



Cell nucleus seeking OBT: a still neglected problem?

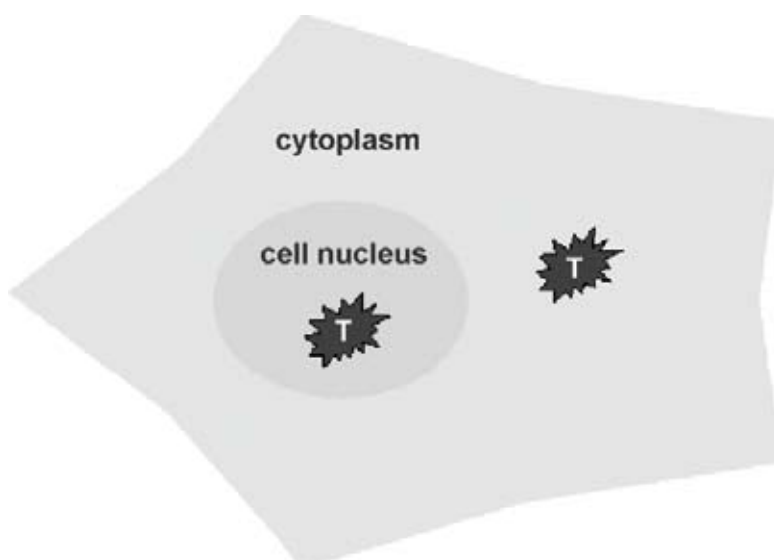
TOL et noyau de la cellule : un problème encore négligé ?

Wolfgang-Ulrich Müller¹
¹Institut für medizinische Strahlenbiologie
 Universitätsklinikum Essen

1 | Background

It is well-known that organically bound tritium (OBT) is more dangerous to cells than HTO or HT (Diabate *et al.*, 1993). An increase in risk in the order of about 2 is discussed. Quite frequently, however, it is overlooked that the extent of risk very much depends on the specific chemical compound to which tritium is bound. The low-energy beta emitter tritium (mean energy 5.7 keV) presents no threat to living organisms as long as its decay happens more than about 7 μm away from a critical target in an aqueous solution. This is the maximum range of its beta ray in water with an average of about 1 μm . The situation is completely different, when the decay occurs very close to a critical target or even within this target (Fig. 1). In the latter case, all of the energy is deposited in this crucial compartment resulting in comparatively high doses (Bond *et al.*, 1966) and correspondingly high effects.

Fig. 1: Energy deposition of a tritium decay in the cytoplasm and in the cell nucleus



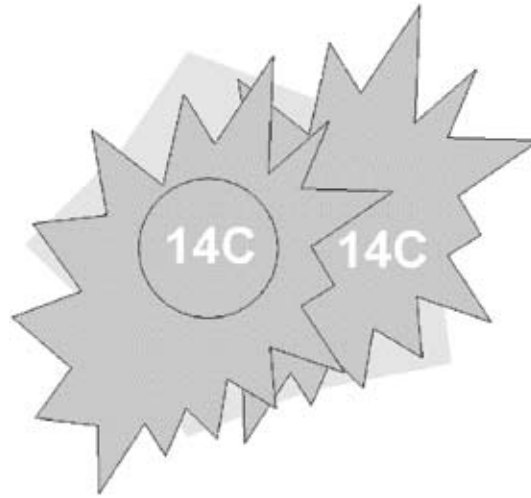
1 | Contexte

Il est connu que le tritium organiquement lié (TOL) est plus dangereux pour les cellules que l'eau tritiée (HTO) ou que l'hydrogène tritié (HT) (Diabate *et al.*, 1993). Une augmentation du risque de l'ordre de 2 est discutée. Tout à fait fréquemment, toutefois, il est négligé que l'augmentation du risque dépend beaucoup du composé chimique spécifique auquel le tritium est lié. Le tritium, émetteur bêta de basse énergie (énergie moyenne 5,7 keV) ne présente pas de menace pour les organismes vivants aussi longtemps que sa désintégration radioactive a lieu à environ 7 μm d'une cible critique en milieu aqueux. C'est la portée maximale de son rayonnement bêta dans l'eau, avec une portée moyenne d'environ 1 μm . La situation est complètement différente quand la désintégration se produit très près d'une cible critique ou même à l'intérieur de celle-ci (Fig. 1). Dans ce dernier cas, toute l'énergie est déposée dans ce compartiment crucial, impliquant des doses relativement élevées (Bond *et al.*, 1966) et des effets correspondants forts.

Fig. 1: Dépôt d'énergie d'une désintégration de tritium dans le cytoplasme et dans le noyau

The situation is different for a beta-emitter with a slightly higher energy like C-14 (mean energy 49.3 keV). If the C-14 decay occurs in the cell nucleus, most of the energy will be deposited outside of the nucleus (Fig. 2). This explains why C-14 labelled cell nucleus seeking compounds are less effective compared to tritiated ones (Simpson *et al.*, 1962).

Fig. 2: Energy deposition of a C-14 decay in the cytoplasm and in the cell nucleus (circle)



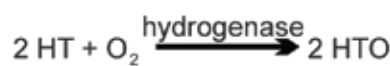
La situation est différente pour un émetteur bêta avec une énergie légèrement supérieure comme le carbone 14 (énergie moyenne 49,3 keV). Si la désintégration du carbone 14 se produit dans le noyau de la cellule, la plupart de l'énergie sera déposée en dehors du noyau (Fig. 2). Ceci explique pourquoi les molécules marquées en C-14 attirées par le noyau de la cellule ont moins d'effets comparées à celles marquées en tritium (Simpson *et al.*, 1962).

Fig. 2 : Dépôt d'énergie d'une désintégration de C-14 dans le cytoplasme et le noyau (cercle)

Several compounds show some or a lot of accumulation within the cell nucleus. This is particularly true for T-thymidine, because it is incorporated exclusively into DNA. One of the first publications to show that in HeLa cells this results in an about 1,000 times higher risk compared to HTO (based on the activities applied) appeared already in 1958 (Painter *et al.*, 1958). The other DNA precursors show similar effects, although to a slightly less extent, because they are also incorporated into RNA. There are some other candidates that play a role: those amino acids that are incorporated into histones or nuclear proteins in general. Here, again, there are some particularly efficient amino acids, like arginine and lysine, because their contribution to the histones is high, and tryptophane, because it is incorporated into nuclear non-histone proteins (Killen *et al.*, 1989).

Most of the tritium emitted into the environment is in the form of HT and HTO. Both molecules are of no threat at all, as long as they stay outside of the body and even after incorporation, doses to the cell nucleus will be low. But there are several pathways by which the tritium of HT and HTO can be incorporated into organic compounds:

Bacteria:



Plants:



Production of various other OBTs
(e.g. T-thymidine, T-arginine)

Plusieurs molécules montrent un peu ou plus d'accumulation dans le noyau de la cellule. C'est particulièrement vrai pour la thymidine tritiée, parce qu'elle est incorporée exclusivement dans l'ADN. Une des premières publications, à montrer que dans les cellules HeLa cela amène un risque environ 1000 fois plus élevé que pour de l'eau tritiée (basé sur les activités appliquées), paru déjà en 1958 (Painter *et al.*, 1958). Les autres précurseurs de l'ADN montrent des effets similaires, bien qu'un peu moindres parce qu'ils sont aussi incorporés dans l'ARN. Il y a d'autres candidats qui jouent un rôle : les acides aminés qui sont incorporés dans les histones ou les protéines du noyau en général. Dans ce cas, à nouveau, il ya quelques acides aminés particulièrement efficaces, comme l'arginine et la lysine, parce que leur contribution aux histones est élevée, et le tryptophane, parce qu'il est incorporé dans les protéines non-histones du noyau (Killen *et al.*, 1989).

La plupart du tritium émis dans l'environnement est sous la forme HT ou HTO. Les 2 deux molécules sont sans danger aussi longtemps qu'elles restent en dehors de l'organisme, et même après l'incorporation, les doses au noyau de la cellule seront faibles. Mais il y a plusieurs voies par lesquelles le tritium de HT ou HTO peut être incorporé dans les molécules organiques (bactéries : action de l'hydrogénase ; plantes : action de la photosynthèse).

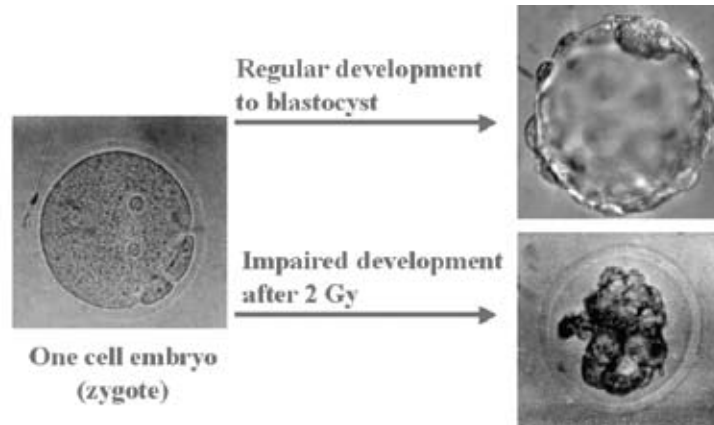
There is some information available in the literature that these conversions really happen (Diabate *et al.*, 1993), although it is hard to say, whether we have collected enough quantitative information to state that the tritiated cell nucleus seeking compounds are irrelevant for radiation protection aspects, because the conversion of HT and HTO into those compounds is negligible.

Il y a des informations dans la littérature sur l'occurrence réelle de ces conversions (Diabate *et al.*, 1993), bien qu'il soit difficile de dire, si nous avons collecté assez d'informations quantitatives pour statuer, que les molécules tritiées recherchées par le noyau sont hors de propos pour les aspects de radioprotection parce que la conversion de HT et HTO dans ces molécules est négligeable.

2 | Some results

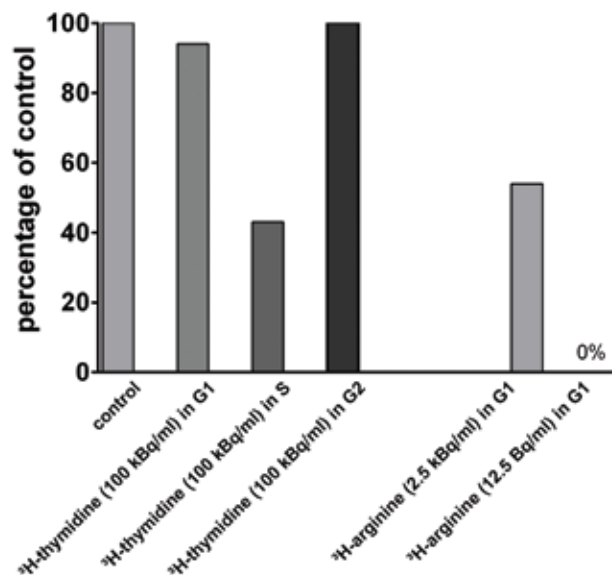
In the past a lot of experiments have been carried out looking for the effects of tritiated thymidine and various tritiated amino acids in preimplantation embryos (Fig. 3). Experiments using preimplantation mouse embryos are relevant in so far as almost all of the processes taking place during this stage of gestation are very similar among most mammals, including humans.

Fig. 3: Regular development of one cell mouse embryos to the stage of implantation and radiation effect on this process



All these experiments consistently showed a tremendously high effect on embryonic development (Clerici *et al.*, 1984; Horner *et al.*, 1974; Kelly *et al.*, 1976; Matsuda *et al.*, 1986; Müller *et al.*, 1986; Müller *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 1996; Olsen *et al.*, 1987; Snow, 1973; Spindle *et al.*, 1982; Streffer *et al.*, 1977; Yamada *et al.*, 1988). Based on the activities applied, T-thymidine was about 1,000 times more effective than HTO (Streffer *et al.*, 1977) and some of the amino acids up to more than 40,000 (Killen *et al.*, 1989; Straume *et al.*, 1993). An important reason for the higher efficiency of some amino acids compared to thymidine depends on the fact that the amino acids are integrated into proteins irrespective of the cell cycle stage, whereas thymidine is incorporated into the DNA almost exclusively (with the exception of repair processes) during S-phase (Fig. 4). An additional aspect to note is the problem that some amino acids cannot be synthesized by humans, but have to be taken up by food (e.g. lysine, phenylalanine, tryptophane). And not only ribose and deoxyribose are derived from glucose (the major product of photosynthesis), but also purine and pyrimidine bases.

Fig. 4: Dependence of T-thymidine and T-arginine effects on cell cycle (Müller *et al.*, 1996)



Cell nucleus seeking OBT: a still neglected problem?

2 | Quelques résultats

Dans le passé, beaucoup d'expériences ont été menées en vue des effets de la thymidine tritiée et de différents acides aminés tritiés dans des embryons avant implantation (Fig. 3). Les expériences utilisant des embryons avant implantation de souris sont pertinentes dans la mesure où presque tous les processus se déroulant pendant cette période de la gestation sont très similaires pour la plupart des mammifères, y compris l'être humain.



Fig. 3 : Développement normal d'embryon monocellulaire de souris au stade de l'implantation et effets des radiations sur ce processus

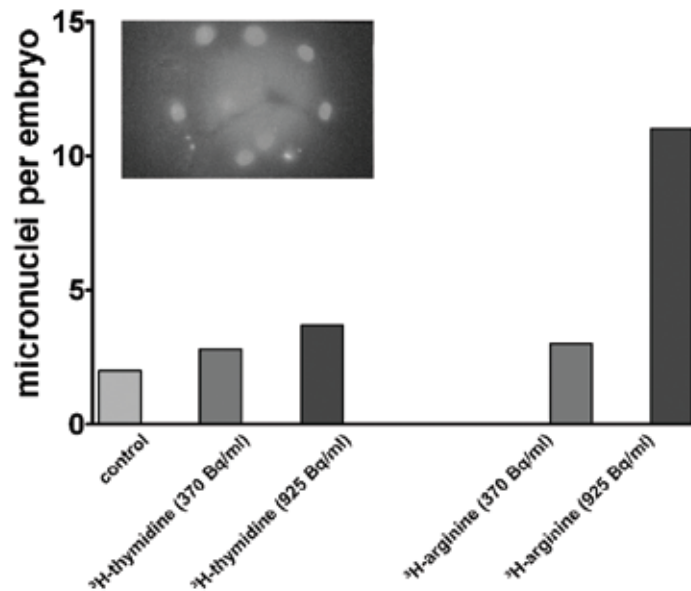
Toutes ces expériences montraient logiquement un effet très fort sur le développement embryonnaire (Clerici *et al.*, 1984; Horner *et al.*, 1974; Kelly *et al.*, 1976; Matsuda *et al.*, 1986; Müller *et al.*, 1986; Müller *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 1996; Olsen *et al.*, 1987; Snow, 1973; Spindle *et al.*, 1982; Streffer *et al.*, 1977; Yamada *et al.*, 1988). Pour les mêmes activités utilisées, la thymidine tritiée était 1000 fois plus efficace que l'eau tritiée (Streffer *et al.*, 1977) et quelques acides aminés plus de 40 000 fois (Killen *et al.*, 1989; Straume *et al.*, 1993). Une raison importante pour la plus grande efficacité de quelques acides aminés comparée à celle de la thymidine dépend du fait que les acides aminés sont incorporés dans des protéines sans relation avec le stade du cycle cellulaire, alors que la thymidine est incorporée dans l'ADN presque seulement (à l'exception des processus de réparation) pendant le stade S (Fig. 4). Un aspect additionnel à noter est le problème que certains acides aminés ne peuvent pas être synthétisés par l'être humain, mais qu'ils doivent être fournis par la nourriture (p.ex. lysine, phénylalanine, tryptophane). Et ribose et désoxyribose ne sont pas seuls à être dérivés du glucose (le produit dominant de la photosynthèse), mais aussi les bases purine et pyrimidine.

Fig. 4: Dépendance des effets de la thymidine et de l'arginine tritiées sur le cycle cellulaire (Müller *et al.*, 1996)

(A 2 hour pulse was given at specific cell cycle stages of 1-cell embryos and cell numbers were determined 144 post conception; please, note the differences in activity applied.)

The tritium decay within the cell nucleus clearly induces damage within the DNA. This can be shown, for example, by the formation of micronuclei (Fig. 5). Again, T-arginine is more effective than T-thymidine.

Fig. 5: Micronucleus formation in embryos after exposure to T-thymidine and T-arginine (Müller *et al.*, 1987)



(The insert shows an 8-cell embryo with 3 micronuclei and 1 polar body)

3 | Some specific aspects

1. It is true that most of the experiments have used rather high specific activities and it is to be expected and has been shown that lower specific activities result in smaller effects (Wiebold *et al.*, 1985). This does not mean that with lower specific activities effects do not occur; they may just decline somewhat. And one should keep in mind that the major reason for thresholds observed for deterministic effects, i.e. the necessity to kill or functionally inactivate many cells, does not apply to the 1-cell embryo!

2. Most of the experiments have been done in vitro. This means that metabolic influences are neglected. Balonov *et al.*, however, reported results on dominant lethal mutations after in vivo application of various tritiated compounds to mice (Balonov *et al.*, 1993). Among others, they found a 12 times higher risk after T-thymidine and a 6 to 7 times higher risk after application of tritiated L-lysine compared to HTO. These results are not as impressive as the in vitro experiments, but still markedly higher than HTO exposures.

3. One argument that is frequently used to claim that cell nucleus seeking compounds are of no relevance in radiation protection is the comment that based on the dose to the nucleus there is not much of a difference to HTO. It is completely correct that due to the accumulation of the decays within the cell nucleus, doses expressed in gray are very high. People, however, do not take up dose, but activities. Thus, it is important how many becquerel of a tritiated compound are consumed; after consumption this translates into dose that causes specific effects. The questions related to the RBE are important (Paquet *et al.*, 2009), but clarification of the RBE only is not sufficient in the case of cell nucleus seeking compounds.

(Un pulse de 2 heures était appliqué à des stades particuliers du cycle cellulaire d'embryons monocellulaires et le nombre de cellules était déterminé 114h après la conception ; noter les différences dans les activités appliquées.)

La désintégration du tritium à l'intérieur du noyau de la cellule induit clairement des dommages à l'intérieur de l'ADN. Ceci peut être montré, par exemple, par la formation de micro noyaux (Fig. 5). De nouveau, l'arginine tritiée est plus efficace que la thymidine tritiée.

Fig. 5: Formation de micro noyaux dans des embryons après une exposition à de la thymidine et de l'arginine tritiées (Müller *et al.*, 1987)

(La photo en encart montre un embryon de 8 cellules avec 3 micro noyaux et un corps polaire)

3 | Quelques aspects spécifiques

1. Il est vrai que la plupart des expériences ont utilisé des activités plutôt élevées, et il doit être attendu et il a été montré que des activités plus basses conduisent à des effets plus faibles (Wiebold *et al.*, 1985). Cela ne signifie pas qu'avec de plus faibles activités les effets ne se produisent pas ; ils peuvent seulement quelque peu décroître. Et on doit garder en mémoire que la plus grande raison pour des seuils observés pour des effets déterministes, c'est à dire la nécessité de tuer ou d'inactiver fonctionnellement de nombreuses cellules, ne s'applique pas à un embryon au stade monocellulaire !

2. La plupart des expériences ont été réalisées in vitro. Cela signifie que les influences du métabolisme sont négligées. Toutefois, Balonov *et al.* ont rapporté des résultats sur des mutations dominantes létales après une application in vivo de différentes molécules tritiées à des souris (Balonov *et al.*, 1993). Parmi d'autres, ils ont trouvé un risque 12 fois plus grand avec de la thymidine tritiée et 6 à 7 fois avec de la L-lysine tritiée, par rapport à de l'eau tritiée. Ces résultats ne sont pas aussi impressionnant que ceux obtenus avec les expériences in vitro, mais ils sont plus élevés qu'avec des expositions à de l'eau tritiée.

3. L'argument fréquemment utilisé pour affirmer que les molécules recherchées par le noyau des cellules ne sont pas pertinentes pour la radioprotection est que par rapport à la dose au noyau, il n'y a pas beaucoup de différence avec l'eau tritiée. Il est tout à fait vrai que, étant donné l'accumulation des désintégrations dans le noyau de la cellule, les doses exprimées en Gray sont très élevées. Toutefois, les gens n'absorbent pas des doses, mais des activités. Ainsi, il importe de connaître combien de becquerels d'une molécule tritiée sont consommés ; ce qui se traduit en doses et en effets spécifiques. Les questions en rapport avec l'EBR sont importantes (Paquet *et al.*, 2009), mais l'éclaircissement sur l'EBR n'est pas suffisant dans le cas des molécules recherchées par le noyau.

4. Some people point to the fact that most of the results obtained up to now for the early stages of pregnancy are related to the death of the preimplantation embryo and that this is not “much of a concern”, because this effect, if it occurs, will be undetectable in real life. Besides the rather questionable ethical position, it is also premature to conclude that embryonic death is the only effect to be expected. Almost all of the studies have only looked at this effect, because this is methodologically the easiest way to run the experiments. This does not mean that other effects (malformations, solid tumours, leukaemia) are not to be expected. And at least for malformations, a threshold dose could not be detected after X-ray exposure in 1-cell embryos of those mouse strains that react with malformations after exposure of this stage (Müller *et al.*, 1994)

4. Quelques uns insistent sur le fait que la plupart des résultats obtenus jusqu'à présent pour les premiers stades de la grossesse ont un rapport avec la mort de l'embryon avant implantation et que ce n'est pas “d'un grand intérêt”, parce que cet effet, s'il a lieu, ne sera pas détectable dans la vie réelle. Mis à part la position éthique plutôt questionnable, il est aussi prématuré de conclure que la mort de l'embryon est le seul effet attendu. Presque toutes les études ont seulement examiné cet effet, parce que c'est sur le plan méthodologique la façon la plus simple de conduire l'expérience. Cela ne signifie pas que d'autres effets (malformations, tumeurs massives, leucémies) ne sont pas à être attendus. Et au moins pour les malformations, une dose seuil ne pouvait pas être détectée après une exposition aux rayons X d'embryons monocellulaires de ces lignées de souris, qui réagissent par des malformations après une exposition à ce stade (Müller *et al.*, 1994).

4 | A final remark

This overview does not “prove” that cell nucleus seeking OBTs present an extraordinarily high hazard in the environment. But those compounds are clearly more dangerous than HTO or HT, and therefore one should be sure that the risk is acceptable or, even better, non-existent, before one releases high amounts of tritium into the environment.

4 | Une remarque finale

Cette revue ne “prouve” pas que les molécules marquées au tritium recherchées par le noyau de la cellule représentent un danger élevé extraordinaire dans l'environnement. Mais ces molécules sont clairement plus dangereuses que HTO ou HT, et par conséquent on devrait être sûr que le risque est acceptable ou, encore mieux, inexistant, avant de libérer des niveaux élevés de tritium dans l'environnement.

REFERENCES

- Balonov M.I., Muksinova K.N., Mushkacheva G.S. (1993) Tritium radiobiological effects in mammals: review of experiments of the last decade in Russia, *Health Physics* 65, 713-726.
- Bond V.P., Feinendegen L.E. (1966) Intracellular ^3H thymidine: Dosimetric, radiobiological and radiation protection aspects, *Health Physics* 12, 1007-1020.
- Clerici L., Carroll M.J., Merlini M., Vercellini L., Campagnari F. (1984) The toxicity of tritium: the effects of tritiated amino-acids on preimplanted mouse embryos, *International Journal of Radiation Biology* 45, 245-250.
- Diabate S., Strack S. (1993) Organically bound tritium, *Health Physics* 65, 698-712.
- Horner D., McLaren A. (1974) The effect of low concentrations of [^3H]-thymidine on pre- and postimplantation mouse embryos, *Biology of Reproduction* 11, 553-557.
- Kelly S.J., Rossant J. (1976) The effect of short-term labelling in [^3H] thymidine on the viability of mouse blastomeres: alone and in combination with unlabelled blastomeres, *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 35, 95-106.
- Killen H.M., Carroll J. (1989) The effects of tritium on embryo development: the embryotoxic effects of [^3H]tryptophan, *International Journal of Radiation Biology* 56, 139-149.
- Matsuda Y., Yamada T., Tobar I. (1986) Chromosome aberrations induced by tritiated water or ^{60}Co gamma-rays at early pronuclear stage in mouse eggs, *Mutation Research* 160, 87-93.
- Müller W.-U., Heckeley N., Streffer C. (1996) Effects of cell cycle specific exposure to ^3H -thymidine or ^3H -arginine on development and cell proliferation of mouse embryos, *Radiation and Environmental Biophysics* 35, 267-271.
- Müller W.-U., Spindle A. (1986) Induction of sister chromatid exchange in preimplantation mouse embryos in vitro by ^3H -thymidine or ultraviolet light in combination with caffeine, *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 6, 107-114.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Balonov M.I., Muksinova K.N., Mushkacheva G.S. (1993) Tritium radiobiological effects in mammals: review of experiments of the last decade in Russia, *Health Physics* 65, 713-726.
- Bond V.P., Feinendegen L.E. (1966) Intracellular ^3H thymidine: Dosimetric, radiobiological and radiation protection aspects, *Health Physics* 12, 1007-1020.
- Clerici L., Carroll M.J., Merlini M., Vercellini L., Campagnari F. (1984) The toxicity of tritium: the effects of tritiated amino-acids on preimplanted mouse embryos, *International Journal of Radiation Biology* 45, 245-250.
- Diabate S., Strack S. (1993) Organically bound tritium, *Health Physics* 65, 698-712.
- Horner D., McLaren A. (1974) The effect of low concentrations of [^3H]-thymidine on pre- and postimplantation mouse embryos, *Biology of Reproduction* 11, 553-557.
- Kelly S.J., Rossant J. (1976) The effect of short-term labelling in [^3H] thymidine on the viability of mouse blastomeres: alone and in combination with unlabelled blastomeres, *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 35, 95-106.
- Killen H.M., Carroll J. (1989) The effects of tritium on embryo development: the embryotoxic effects of [^3H]tryptophan, *International Journal of Radiation Biology* 56, 139-149.
- Matsuda Y., Yamada T., Tobar I. (1986) Chromosome aberrations induced by tritiated water or ^{60}Co gamma-rays at early pronuclear stage in mouse eggs, *Mutation Research* 160, 87-93.
- Müller W.-U., Heckeley N., Streffer C. (1996) Effects of cell cycle specific exposure to ^3H -thymidine or ^3H -arginine on development and cell proliferation of mouse embryos, *Radiation and Environmental Biophysics* 35, 267-271.
- Müller W.-U., Spindle A. (1986) Induction of sister chromatid exchange in preimplantation mouse embryos in vitro by ^3H -thymidine or ultraviolet light in combination with caffeine, *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 6, 107-114.

Müller W.-U., Streffer C., Molls M., Glück L. (1987) Radiotoxicities of ^3H -thymidine and of ^3H -arginine compared in mouse embryos in vitro, *Radiation Research* 110, 192-198.

Müller W.-U., Streffer C., Pampfer S. (1994) The question of threshold doses for radiation damage: malformations induced by radiation exposure of unicellular or multicellular preimplantation stages of the mouse, *Radiation and Environmental Biophysics* 33, 63-68.

Olsen W.M., Storeng R. (1987) Effects of ^3H -thymidine on preimplantation mouse embryos in vitro, *Pharmacology & Toxicology* 61, 203-208.

Painter R.B., Drew R.M., Hughes W.L. (1958) Inhibition of HeLa growth by intranuclear tritium, *Science* 127, 1244-1245.

Paquet F., Metivier H. (2009) Are the risks from tritium exposures being underestimated?, *J.Radiol.Prot.* 29, 175-181.

Simpson L., Bennett L.L. (1962) Biological effects of carbon-14 incorporated into nucleic acids of mouse embryos, *Radiation Research* 17, 145-157.

Snow M.H.L. (1973) Abnormal development of pre-implantation mouse embryos grown in vitro with ^3H -thymidine, *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 29, 601-615.

Spindle A., Wu K., Pedersen R.A. (1982) Sensitivity of early mouse embryos to [^3H] thymidine, *Experimental Cell Research* 142, 397-405.

Straume T., Carsten A.L. (1993) Tritium radiobiology and relative biological effectiveness, *Health Physics* 65, 657-672.

Streffer C., Elias St., van Beuningen D. (1977) Comparative effects of tritiated water and thymidine on the preimplanted mouse embryo during cultivation in vitro, *Current Topics in Radiation Research Quarterly* 12, 182-193.

Wiebold J.L., Anderson G.B. (1985) Lethality of a tritiated amino acid in early mouse embryos, *J.Embryol.Exp.Morphol.* 88, 209-217.

Yamada T., Ohyama H (1988), Effects of organically bound tritium (OBT) on pre-implantation mouse embryos in vitro, in Proceedings of the 3rd Japan-US Workshop on Tritium Radiobiology, p 274-279

Müller W.-U., Streffer C., Molls M., Glück L. (1987) Radiotoxicities of ^3H -thymidine and of ^3H -arginine compared in mouse embryos in vitro, *Radiation Research* 110, 192-198.

Müller W.-U., Streffer C., Pampfer S. (1994) The question of threshold doses for radiation damage: malformations induced by radiation exposure of unicellular or multicellular preimplantation stages of the mouse, *Radiation and Environmental Biophysics* 33, 63-68.

Olsen W.M., Storeng R. (1987) Effects of ^3H -thymidine on preimplantation mouse embryos in vitro, *Pharmacology & Toxicology* 61, 203-208.

Painter R.B., Drew R.M., Hughes W.L. (1958) Inhibition of HeLa growth by intranuclear tritium, *Science* 127, 1244-1245.

Paquet F., Metivier H. (2009) Are the risks from tritium exposures being underestimated?, *J.Radiol.Prot.* 29, 175-181.

Simpson L., Bennett L.L. (1962) Biological effects of carbon-14 incorporated into nucleic acids of mouse embryos, *Radiation Research* 17, 145-157.

Snow M.H.L. (1973) Abnormal development of pre-implantation mouse embryos grown in vitro with ^3H -thymidine, *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 29, 601-615.

Spindle A., Wu K., Pedersen R.A. (1982) Sensitivity of early mouse embryos to [^3H] thymidine, *Experimental Cell Research* 142, 397-405.

Straume T., Carsten A.L. (1993) Tritium radiobiology and relative biological effectiveness, *Health Physics* 65, 657-672.

Streffer C., Elias St., van Beuningen D. (1977) Comparative effects of tritiated water and thymidine on the preimplanted mouse embryo during cultivation in vitro, *Current Topics in Radiation Research Quarterly* 12, 182-193.

Wiebold J.L., Anderson G.B. (1985) Lethality of a tritiated amino acid in early mouse embryos, *J.Embryol.Exp.Morphol.* 88, 209-217.

Yamada T., Ohyama H (1988), Effects of organically bound tritium (OBT) on pre-implantation mouse embryos in vitro, in Proceedings of the 3rd Japan-US Workshop on Tritium Radiobiology, p 274-279