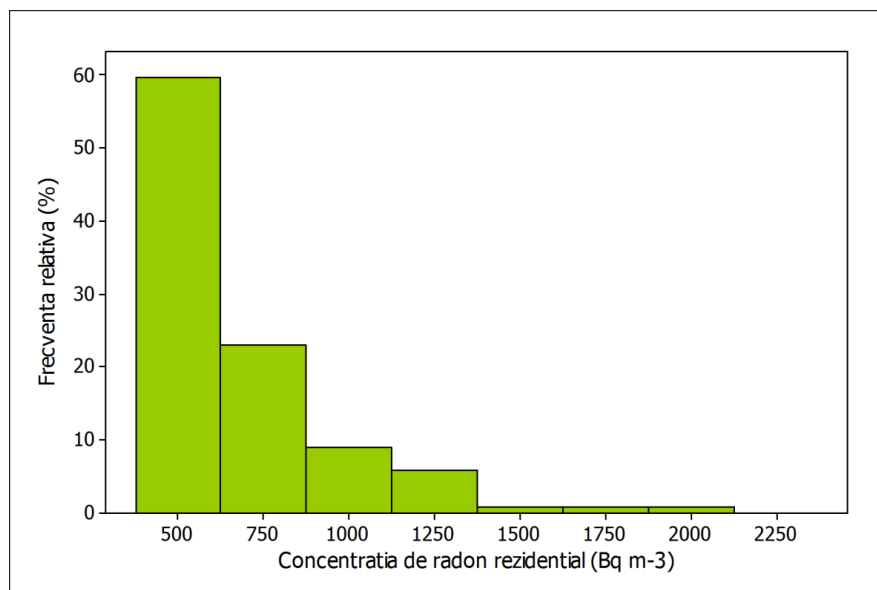


Figura 1. Distribuția caselor selecționate din zona Băița-Ștei în funcție de concentrația de radon de interior.

Media aritmetică a concentrației de radon rezidențial pentru cele 134 de case rămase în analiză este de 664 Bq/m³, minimul fiind de 401 Bq/m³, iar maximul de 2101 Bq/m³. În cadrul acestor case s-a ținut cont de măsurătorile efectuate în bucătărie (n = 42), respectiv dormitor și/sau sufragerie (n = 189), obținându-se o medie de 1.7 camere investigate per casă. Statistica descriptivă funcție de tipul încăperii este reprezentată în Tabelul I.

Tabelul I. Statistica descriptivă a concentrației rezidențiale de radon funcție de tipul camerei.

Tipul camerei	n	A.M. (Bq/m ³)	C.V. (%)	Min. (Bq/m ³)	Max. (Bq/m ³)	Mediana (Bq/m ³)
Bucătărie	42	662	46	401	1578	542
Dormitor	189	704	52	401	2503	566
Total	231	697	51	401	2503	561

Din totalul celor 231 de măsurători efectuate, 45 % sunt superioare valorii de 600 Bq/m³. În cadrul acestei activități s-a recurs la informarea scrisă a persoanelor selectate referitor la obiectivele și beneficiile proiectului de față, precum și modalitatea de participare în cadrul studiului, criteriile de selecție vizând persoanele de gen feminin cu vârsta cuprinsă între 30 – 60 de ani, nefumătoare. În situația în care numărul celor care doresc să participe la studiu va fi mai mare decât dimensiunea prevăzută inițial pentru lotul țintă (35) criteriul de selecție va fi reprezentat de expunerea la concentrația de radon rezidențial.

Elaborarea chestionarului

Pentru o evaluare corectă a impactului expunerii la doze joase de radiație ionizantă asupra materialului genetic se impune o minimizare a factorilor de confuzie, respectiv potențialelor interacțiuni dintre variabile. În acest sens, se urmărește ca cele două eşantioane (țintă și control) să fie de tip pereche din perspectiva vârstei. Vor fi luate în calcul doar persoanele de gen feminin, care nu au lucrat în mină pentru a evita influențele datorate expunerii cronice profesionale. De asemenea, pentru a reduce impactul mediului, respectiv profilul locului de muncă, lotul control va fi prelevat dintr-o localitate învecinată cu fond radioactiv scăzut. Chestionarul (Anexa I) este organizat în cinci secțiuni. Secțiunea **Date generale** conține informații de identificare pentru persoana participantă la studiu, alături de coordonatele GPS în vederea realizării unei hărți de distribuție a dozei efective anuale pentru zona investigată. Secțiunea **Date despre casă** va permite stabilirea unor corelații între valorile înregistrate pentru radon și toron și specificul casei, cu identificarea indirectă a principalelor

surse de poluanți radioactivi. Într-un studiu anterior (Cucoș et al., 2012) efectuat în zona Băița-Ștei, s-a obținut o diferență semnificativă statistic ($p < 0.001$) între media concentrației de radon (211 Bq/m^3) determinată în camerele situate deasupra pivniței și media concentrației de radon rezidențial (295 Bq/m^3) evaluată în dormitoare care nu prezentau pivniță. Prezența șapei de beton sub podea contribuie la reducerea ratei de infiltrare a radonului din sol în aerul de interior, o diferență semnificativă statistic ($p=0.04$) fiind obținută între medianele concentrațiilor de radon evaluate în locuințe cu sau fără șapă de beton (Armencea et al., 2013).

Secțiunea **Date despre performanța energetică** va permite evaluarea impactului izolării termice a locuințelor asupra concentrațiilor de radon/toron din locuințe. Într-un studiu pilot efectuat pe 37 de case din județul Bacău, pentru casele cu geamuri de tip termopan s-a înregistrat o concentrație de radon cu 26 % mai ridicată decât în cazul celor cu geamuri simple (Armencea et al., 2013). O situație similară a fost obținută și în urma măsurătorilor efectuate în 16 județe din România, media concentrației de radon rezidențial fiind cu 17% mai ridicată în cazul locuințelor cu geamuri termopan față de cele cu geamuri simple (www.radon.com.ro, RAMARO).

Secțiunea **Date medicale** își propune să identifice potențialii factori de interacțiune (fumat, expunere la radiație în domeniul medical, consum alcool) precum și să identifice potențialele probleme medicale legate de expunerea la concentrații ridicate de radon/toron (tuse, expectorație, dispnee, etc.). Deoarece numeroase studii indică efecte biologice (stress oxidativ asociat cu lezarea ADN-ului) pentru radiația non-ionizantă de intensitate scăzută (Phillips et al., 1998; Belayaev, 2005; Kesari & Behari, 2009), se impune evaluarea gradului de utilizare a telefoanelor mobile, alături de determinarea ratei de absorbție specifică (SAR). Genotoxicitatea indusă de radiația ionizantă va fi evaluată prin intermediul testului cometei (Anexa II), respectiv testului micronucleilor (Anexa III).

Secțiunea **Date despre expunerea la radiația ionizantă** permite identificarea perioadei de expunere a detectorilor, precum și o evidență a rezultatelor obținute în urma celor două campanii de monitorizare. Se va urmări evaluarea retrospectivă a radonului rezidențial prin determinarea activității de ^{210}Po pe suprafața obiectelor de sticlă (Anexa IV), măsurarea concentrației de radon și toron cu ajutorul detectorilor de urme CR-39 (Cucoș et al., 2012; Burghele, 2013), determinarea dozei gama de interior și exterior cu ajutorul detectorilor TLD (Dolha et al., 2014), respectiv a concentrației de radon și radium din apă cu ajutorul aparatului Luk-3C cu sistemul Luk-VR (Cosma et al., 2008).

Aspecte etice – informarea participanților și acordul de participare

Echipele de cercetare va explica participanților la studiu scopul, obiectivele, riscurile, respectiv beneficiile proiectului, iar consimțământul participantului va fi solicitat în scris. În acest sens au fost realizate două formulare specifice proiectului de față: *Informații pentru participanți* (Anexa V), respectiv *Consimțământ informat* (Anexa VI).

În acest fel, echipa de cercetare va oferi în scris, respectiv oral informații detaliate despre studiu, se vor asigura că participanții la studiu au înțeles clar informațiile furnizate, respectiv că decizia de participare la studiu a fost luată în cunoștință de cauză, voluntar și nu au fost forțați de împrejurări sau de alte persoane; membrii echipei se vor asigura că participantul este de acord să participe, așa cum este indicat prin semnarea documentului de consimțământ informat.

După primirea tuturor informațiilor cu privire la proiectul de cercetare, participanții vor primi două exemplare ale formularului de consimțământ informat. Ei vor avea timp pentru a citi formularul de consimțământ în prezența echipei de cercetare. Echipa de cercetare va răspunde la orice întrebări suplimentare cu privire la studiu. După semnarea formularului de consimțământ de către participant, echipa de cercetare va semna ca martor și va colecta formularele. O copie a formularului de consimțământ va rămâne în posesia participantului. Formularul de consimțământ va cere permisiunea participantului să completeze un chestionar, pentru a colecta date de sănătate cu privire la participant de la medicul acestuia de familie și pentru a da o probă de sânge, care va fi supusă testului micronucleilor și testului cometei, în vederea evaluării gradului de lezare a materialului genetic. De asemenea, prin intermediul formularului de consimțământ, participanții acceptă amplasarea în locuințe a unor detectori pentru monitorizarea radiațiilor ionizante pe parcursul unui an.

Documentul de consimțământ conține faptul că participarea la proiectul de cercetare este voluntară, iar participantul va fi liber să își retragă permisiunea de a participa la studiu în orice moment în cursul investigațiilor. Refuzul de a-și da consimțământul sau retragerea consimțământului de a participa la cercetare nu va duce la nicio formă de discriminare împotriva persoanei în cauză, în special în ceea ce privește dreptul la îngrijire medicală.

Participanții care vor oferi o probă de sânge, de asemenea, vor primi personal rezultatele testului lor de sânge. Rezultatele măsurătorilor de radon și toron din interiorul caselor vor fi trimise prin poștă, iar ulterior echipa de cercetare va oferi suport și recomandări în vederea interpretării rezultatelor.

Confidențialitatea informațiilor

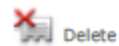
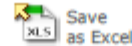
Studiul de față va lua toate măsurile de precauție pentru a respecta intimitatea participanților la studiu, precum și confidențialitatea informațiilor personale ale acestora și va minimiza impactul studiului asupra integrității fizice, psihice cât și asupra personalității participantului, în conformitate cu principiile standardelor legale de protecție a oamenilor în cercetare.

Pentru a se asigura că datele subiectului nu sunt ușor de identificat sau nu au un potențial ușor de identificat, datele personale vor fi stocate doar pe hârtie, în format electronic fiecare participant primind un cod unic de identificare (ID). Atunci când fișele de date vor fi introduse în bazele de date, codul unic imprimat pe fiecare filă va fi utilizat pentru a caracteriza un set de date. Chestionarul, datele de sănătate și fișierele de evaluare a locuinței vor fi corelate cu ajutorul codul unic al participantului la sondaj. Toate probele de sânge care vor fi trimise la laborator pentru analize vor fi etichetate cu codul unic al participantului. Rezultatele de laborator vor fi introduse în baza de date electronică.

Fișele de colectare a tuturor datelor originale vor fi stocate într-un dulap încuiat, iar datele electronice vor fi protejate pe un hard disk extern cu parolă. Pentru a menține confidențialitatea participanților, datele vor fi accesibile numai anchetatorilor. Rezultatele acestui studiu vor fi parte dintr-un raport final de cercetare și pot fi, de asemenea, utilizate în lucrări trimise spre publicare sau prezentate la conferințe profesionale, dar în niciun caz nu va fi inclus numele sau alte caracteristici de identificare. Datele colectate vor fi păstrate trei ani după finalizarea proiectului după care, cele în format pe hârtie, vor fi distruse cu ajutorul unui distrugător de documente.

Informațiile obținute de pe chestionar și din analiza probelor de mediu și biologice nu pot avea relații sau implicații pentru membrii familiei. Nu vor fi colectate informații genetice sau referitoare la boli care s-ar putea aplica membrilor familiei.

Anexa I – Model chestionar



Contract PN-II-RU-TE-2014-4-1009 - Evaluarea efectelor genotoxice datorate
expunerii la doze joase de radiație ionizantă pentru populația din zona Băița-Ștei
(GENORAD)

1. DATE GENERALE

Esantion	<input type="radio"/> Tinta <input type="radio"/> Martor
Numele si prenumele	<input type="text"/>
ID	<input type="text"/>
Localitatea	<input type="text"/>
Latitudine	<input type="text"/>
Longitudine	<input type="text"/>
Nr. telefon	<input type="text"/>
Data nasterii	<input type="text"/>
Profesie	<input type="text"/>
Vechime munca	<input type="text"/>

2. DATE DESPRE CASA

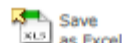
Anul constructiei	<input type="text"/>
Existenta sapa beton	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Tipul podelei	<input type="radio"/> Lemn <input type="radio"/> Parchet masiv <input type="radio"/> Gresie <input type="radio"/> Parchet laminat <input type="radio"/> Alta
Materiale pereti	<input type="radio"/> Beton armat <input type="radio"/> Caramida <input type="radio"/> Piatra <input type="radio"/> Lemn <input type="radio"/> Chirpici <input type="radio"/> Alta
Tipul tavanului	<input type="radio"/> Beton armat <input type="radio"/> Lemn <input type="radio"/> Alta
Nr. nivele constructie	<input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> >=3
Prezenta fisurilor	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Aer conditionat	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Pivnita este amplasata sub casa	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Se fumeaza in camera	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Gradul de ocupanta	<input type="text"/>

3. DATE DESPRE PERFORMANTA ENERGETICA

Tipul incalzirii in camera	<input type="text"/>
Tipul peretilor	<input type="radio"/> Neizolat <input type="radio"/> Izolat exterior <input type="radio"/> Izolat interior
Tipul izolatiei	<input type="text"/>
Fereastra	<input type="radio"/> Dublu din lemn <input type="radio"/> Termopan simplu <input type="radio"/> Termopan triplu



New

Save
as Excel

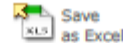
Delete

4. DATE MEDICALE

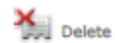
Inaltimea	<input type="text"/>
Greutatea	<input type="text"/>
Statut fumat	<input type="radio"/> Nefumator <input type="radio"/> Fost fumator <input type="radio"/> Fumator
Numar tigari	<input type="text"/>
Numar ani ca fumator	<input type="text"/>
Cosum alcool	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Cat de des consumati	<input type="radio"/> Ocazional <input type="radio"/> 3 x saptamana <input type="radio"/> Zilnic
Ce tip de alcool	<input type="radio"/> Bere <input type="radio"/> Vin <input type="radio"/> Alcool tare
Din ce an locuiti in casa	<input type="text"/>
Ati efectuat radiografie in ult 6 luni	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Sunteti tusitor	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Cat de des tusiti	<input type="radio"/> Ocazional <input type="radio"/> Dimineata <input type="radio"/> Lunar <input type="radio"/> 3 luni pe an
Expectorati	<input type="radio"/> Ocazional <input type="radio"/> Dimineata <input type="radio"/> Lunar <input type="radio"/> 3 luni pe an
Aveti dificultati la respiratie	<input type="radio"/> La efort <input type="radio"/> In repaus <input type="radio"/> Intermitent <input type="radio"/> Persistent
Aveti respiratie suieritoare	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Aveti ameteli	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Prezentati frecvent dureri de cap	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Aveti dureri osoase	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Influentate meteorologic	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Aveti amorteli ale extremitatilor	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Aveti tulburari de memorie	<input type="radio"/> Da <input type="radio"/> Nu
Cate ore pe zi folositi mobilul	<input type="text"/>
Ce tip de mobil aveti	<input type="text"/>
Cazuri cancer in familie	<input type="text"/>
Tipul cancerului	<input type="text"/>
Rezultat comete	<input type="text"/>
Rezultat cinetica de reparare	<input type="text"/>
Rezultat micronuclei	<input type="text"/>



New



Save
as Excel



Delete

5. DATE DESPRE EXPUNEREA LA RADIATIA IONIZANTA

CAMPANIA I

Data amplasare	<input type="text"/>
Data recoltare	<input type="text"/>
Seria TLD	<input type="text"/>
Rezultat TLD	<input type="text"/>
Dozimetrie retrospectiva	<input type="text"/>
Rezultat dozimetrie	<input type="text"/>
Radon toron	<input type="text"/>
Rezultat radon	<input type="text"/>
Rezultat toron	<input type="text"/>
Proba apa	<input type="text"/>
Rezultat apa	<input type="text"/>
Rezultat rادی din apa	<input type="text"/>
Gama exterior	<input type="text"/>

CAMPANIA II

Data amplasare	<input type="text"/>
Data recoltare	<input type="text"/>
Seria TLD	<input type="text"/>
Rezultat TLD	<input type="text"/>
Dozimetrie retrospectiva	<input type="text"/>
Rezultat dozimetrie	<input type="text"/>
Radon toron	<input type="text"/>
Rezultat radon	<input type="text"/>
Rezultat toron	<input type="text"/>
Proba apa	<input type="text"/>
Rezultat apa	<input type="text"/>
Rezultat rادی din apa	<input type="text"/>
Gama exterior	<input type="text"/>

Anexa II – Protocol pentru testul cometei, varianta alcalină (pH >13)

- 1. Prelevarea probei:** se recoltează sânge venos periferic în tuburi heparinizate (prin puncție venoasă), ușor se omogenizează;
- 2. Transportul probei:** transportul se efectuează în cutii de polistiren termoizolante (la temperatura camerei: 20-21°C), în cel mai scurt timp posibil, astfel încât de la momentul recoltării și până la momentul congelării să nu treacă mai mult de 5 ore;
- 3. Separarea limfocitelor:** limfocitele se izolează din sângele proaspăt recoltat pe heparină, prin centrifugare în gradient de densitate pe Histopaque;
- 4. Congelarea limfocitelor:** limfocitele vor fi congelate în mediu de congelare: 50% ser fetal bovin, 10% dimetilsulfoxid, în recipiente speciale Mr. Frosty care asigură o congelare graduală; probele pot fi menținute 3 luni la -80 °C și perioada nedeterminată în azot lichid;
- 5. Dezghețarea și verificarea viabilității limfocitelor:** celulele se dezgheată în mediu complet de cultură și se verifică viabilitatea acestora cu albastru-tripan;
- 6. Iradierea probelor:** o parte din probe se iradiaza la Theratron 1000 cu doza de 2 Gy, o parte păstrându-se ca martor. După iradiere tuburile se transportă înapoi în laborator pe gheață (pentru a împiedica repararea leziunilor radioinduse). Din fiecare probă (atât martor cât și cele iradiate) se prelevează imediat un număr de celule ce se prelucrează rapid (pentru aprecierea inducerii de leziuni ADN prin iradiere). Tuburile se incubează apoi la 37°C în atmosferă cu 5% CO₂ timp de 2 ore, după care se prelucrează în continuare prin testul cometei (pentru studiul reparării leziunilor radioinduse).
- 7. Pregătirea lamelor - după metoda în 2 straturi:**
 - Primul strat, cu rol de suport, se prepară prin imersarea lamelor răcite la frigider în soluție 1% de agaroză cu punct normal de topire (normal melting agarose, NMA) la temperatura de 62°C.
 - Al doilea strat constă din 75μl soluție 0,5% de agaroză cu punct scăzut de topire (low melting point agarose, LMPA), aflată la 37°C, în care se încorporează 10μl suspensie celulară (circa 10⁴ celule). Amestecul se pipetează rapid pe lama acoperită cu NMA și se acoperă cu o lamelă mare (24x50mm). Se lasă cca 3 minute pe gheata, pentru solidificare, după care lamela se îndepartează cu grija, prin alunecare. Folosind această dimensiune a lamelei

pentru cantitatea de celule menționată în final se obțin 1-2 celule/câmp microscopic (la o mărire de 400x), ceea ce facilitează examinarea. Din momentul adăugării stratului 2 și până la colorare toate operațiunile se desfășoară în semiobscuritate, folosind lumină galbenă slabă și indirectă, pentru prevenirea lezării suplimentare a ADN.

- 8. Liza.** Această etapă, necesară pentru eliberarea nucleilor, constă în imersarea lamelor astfel preparate într-o soluție concentrată de săruri și detergenți (NaCl, Na₂EDTA, Trisma base, NaOH, Triton-X și DMSO) care îndepărtează tot materialul non-nucleic. Procesul necesită incubare la frigider, cel puțin 1 oră, la întuneric. De obicei le lasăm peste noapte.
- 9. Denaturarea ADN.** Lamele se pun apoi una lângă alta la un capăt al platformei aparatului de electroforeză și acoperite cu soluție-tampon (NaOH și Na₂EDTA) foarte alcalină și rece (pH 13,3 la 4°C) timp de 20'. În această etapă, prin ruperea punților de hidrogen dintre lanțuri, ADN-ul se desfășoară rezultând ADN monocatenar și exprimarea leziunilor alcali-labile.
- 10. Electroforeza.** În aceeași cuvă și în același tampon, se aplică apoi un curent electric de 25V și 300 mA (0,75V/cm), timp de 20'. Prin aceasta fragmentele de ADN sunt împinse, migrează în afara nucleului, spre anod, într-o cantitate și pe o distanță proporționale cu importanța leziunii.
- 11. Neutralizarea.** După oprirea curentului lamele se scot din aparat și se spală de 3 ori câte 5 minute cu soluție de neutralizare (Tris 0.4M, pH 7,5), pentru îndepărtarea excesului de alcali.
- 12. Fixarea.** Dacă citirea nu se face imediat, e necesară fixarea preparatelor cu etanol absolut, timp de 5 minute, după care pot fi stocate perioade mai lungi, urmând a fi colorate doar în momentul examinării.
- 13. Colorarea.** Există mai mulți coloranți specifici ADN, noi folosim Ethidium bromide sol. de lucru, câte 40μl/lamă. Fiecare lamă se acoperă cu o lamelă pentru a asigura hidratarea și colorarea iar după incubare 5 minute la întuneric se examinează.
- 14. Examinarea** se face la microscopul Nikon Eclipse E 1000, în fluorescență, cu filtrul adecvat colorantului folosit (TX-Red, Ex 540-580, BA 600-660,) la mărimi de 200x și 400x, analizând 500 imagini pentru fiecare probă (250 imagini/lamă, din fiecare probă făcându-se duplicate).

15. Interpretarea se poate face vizual sau computerizat.

Analiza vizuală. La microscopul cu fluorescență ADN-ul nelezat apare ca o masă sferică și compactă ce ocupă cavitatea formată în microgel de celula lizată. Pentru celulele ce au suferit leziuni, cu cât dimensiunea fragmentelor e mai mică și cu cât numărul fragmentelor e mai mare, cu atât cantitatea de ADN migrat în câmp electric este mai mare, formând comete de diferite lungimi. Cea mai simplă analiză vizuală este evaluarea proporției de celule cu migrare alterată, determinând numărul de comete cu coadă scurtă /medie /lungă la 100 celule. O metodă mai utilă clasifică cometele în mai multe categorii, pe baza lungimii migrării. Atribuind o valoare numerică fiecărei clase de migrare, orice imagine e evaluată ca aparținând unuia din cele 5 stadii de lezare, de la 0 (fără migrare, deci fără leziuni) până la 4 (aproape tot ADN-ul s-a deplasat în coada cometei).

Anexa III – Testul micronucleilor

Tehnica metodei este conformă protocolului lui Fenech M., care utilizează citochalasina B pentru blocarea citokinezei: testul micronucleilor cu blocarea citokinezei (CBMN assay - Cytokinesis Block MicroNucleus assay). Astfel, celulele stimulate să prolifereze cu Fitohemaglutinina M sunt apoi împiedicate să încheie diviziunea prin adăugare de Cytochalazina B. Celulele în diviziune se acumulează astfel sub formă de celule mari, binucleate, în care se pot cuantifica micronucleii și punțile citoplasmatiche (ca indicatori ai genotoxicității).

- 1. Prelevarea probei:** se recoltează sange venos periferic în tuburi heparinizate (prin puncție venoasă), ușor se omogenizează;
- 2. Transportul probei:** transportul se efectuează în cutii de polistiren termoizolante (la temperatura camerei: 20-21 °C), în timpul cel mai scurt posibil, astfel încât de la momentul recoltării și până la momentul congelării să nu treacă mai mult de 5 ore;
- 3. Separarea limfocitelor:** limfocitele se izolează din sângele proaspăt recoltat pe heparină, prin centrifugare în gradient de densitate pe Histopaque;
- 4. Congelarea limfocitelor:** limfocitele vor fi congelate în mediu de congelare: 50% ser fetal bovin, 10% dimetilsulfoxid, în recipiente speciale Mr. Frosty care asigură o congelare graduală; probele pot fi menținute 3 luni la -80 °C și perioada nedeterminată în azot lichid;
- 5. Dezghețarea și verificarea viabilității limfocitelor:** celulele se dezgheată în mediu complet de cultură și se verifică viabilitatea acestora cu albastru-tripan;
- 6. Cultivarea limfocitelor**
- 7.** Inițierea culturii se face prin resuspendare în tuburi cu mediu (RPMI + glutamina 10% + 10-15% ser fetal bovin + 1% antibiotic) în concentrație de aproximativ 1 milion celule/ml
- 8.** În fiecare tub se adaugă PHA M (fitohemaglutinina M) 20μg/ml pentru a stimula celulele să intre în faza de proliferare
- 9.** Se incubează la 37°C în atmosferă de 5% CO₂, timp de 44 ore
- 10.** Se adaugă Cyt B (Cytochalasina B) 6 μg/ml și se continuă incubarea pentru încă 28 ore.
- 11. Etalarea pe lame, colorare**

12. La 72 de ore de la inițierea culturii se prepară frotiurile prin citocentrifugare 5 minute la 600 rpm
13. Spoturile rezultate se lasă să se usuce la temperatura camerei 10 - 12 minute
14. Frotiurile se fixează prin imersare 10 minute în metanol absolut
15. Lamele se colorează cu soluție Giemsa 10% în tampon fosfat, pH 7,3
16. **Examinarea lamelor** se face în imersie, la microscopul optic, la o mărire de 1000x. Pe fiecare lamă se cuantifică micronucleii și punțile internucleare. Selecția celulelor binucleate ce pot fi luate în considerare, a micronucleilor și a punților internucleare se face după criteriile lui Fenech folosite și în HUMN (Human MicroNucleus).

Anexa IV – Protocolul de lucru pentru dozimetria retrospectivă a radonului pornind de la activitatea ^{210}Po pe suprafața obiectelor de sticlă

Dozimetria retrospectivă pentru locuințe bazată pe măsurarea activității poloniului (^{210}Po) implantat în obiectele din sticlă a fost introdusă și practică de mulți ani (Lively and Ney, 1987; Samuelsson, 1988; Mahaffey et al., 1993; McLaughlin, 1998; Bochicchio et al., 2003). Activitatea ^{210}Po implantat în suprafața unui obiect din sticlă poate fi determinată prin utilizarea metodei „detectorilor CR-LR” (Falk et al., 1996). În această metodă, două tipuri de detectori de urme în fază solidă, și anume, LR 115 și CR-39 sunt fixați unul lângă altul pe obiectul de sticlă examinat. Detectorul de tip LR 115 este sensibil la particulele alfa cu energii din gama 1,2 – 4,8 MeV, în timp ce detectorul de tip CR-39 este sensibil la particulele alfa cu energii de la 1 MeV până la mai mult de 20 MeV. Deoarece particulele alfa provenite de la dezintegrarea radioactivă a ^{210}Po de pe suprafața sticlei au o energie aproape de 5.3 MeV acestea nu vor fi detectat de către detectorul LR-115, în schimb vor fi detectate de către detectorul CR-39. Prin amplasarea acestor detectori unul lângă altul și în contact direct cu suprafața sticlei, LR-115 va înregistra doar urmele de la particulele alfa de background în timp ce CR-39 va înregistra atât urmele particulelor alfa de background cât și cele lăsate de particulele alfa provenite din dezintegrarea ^{210}Po . Diferența dintre răspunsurile cele două tipuri de detectori oferă informații cu privire la ^{210}Po implantat în stratul de suprafață. Această combinație de detectori este denumită *detector retro* (Falk et al., 1999). Obiectele de sticlă selectate pentru acest studiu trebuie să îndeplinească o serie de criterii (Dicu et al., 2014): să aibă o vârstă de cel puțin 10 ani, să fi fost expuse în actuala locuință același interval de timp și să aibă o suprafață plană (oglinzi, vitrine sau sticla de la tablouri).

Detectorii CR-39 sunt confecționați din carbonat polialildiglicol, mărimea fiecărui detector fiind de 1 cm x 1 cm. CR-39 este un plastic transparent cu un indice de refracție de 1.498, utilizat la fabricarea lentilelor de ochelari. Uniformitatea sa de răspuns (<1% variație), sensibilitate ridicată și calitatea optică îl fac ideal pentru identificarea masei și sarcinii particulelor nucleare.

Detectorii LR 115 de tip II sunt confecționați din nitrat de celuloză cu straturi non-colante având dimensiunea de 4 x 2 cm. LR 115 este format dintr-un strat activ de culoare roșie (nitrat de celuloză) fixat pe o bază de poliester transparent.

După expunerea dorită, detectorii au fost supuși unei corodări chimice. Dizolvarea materialului prin procedeul de corodare se datorează în principal pierderii grupelor carbonat

din molecula reziduală. Acest proces este activat în prezența ionilor hidroxil disponibili într-o soluție alcalină (hidroliză alcalină). Reacția este endotermă și anume procesul are nevoie de energie pentru a fi inițiat, iar gradul de corodare crește cu creșterea temperaturii soluției. Prin urmare, plăcuțele de CR-39 sunt gravate într-o soluție de NaOH la o temperatură de $90 \pm 1^\circ\text{C}$. Procesarea detectorilor după recoltare se realizează în cadrul Laboratorului de Radioactivitatea Mediului și implică următoarele etape (Burghele, 2013):

Preparare soluției - 4 L de apă distilată sunt încălziți într-un RB4 Etching Unit, când temperatura apei ajunge la 90°C se adaugă 1 kg hidroxid de sodiu (NaOH, 99.98%) pelete (Merck KGaA, Germania). Pentru a evita supraîncălzirea soluției, aproximativ 25 g de NaOH în stare solidă se adaugă la fiecare 3 minute până la obținerea unei concentrații de 6.25 M NaOH. Timpul estimat pentru această etapă este de 120 minute.

Pregătirea detectorilor – plăcuțele de CR-39 sunt montate pe un diapozitiv. Așa-numitul "diapozitiv" reprezintă un cadru de plastic folosit pentru a facilita procesul de gravare și ulterior citire, acesta este de obicei proiectat pentru a susține 12 plăcuțe de CR-39 de dimensiuni $1 \times 1 \text{cm}^2$. Diapozitivele cu detectori sunt apoi montate pe un carusel care se introduce în baia de dezvoltare și în soluția proaspăt preparată.

Gravare chimică - cu ajutorul caruselului, diapozitivele ce conțin CR-39 sunt agitate în soluția de NaOH, la o temperatură constantă de $90 \pm 1^\circ\text{C}$. Acest proces permite mărirea urmelor lăsate de particulele alfa pe suprafața CR-39 până la un diametru vizibil la microscop.

Neutralizarea - după finalizarea procesului de corodare, care durează în general 3 ore 40 minute (acesta este specificat de producător și poate varia) soluția alcalină este îndepărtată din baia de dezvoltare și înlocuită cu 5 L de soluție apoasă de HCl cu o concentrație de 1% în care diapozitivele sunt spălate timp de 20 minute. La sfârșitul celor 20 de minute soluția se înlocuiește cu 5 L de apă distilată, în care diapozitivele sunt clătite timp de 10 minute. Odată finalizată această ultimă etapă diapozitivele cu CR-39 sunt scoase din carusel și uscate la temperatura camerei.

Citirea urmelor - uscate în prealabil, plăcuțele de CR-39 sunt șterse cu alcool izopropilic pentru îndepărtarea tuturor impurităților și introdus în microscop. Microscopul (Radometer 2000 produs de Radosys Ltd., Ungaria) este capabil să contorizeze numărul de urme produse de impactul particulelor alfa pe suprafața detectorului. Densitatea medie de urme, înregistrată pe o suprafață de 50mm^2 a detectorului, este ulterior folosită pentru calcularea concentrației

de radon. Astfel, pe baza densității urmelor de particule alfa/mm² se calculează concentrația medie de radon în Bqm⁻³, cu formula (Cucos-Dinu et al., 2011):

$$C_{Rn} = (\rho \cdot Fc) / t \quad (1)$$

unde: C_{Rn} – concentrația de radon calculată (Bqm⁻³); ρ – densitatea de urme măsurată (urme mm⁻²); Fc – factorul de calibrare comunicat de către producător ((kBqhm⁻³)/(urme/mm⁻²)); t – timpul de expunere (zile).

Precizia sistemului RadoSys 2000 este verificată periodic prin participări la exerciții internaționale de intercomparare cu o serie de laboratoare validate internațional (Institutul Național de Științe Radiologice NIRS, Chiba, Japonia; Bundesamt für Strahlenschutz (BfS), Biroul Federal pentru Protecție Radiologică din Germania, etc.).

Pentru detectorii de tip LR 115 procesarea se realizează în etape similare însă soluție apoasă de KOH va avea o concentrație de 2,5 M, iar procesul de corodare se desfășura la o temperatură de $60 \pm 1^\circ\text{C}$ timp de 90 minute (Dicu et al., 2014). În cazul detectorilor LR 115 stratul activ îndepărtat în timpul gravării chimice este semnificativ afectat de prezența și gradul de agitare, acestea neputând fi controlate cu ușurință (Yip et al., 2003), este necesară monitorizarea efectivă a grosimii stratului activ. Grosime detectorului este măsurată înainte și după gravură cu un ajutorul unui micrometru digital cu o precizie de $\pm 1\mu\text{m}$. Numărarea urmelor de pe suprafața LR 115 a fost realizată cu ajutorul unui microscop optic (100 x mărire). Fiecare detector este citit de 10 ori de către aceeași persoană pentru a reduce potențialele erori de citire.

Activitatea ²¹⁰Po implantat în sticlă este calculată folosind următoarea ecuație (Dicu et al., 2014):

$$A_{210Po} = \frac{CR - B \times LR}{T \times K} \quad (2)$$

Unde: CR este numărul net de urme pe cm² pe detectorul CR-39, LR este numărul net de urme pe cm² pe detectorul LR 115, B este raportul dintre densitatea înregistrată pe detectorul CR-39 și cea a detectorului LR 115 (sticlă neexpusă), K este factorul de sensibilitate a detectorului CR-39 la activitatea ²¹⁰Po și T este perioada de timp (h) cât cei doi detectori au fost montați pe suprafața sticlei. Valorile parametrilor B și K depind de condițiile de corodare. Luând în considerare grosimea stratului activ după procesul de corodare a detectorilor, conform simulărilor Monte Carlo elaborate de Nikezic et al. (2006), B a fost stabilit la 2,2 și K la 0,102.

Pe baza activității ^{210}Po implantat și vârsta obiectului de sticlă, concentrația retrospectivă a radonului a fost estimată prin:

$$C_{Rn} = \frac{245 \times A_{210Po}}{1 - e^{-\lambda_{210Po} \times T}} \quad (3)$$

unde C_{Rn} este concentrația retrospectivă a radonului, A_{210Po} este activitatea ^{210}Po , λ_{210Po} reprezintă constanta de dezintegrare a ^{210}Po iar T este vârsta obiectului de sticlă (ani).

Anexa V - Informații pentru participanți

Titlul studiului: Evaluarea efectelor genotoxice datorate expunerii la doze joase de radiație ionizantă pentru populația din zona uraniferă Băița-Ștei, **finanțat de Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării**, cod: PNII-RU-TE-2014-4-1009, nr.contract: 266/2015 (www.radon.com.ro).

Sunteți invitat să luați parte la un studiu de cercetare. Înainte de a vă decide este foarte important să înțelegeți de ce este efectuat acest studiu și ce anume presupune. Vă rugăm să citiți cu atenție acest material de informare și să îl discutați și cu alte persoane dacă este cazul. Întrebați-ne dacă anumite lucruri nu au fost clar menționate sau dacă doriți să obțineți mai multe informații. Nu vă grăbiți în luarea unei decizii.

În mod natural, fiecare din noi suntem supuși la o anumită doză de radiație ionizantă ca urmare a expunerii la radiația cosmică, terestră, examinărilor radiologice pe care le efectuăm. Însă cea mai importantă contribuție o prezintă expunerea la radonul din interiorul caselor noastre. Radonul este un gaz radioactiv care provine din dezintegrarea uraniului prezent în roci. De altfel, solul este în marea majoritate a cazurilor principala sursă de radon din case. Radonul, după fumat, este a doua cauză în apariția cancerului pulmonar. Studiile anterioare efectuate în zona Băița-Ștei au identificat concentrații ridicate de radon în interiorul locuințelor. În acest caz, are loc împreună cu creșterea concentrației de radon și o creștere a dozei de radiație ionizantă. Deoarece expunerea la aceste concentrații ridicate se extinde pe o perioadă lungă de timp discutăm de expuneri cronice.

Studiile recente efectuate în domeniul expunerii cronice la doze de radiație ionizantă ilustrează apariția leziunilor la nivelul materialului genetic (ADN), alături de incapacitatea organismului de a repara aceste leziuni. Când rata de reparare a ADN-ului este inferioară celei în care materialul genetic este distrus, există posibilitatea ca modificările să fie menținute și acestea să contribuie la creșterea riscului de a dezvolta cancer. Mai mult decât atât, studiile efectuate în urma accidentului de la Cernobîl au sugerat faptul că la copiii expuși în zonele

contaminate leziunile la nivelul materialului genetic erau mult mai severe în raport cu părinții și prezente la majoritatea participanților. Autoarea studiului a concluzionat că un astfel de mediu conduce la apariția unor **persoane care prezintă o sensibilitate crescută la poluarea radioactivă, chimică, infecții, tratamente medicale, etc.**

În acest context, o monitorizare atentă a mediului în care trăim precum și a leziunilor care pot apărea la nivelul materialului genetic ca urmare a expunerii cronice la radiația ionizantă pot oferi informații vitale pentru protejarea noastră personală și a copiilor noștri!

Studiul de față își propune să identifice în ce măsură expunerea cronică la doze de radiație ionizantă alterează materialul genetic sau capacitatea acestuia de a se repara. În acest studiu **sunt acceptate doar femeile care nu au lucrat în mină sau mediu cu radiații ionizante, cu vârsta între 30 și 60 de ani.** În acest sens sunt alcătuite două grupuri: un grup format din 35 de persoane expuse la concentrații mari de radon în interiorul locuințelor (localitățile Băița, Nucet, Fînațe, Cîmpani) – grupul țintă și un grup format din 40 de persoane care nu sunt expuse la concentrații ridicate de radon – grupul martor. Comparând rezultatele obținute la nivelul celor două grupuri, putem identifica și evalua gradul în care expunerea la concentrații ridicate de radon afectează materialul nostru genetic.

Dacă locuiți în Băița, Nucet, Fînațe sau Cîmpani, motivul pentru care ați fost selectată pentru a participa la studiu este concentrația de radon ridicată pe care am înregistrat-o în casa dumneavoastră într-un studiu anterior și veți face parte din grupul țintă. Dacă locuiți în altă localitate decât cele menționate anterior presupunem că sunteți expus la o concentrație scăzută de radon și veți face parte din grupul de referință, grupul martor.

Decizia de a participa la acest studiu vă aparține. Dacă doriți să participați la studiu veți fi rugat să păstrați acest material de informare, respectiv să semnați acordul de participare la studiu. Chiar dacă decideți să luați parte la studiu, în orice moment sunteți liber să vă retrageți fără a motiva alegerea dumneavoastră.

În cazul în care vă decideți să participați la studiu atunci trebuie să știți faptul că cercetarea presupune două părți:

1. Determinarea detaliată a radiației ionizante la care sunteți expus zilnic prin măsurarea concentrației de radon, toron, doză gamma din locuința dumneavoastră. În acest sens, pentru o perioadă de un an (mai 2016 – mai 2017) vor fi amplasați în dormitorul dumneavoastră detectori, asemănători unor cutiuțe de medicamente, pentru

identificarea concentrațiilor la care sunteți expuși. Acești detectori nu sunt periculoși, sunt alcătuiți dintr-un plastic special (alildiglicol) care este sensibil la radiația la care noi suntem expuși zilnic. Rezultatele măsurătorilor vă vor fi comunicate personal în perioada iulie – septembrie 2017.

2. Evaluarea gradului de deteriorare a materialului genetic (ADN). În acest scop, se impune prelevarea a 5 ml de sânge prin puncție venoasă, etapă care se va desfășura în cadrul cabinetului medicului dumneavoastră de familie. Sângele prelevat va fi transportat la Institutul Oncologic din Cluj-Napoca, partener în acest proiect, unde va fi prelucrat și analizat. Sângele prelevat va fi supus testului cometei și micronucleilor pentru evaluarea gradului de lezare a materialului genetic. Sângele nu va fi utilizat în alte scopuri decât cel menționat! Rezultatele analizelor medicale vă vor fi comunicate personal, fiind confidențiale!

Prin participarea la studiu nu trebuie să vă schimbați obiceiurile zilnice. Din contră, pentru ca măsurătorile să fie relevante se impune să păstrați rutina pe care o aveți (modul de utilizare a camerei, gradul de aerisire, alimentația, activitățile cotidiene, etc.).

Pentru prelevarea probei de sânge veți fi programat la o anumită dată și oră la medicul de familie de care aparțineți! Vă vom informa cu cel puțin o lună înainte cu privire la programarea dumneavoastră. Înainte de prelevarea probei de sânge nu sunt niciun fel de restricții în ceea ce privește alimentele sau băuturile consumate. Deoarece prelevarea probei de sânge se efectuează prin înțeparea venei, ar putea, în cazuri foarte rare (garou prea strâns, vene puțin vizibile sau prea profunde), să apară o mică acumulare de sânge la locul prelevării, care va dispărea în câteva zile de la prelevare.

În urma participării la studiu veți cunoaște cu exactitate gradul de poluare radioactivă a aerului de interior util dumneavoastră și familiei dumneavoastră, funcție de care veți primi din partea cercetătorilor o listă de recomandări prin care vei putea reduce concentrațiile la care sunteți expuși. Analizele genetice de sânge vă vor oferi o imagine a modului în care expunerea la radiație afectează materialul dumneavoastră genetic, cât și capacitatea de reparare a acestuia. Aceste informații vor oferi lumii științifice o mai bună înțelegere a impactului radiațiilor asupra organismului cu posibile aplicații în cazul persoanelor expuse continuu la radiație (muncitorii la centralele nucleare, radiologii, etc.), persoanelor supuse tratamentului cu radiație împotriva cancerului, respectiv o potențială imagine despre modul în care copiii noștri vor reacționa la un astfel de mediu și implicațiile asupra sănătății lor.

Toate informațiile colectate despre dumneavoastră pe parcursul acestui studiu vor fi strict confidențiale și păstrate în condiții de maximă siguranță. Veți primi un cod unic (ID) în cadrul acestui studiu după care veți fi identificat. Datele vor fi utilizate doar în scop de cercetare, urmând a fi publicate în jurnale de specialitate și la conferințe din domeniu.

Pentru orice informație suplimentară, directorul proiectului (Dr. Tiberius Dicu) vă stă la dispoziție la adresa de email: tiberius.dicu@ubbcluj.ro sau la numărul de telefon: 0743797442.

Anexa VI – Consimțământ informat

Titlul studiului: Evaluarea efectelor genotoxice datorate expunerii la doze joase de radiație ionizantă pentru populația din zona uraniferă Băița-Ștei, cod: PNII-RU-TE-2014-4-1009, nr.contract: 266/2015 (www.radon.com.ro).

Numele cercetătorilor implicați: Dr. Dicu Tiberius; Dr. Virag Piroška; Dr. Cucuș Alexandra.

Confirm că am citit și înțeles documentul *Informații pentru participanți* și că am avut posibilitatea să pun întrebări cercetătorilor referitor la studiul de față.

Înțeleg că **participarea mea este complet voluntară** și că pot în orice moment al studiului să mă retrag fără a da explicații despre alegerea făcută și fără ca drepturile mele legale să fie afectate.

Mi s-a explicat că participarea la studiu presupune monitorizarea radiațiilor ionizante în locuință pe parcursul unui an, respectiv prelevarea unei probe de sânge de 5 ml prin puncție venoasă.

Accept să iau parte la studiu și datele rezultate să fie publicate în jurnale de specialitate sau conferințe **cu asigurarea confidențialității**.

Am fost informată că toate datele (personale, clinice și ale materialelor biologice) colectate vor fi tratate în conformitate cu „Directiva Uniunii Europene (Dir /95/46/EC) asupra protecției indivizilor cu privire la procesarea datelor” și cu aplicarea legilor naționale.

_____	_____	_____
Numele participantului	Data	Semnătura
_____	_____	_____
Numele cercetătorului	Data	Semnătura

(1 exemplar la participant, 1 exemplar la cercetător)

Bibliografie

Armencea E., Armencea A., Burghele B., Cucos A., Malos C., Dicu T. Indoor radon measurements in Bacău County, Rom. J. Phys. 58, 189-195, 2013.

Belyaev I. Nonthermal biological effects of microwaves: current knowledge, further perspective and urgent needs. Electromagn. Biol. Med. 24, 375 – 403, 2005.

Bohicchio, F., McLaughlin, J.P., Walsh, C., Comparison of radon exposure assessment results: ^{210}Po surface activity on glass objects vs. contemporary air radon concentration. Radiat. Meas. 36, 211–215, 2003.

Burghele B. Teză de doctorat: Thoron contribution to the natural irradiation of the Romanian population and problems related to thoron and radon measurements. Cluj-Napoca, Romania, pg. 35, 2013.

Cosma C., Moldovan M., Dicu T., Kovacs T., Radon in water from Transylvania (Romania), Rad. Meas. 43, 1423 – 1428, 2008.

Cucoș (Dinu) A., Cosma C., Dicu T., Papp B., Niță D.C., Begy R., Moldovan M., Cîndea C., Fulea D., Sainz C., Situația actuală a măsurătorilor de radon indoor și perspectiva acțiunilor de remediere în zona minieră Băița-Bihor (România), Ecotera, no. 27, 2011.

Cucoș (Dinu) A., Cosma C., Dicu T., Papp B., Niță D.C., Begy R., Moldovan M., Cîndea C., Fulea D., Sainz C., Thorough investigations on indoor radon in Băița radon-prone area (Romania). Sci. Total Env. 431, 78-83, 2012.

Dicu T., Armencea (Mutoiu) S.E., Burghele B., Cosma C. Retrospective dosimetry of radon gas based on the activity of ^{210}Po in glass objects. Rom. Journ. Phys., Vol. 59, Nos. 9–10, P. 1067–1073, Bucharest, 2014.

Dolha M., Timar-Gabor A., Dicu T., Begy R., Anton M., Cosma C. A high-resolution map of gamma dose rates in Cluj County, Romania using LiF:Mg,Cu,P detectors. Rad. Prot. Dos., 162(1-2), 14-19, 2014.

Falk R., Almrén K. and Östergren I. Experience from retrospective radon exposure estimations for individuals in a radon-epidemiological study using solid state nuclear track detectors. Radon in the Living Environment, 19-23 April 1999, Athens, Greece.

Falk, R., Mellander, H., Nyblom, L., Ostergren, I., Retrospective assessment of radon exposure by measurements of ^{210}Po implanted in surfaces using an alpha track detector technique. *Environ. Int.* 22, S857–S861, 1996.

Kesari K., Behari J., Fifty-gigahertz microwave exposure effect of radiations on rat brain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 158, 126 – 139, 2009.

Lively, R.S., Ney, E.P., Surface radioactivity resulting from the deposition of ^{222}Rn daughter products. *Health Phys.* 52, 411–415, 1987.

Mahaffey, J.A., Parkhurst, M.A., James, A.C., Cross, F.T., Alavanja, M.C.R., Boice, J.D., Ezrine, S., Henderson, P., Brownson, R.C., Estimating past exposure to indoor Rn from household glass. *Health Phys.* 64, 381–391, 1993.

McLaughlin, J.P., The application of techniques to assess radon exposure retrospectively. *Radiat. Prot. Dosim.* 78, 1–6, 1998.

Nikezic D., Yip C.W.Y., Leung S.Y.Y., Leung J.K.C., Yu K.N., A further study of the (CR–LR) difference technique for retrospective radon exposure assessment, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 568, 792–798, 2006.

Phillips J., Ivaschuk O., Ishida-Jones T., Jones R., Caampbell M., Haggren W., DNA damage in Molt-4 T-lymphoblastoid cells exposed to cellular telephone radiofrequency fields in vitro. *Bioelectrochem. Bionerg.* 45, 103 – 110, 1998.

Sage C., The similar effects of low-dose ionizing radiation and non-ionizing radiation from background environmental levels of exposure. *Environmentalist* 32, 144 – 156, 2012.

Samuelsson C., Retrospective determination of Rn in houses. *Nature* 334, 338–340, 1988.

Yip C.W.Y., Ho J.P.Y., Koo V.S.Y., Nikezic D., Yu K.N., Effects of stirring on the bulk etch rate of LR 115 detector. *Radiat. Meas.* 37, 197–200, 2003.

www.radon.com.ro