

**JUGOSLOVENSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU
OD ZRAČENJA**

ZBORNİK RADOVA

**XXII SIMPOZIJUM JDZZ
Petrovac n/m 2003,
29. septembar – 1. oktobar**

**Beograd
2003.**

ZBORNIK RADOVA

XXII SIMPOZIJUM JDZZ

Petrovac n/m, 29. septembar – 1. oktobar 2003.

Izdavači:

Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Jugoslovensko društvo za zaštitu od zračenja

Za izvršnog izdavača:

Prof Dr Dragoslav Petrović

Urednik:

Mr Milojko Kovačević

ISBN 86-7306-061-3

© Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Tehnička obrada: Zoran Hadžić

Štampa: Štamparija Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd

Tiraž: 150 primeraka

Štampa završena septembra 2003.

XXII SIMPOZIJUM JUGOSLOVENSKOG DRUŠTVA
ZA ZAŠTITU OD ZRAČENJA
Petrovac n/m, 29. septembar – 1. oktobar 2003.

Organizatori:

JUGOSLOVENSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU OD ZRAČENJA

INSTITUT ZA NUKLEARNE NAUKE „VINČA“

Laboratorija za zaštitu od zračenja i zaštitu životne sredine „Zaštita“

CENTAR ZA EKOTOKSIKOLOŠKA ISPITIVANJA CRNE GORE

Organizacioni odbor:

Predsednik: Milojko Kovačević

Članovi:

Ranko Kljajić
Perko Vukotić
Milan Pavlović
Jagoš Raičević
Ana Mišurović
Tomislav Anđelić
Gordana Pantelić
Željka Ilić
Slobodanka Stanković
Dragoslav Nikezić

Redakcioni odbor:

Dr Marko Ninković
Dr Gordana Joksić
Dr Milan Orlić

Organizaciju su pomogli:

- ⇒ Ministarstvo za zaštitu prirodnih bogatstava i zaštitu životne sredine Republike Srbije
- ⇒ Ministarstvo za nauku, tehnologiju i razvoj Republike Srbije
- ⇒ Ministarstvo zdravlja Republike Srbije
- ⇒ Ministarstvo zaštite životne sredine i uređenja prostora Crne Gore
- ⇒ Centar za ekotoksikološka ispitivanja Crne Gore
- ⇒ Institut za nuklearne nauke Vinča
- ⇒ Naučni institut za veterinarstvo, Novi Sad
- ⇒ Sineks laboratory, Beograd
- ⇒ Aqualab, Beograd

Ovaj Zbornik je zbirka radova saopštenih na XXII Simpozijumu Jugoslovenskog društva za zaštitu od zračenja koji je održan od 29. septembra do 1. oktobra 2003. godine u Petrovcu na moru. Radovi su razvrstani po sekcijama. Mada su svi radovi u Zborniku recenzirani od strane Redakcionog odbora za sve iznesene tvrdnje i rezultate odgovorni su sami autori.

Organizacioni odbor se zahvaljuje svim autorima radova na uloženom trudu. Posebno se zahvaljujemo sponzorima koji su pomogli održavanje Simpozijuma i štampanje Zbornika.

Organizacioni odbor

UČESTALOST MIKRONUKLEUSA U LIMFOCITIMA ZAVISI OD APOPTOTSKOG POTENCIJALA LEUKOCITA

G. Joksić, S.Petrović, B. Đurović¹, D. Popović¹

Institut za Nuklearne nauke Vinča

¹ Vojno-Medicinska Akademija, Beograd

SADRŽAJ

U ovom radu ispitan je udeo interfazne ćelijske smrti u biološkom odgovoru humanih leukocita na male doze jonizujućeg zračenja. Za ispitivanje odabrana je grupa radiologa. Pored hromozomskih aberacija i mikronukleusa flow-citometrijom je ispitan apoptotski potencijal leukocita. Ispitivana je međusobna zavisnost navedenih parametara u izloženoj i odgovarajućoj kontrolnoj grupi. Utvrđeno je da hronična izloženost malim dozama jonizujućeg zračenja remeti ravnotežu signalnih molekula u ćeliji, značajno smanjuje mogućnost fiziološke eliminacije ozleđenih leukocita i povećava učestalost mikronukleusa u limfocitima

UVOD

Dosadašnja istraživanja u radiobiologiji pokazala su jasne relacije doza-biološki odgovor na srednjim i visokim dozama jonizujućeg zračenja, ali se efekti malih doza još uvek određuju aproksimacijom efekata srednjih i visokih doza [1]. U naučnoj javnosti još uvek je aktuelna polemika o tome da li su efekti malih doza linearni, supralinearni ili superlinearni. Naši raniji radovi su pokazali da u uslovima in vivo izloženosti malim dozama jonizujućeg zračenja se ne stiče otpornost ili adaptacija na veće doze [2]. Podaci iz literature pokazuju da indukciju adaptivnog odgovora utiče nekoliko faktora: vremenski interval između adaptivne i »challenge« doze, faze ćelijskog ciklusa u kojoj je ćelija izložena ali da je možda najvažnija genetska predispozicija, jer postoje genotipovi kod kojih se na svim nivoima ćelijske organizacije zapaža aktiviranje obrambenih potencijala radi zaštite od nanetih ozleđa, kao i genotipovi kod kojih se obrambeni mehanizmi ne aktiviraju [3]. Jonizujuće zračenje je snažan oroz za čitav niz ćelijskih procesa, a svojim delovanjem izaziva čitav niz poremećaja u funkcionisanju ćelije: menja strukturu proteina plazma membrane, narušava komunikaciju ćelije sa spoljnom i unutrašnjom sredinom, utiče na funkciju enzima a pre svega deluje na genetički materijal jedra. Oštećenje genoma može izazvati ćelijsku smrt-nekrozom ili apoptozom. Nekroza je patološki proces praćen zapaljenjem, dok je apoptoza kontrolisan mehanizam eliminacije ozleđene ćelije. Apoptoza kao fiziološki proces kontrolisane eliminacije ćelija ima značajnu ulogu u održavanju tkivne homeostaze kao i u ćelijskom odgovoru na povredu ili genomsko

oštećenje. U ovom radu ispitan je udeo interfazne ćelijske smrti u biološkom odgovoru humanih leukocita na male doze jonizujućeg zračenja. Za ispitivanje odabrana je grupa radiologa, a pored hromozomskih aberacija i mikronukleusa flow-citometrijom je ispitan apoptotski potencijal leukocita. Ispitivana je medjusobna zavisnost navedenih parametara u izloženoj i odgovarajućoj kontrolnoj grupi.

MATERIJAL I METODE

Ispitanici: grupu profesionalno izloženih lica čini 38 radiologa prosečne starosti 39.5 godina sa 15.6 godina ekspozicionog radnog staža. U kontrolnoj grupi ispitan je 14 lekara sličnih godina i ekspozicionog radnog staža, koji ne rade u zoni jonizujućeg zračenja. Ispitivanja su obavljena u okviru redovnih periodičnih pregleda.

Metode: Za ispitivanje je korišćena heparinizirana venska krv. Uzorak svakog ispitanika podeljen je na dva alikvota; jedan od njih je ozračen izvorom gama zračenja ^{60}Co , dozom 2 Gy. Iz neozračenog alikvota ispitivana je učestalost hromozomskih aberacija klasičnom citogenetskom tehnikom, učestalost mikronukleusa i procenat leukocita u apoptozi. Iz ozračenih uzoraka ispitivana je radiosenzitivnost i apoptoza ozračenih leukocita. Metode kultivacije ćelija, analiza hromozomskih aberacija i radiosenzitivnost opisane su u našim ranijim radovima. Apoptoza je određivanja po metodi N.E. Crompton-a [4] merenjem kondenzacije DNK hipodiploidnim flow citometrijskim testom, bojenjem propidijum jodidom; identifikuju se hipodiploidne ćelije kod kojih je obojenost DNK na histogramu manja u odnosu na obojenost diploidnih. Hipodiploidni DNK histogram predstavlja populaciju ćelija u apoptozi. Dobijeni rezultati satistički su analizirani T-testom, korelacije između navedenih parametara ispitivane su Kolgomor-Smirnovim testom.

Tabela 1. Mikronukleusi, radiosenzitivnost i apoptoza leukocita u grupi profesionalaca sa pozitivnim nalazom hromozomskih aberacija

Br.	Hrom. aber.	God. star.	Procenat leukocita u apoptozi (neozračen uzorak)	Procenat leukocita u apoptozi (ozračen uzorak)	Bazalni nivo MN	Radio-senzitivnost	Br analiz. ćelija	Distribucija MN				
								0 MN	1 MN	2 MN	3MN	4MN
1	1	36	55	40.7	32	154	1444	1216	198	23	3	4
2	1	47	18.7	80.3	29	156	1082	912	140	30		
3	2	45	26.1	69.2	19	235	1316	1036	234	40	4	2
4	1	44	58	17.6	33	183	980	796	156	28		
5	1	54	59.3	40.2	40	164	1518	1234	262	20		2
6	2	49	53.5	56.9	41	145	690	584	86	18	2	
7	1	46	29.7	69.6	37	154	1021	850	150	19	1	1
8	1	32	55	69.5	30	208	1320	1063	207	43	7	
X		44.13 ±70	44.4 ±16.58	55.50 ±21.0	32.62 ±7.07	174.8 ±31.7						
R			-0.53 ^a	-0.34 ^b		-0.79 ^c						
				0.14 ^d								

R - koeficijent korelacije

a - korelacija bazalnog nivoa MN i procenta leukocita u apoptozi, negativna korelacija, statistički nije značajna,

b - korelacija bazalnog nivoa MN i procenta ozračenih leukocita u apoptozi, statistički nije značajna,

c - korelacija bazalnog nivoa MN i radiosenzitivnosti, negativna korelacija, statistički značajna ($p < 0.05$),

d - korelacija procenta ozračenih ćelija u apoptozi i radiosenzitivnosti

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati ispitivanja u grupi profesionalno izloženih lica predstavljani su na tabelama 1 i 2, a u kontrolnoj grupi na Tabeli 3.

Tabela 2. Mikronukleusi, radiosenzitivnost i apoptoza leukocita u grupi profesionalaca sa negativnim nalazom hromozomskih aberacija

Br	God	Procenat leukocita u apoptozi (neozračen uzorak)	Procenat leukocita u apoptozi (ozračen uzorak)	Bazalni nivo MN	Radio-senzitivnost	Broj analiz. ćelija	Distribucija MN							
							0 MN	1 MN	2 MN	3 MN	4 MN	5 MN	6 MN	7 MN
1	51	27.6	53.8	34	145	1472	1244	196	30		2			
2	53	52.9	69.6	32	201	966	784	148	32					2
3	47	70.7	40.8	9	203	1050	860	167	18	2	1	1	1	
4	38	33.8	60.9	13	205	916	744	148	20	4				
5	50	62.6	86.5	14	188	1276	1046	206	20	4				
6	52	10.9	82.8	18	206	1410	1145	216	47	2				
7	39	53.02	63.7	31	152	1076	906	147	20	3				
8	40	96.5	88.5	5	233	1225	997	174	46	6	2			
9	39	91	68.7	26	220	1293	1042	214	33	4				
10	42	87.5	61.5	26	194	1079	873	178	25	3				
11	46	80.2	70.3	27	180	772	628	130	12	2				
12	39	73.2	79.4	14	214	1251	1005	211	31	4				
13	48	44.7	65.3	20	224	1202	955	204	41	1	1			
14	52	67.2	94.4	20	199	1510	1212	270	24	4				
15	38	84.7	64.6	26	211	1274	1036	184	45	8	1			
16	36	68.8	90.1	26	156	1364	1128	228	6	2				
17	53	72.7	96.6	25	201	1348	1100	201	38	8	1			
18	40	47.6	92.4	20	230	986	780	168	36	2				
19	22	62.9	73.5	27	165	1200	1015	145	35	5				
20	24	60.7	95.3	29	151	1018	866	122	23	3	4			
21	47	73.8	63.4	23	177	1213	1018	158	29	7	1			
22	26	62.6	93.9	34	197	1073	876	153	37	7				
23	31	54.9	65.3	32	141	935	803	109	18	4	1			
24	20	73.02	94.4	20	155	864	737	105	20	2				
25	25	96.5	64.6	23	182	1140	947	158	31	3		1		
26	35	91	90.1	17	224	834	660	147	27					
27	23	87.5	96.6	18	180	304	260	32	8	4				
28	30	80.2	92.4	26	157	1257	1071	150	30	4	2			
29	37	73.2	73.5	21	131	830	732	76	16	6				
30	52	64.7	95.3	24	191	874	724	116	30	4				
X=39.2		68.88	77.6	22.66	187.10									
±10.3		±20.74	±15.69	±7.17	±28.69									
R		-0.17 ^a	0.11 ^d		-0.51 ^c									
		-0.23 ^b												

R - koeficijent korelacije

a - korelacija bazalnog nivoa MN i procenta leukocita u apoptozi, negativna korelacija, statistički nije značajna

b - korelacija bazalnog nivoa MN i procenta ozračenih leukocita u apoptozi, statistički nije značajna

c - korelacija bazalnog nivoa MN i radiosenzitivnosti, negativna korelacija, statistički značajna (p<0.05)

d - korelacija procenta ozračenih ćelija u apoptozi i radiosenzitivnosti

Tabela 3. Mikronukleusi, radiosenzitivnost i apoptoza leukocita u kontrolnoj grupi

Br	God.	Procenat leukocita u apoptozi (neozračen uzorak)	Procenat leukocita u apoptozi (ozračen uzorak)	Bazalni nivo MN	Radio-senzitivnost	Broj analiziranih ćelija	Distribucija MN				
							0 MN	1 MN	2 MN	3 MN	4 MN
1	39	80.6	84.9	23	158	1338	1184	164	34	6	
2	43	63.6	65.1	16	169	1017	863	123	28	3	
3	38	55.1	94.8	12	208	1384	1140	194	42	6	
4	47	54.05	64.6	14	176	1572	1314	216	36	6	
5	41	57.2	96.9	13	230	1422	1112	276	32	2	
6	37	94.6	64.7	14	214	1468	1160	282	26		
7	37	79.7	61.7	14	213	1404	1139	216	44	5	
8	33	95	85.8	9	175	676	560	108	8		
9	38	92.3	87.7	12	170	812	670	136	6		
10	30	86.8	89.9	18	154	640	544	84	10	2	
11	43	94.7	91.7	7	221	878	704	156	12	4	2
12	47	77.8	94.3	12	222	822	672	114	30	3	
13	45	66.5	91.6	17	252	1015	780	200	32	3	
14	33	92.1	78.7	11	170	972	808	152	12		
X=39.3 ±5		77.86 ±15.7	82.31 ±12.87	13.7 ±4	195.14 ±30.9						
R		-0.26a			0.28c						
		-0.15b			0.26e						

R-koeficijent korelacije

a -korelacija bazalnog nivoa MN i procenta leukocita u apoptozi, negativna korelacija, statistički nije značajna

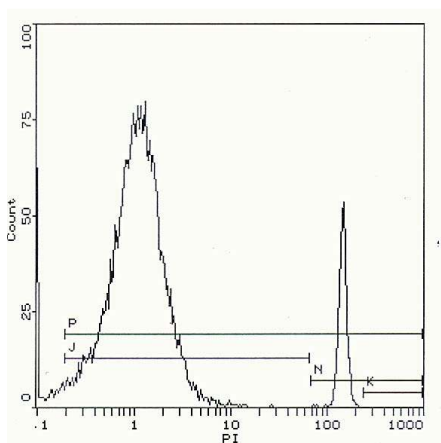
b- korelacija bazalnog nivoa MN i procenta ozračenih leukocita u apoptozi, statistički nije značajna

c- korelacija bazalnog nivoa MN i radiosenzitivnosti, negativna korelacija, statistički nije značajna

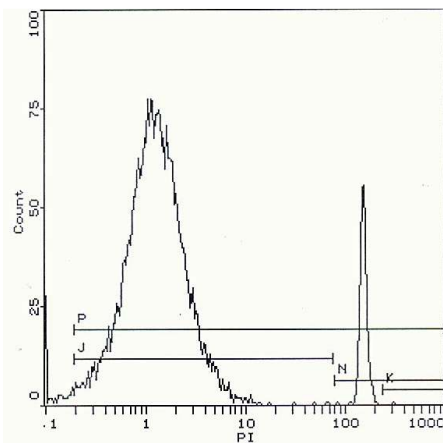
d- korelacija procenta ozračenih ćelija u apoptozi i radiosenzitivnosti

Bazalni nivo apoptoze u grupi profesionalno izloženih lica sa hromozomskim aberacijama u limfocitima iznosi 41 ± 20 i dvostruko je niži u odnosu na kontrolnu grupu (80 ± 16). Apoptoza i reproduktivna ćelijska smrt leukocita (merena incidencom mikronukleusa) kod profesionalno izloženih lica korelišu negativno ukazujući na poremećaj ravnoteže signalnih molekula koji regulišu fiziološki proces eliminacije oštećenih ćelija. S druge strane, u kontrolnoj grupi najniži nivo mikronukleusa praćen je najvišim bazalnim nivoom apoptoze. Bazalni nivo apoptoze leukocita, kao i bazalni nivo mikronukleusa pokazuje veliku individualnu varijabilnosti i međusobno negativno korelišu. Za razliku od neozračenih uzoraka gde se zapažaju statistički značajne razlike u procentu apoptotskih ćelija između svih analiziranih grupa, kod *in vitro* ozračenih uzoraka nije utvrđena značajna razlika u procentu leukocita u apoptozi, iako je najveći procenat indukovane apoptoze nadjen u kontrolnoj grupi, a najmanji u grupi sa pozitivnim nalazom hromozomskih aberacija. Budući da se radi o složenim procesima koji se odvijaju nepoznatom dinamikom, ovaj tip ispitivanja potrebno je nastaviti.

Grafik 1. Hipodiploidni citometrijski test u kontrolnoj grupi:

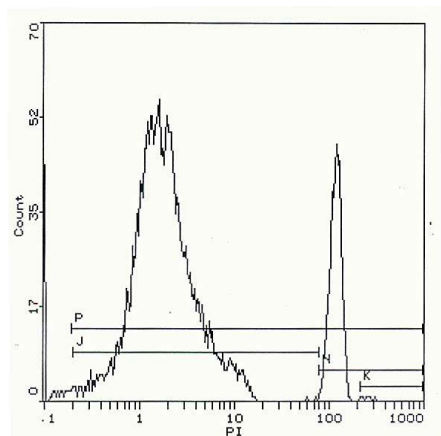


a - neozračeni uzorak

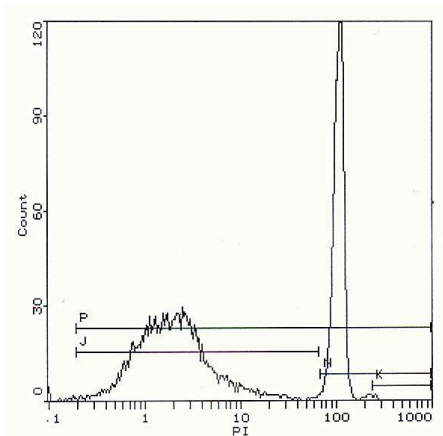


b - ozračeni uzorak

Grafik 1. Hipodiploidni citometrijski test u grupi profesionalaca sa pozitivnim nalazom hromozomskih aberacija:



a - neozračeni uzorak



b - ozračeni uzorak

LITERATURA

- [1] IAEA (1986) Biological dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment. Technical Report 260. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- [2] Radovanović, S., Stanković, M., Ilić, Ž., Joksić, G (2001) Radiosenzitivnost limfocita profesionalno izloženih lica. XXI Simpozijum Jugoslovenskog društva za zaštitu od jonizujućeg zračenja, Kladovo, 311-314.
- [3] Olivieri, G, Bodycote, J., Wolff, S. (1984) Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine, Science, 233:594-597.
- [4] Crompton, N.E.A., Ozsahin, M (1997) A versatile and rapid assay of radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes based on DNA and surface-marker assessment of cytotoxicity. Radiation Research, 147:55-60.

ABSTRACT

INCIDENCE OF MICRONUCLEI IN LYMPHOCYTES
DEPENDS OF APOPTOTIC POTENTIAL OF LEUCOCYTES

G. Joksić, S. Petrović, ¹B. Đurović
Vinča Institute of Nuclear Sciences, Belgrade,
¹Military Medical Academy, Belgrade

This study aimed to evaluate the portion of white blood cell dying via apoptosis in conditions of occupational exposure to ionizing radiation. For this purpose the group of radiologists were chosen. Besides chromosomal aberrations and micronuclei apoptosis was examined employing flow-cytometry. Relationship between those biological endpoints in exposed as well as in control group were evaluated. The results of this examination demonstrated significantly depressed apoptotic potential of leucocytes followed with significantly increase of micronucleated lymphocytes.