

**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 LICA PROFESIONALNO IZLOŽENIH JONIZUJUĆEM ZRAČENJU

B. Đurović, S. Petrović¹, D. Mirković, S. Tomanović
Institut za medicinu rada ZPM VMA,
¹Laboratorija za fizičku hemiju, INN Vinča

SADRŽAJ

Jedan od najpogodnijih testova za biodozimetriju u akcidentima, ispitivanje genotoksičnosti i radiosenzitivnosti je cytochalazin-B mikronucleus test zbog svoje jednostavnosti, osetljivosti i relativno niske cene. Cilj rada je da utvrdi da li profesionalna izloženost jonizujućem zračenju indukuje povećanje broja mikronukleusa. Istraživanjem je obuhvaćeno 77 medicinskih radnika, podeljenih na kontrolnu grupu (K) koju je činilo 33 ispitanika koji nisu izloženi JZ, i 44 ispitanika izloženih JZ (E), podeljene na dve podgrupe: eksponirane x-zračenju, (Ex) i eksponirane gama zračenju (En). Uzeti su podaci o načinu ishrane, navikama, zdravstvenom stanju. Grupe se nisu značajno razlikovale po polnoj distribuciji ($p=0.72$), starosti ($p=0.76$), navikama u ishrani, konzumiranju alkohola ($p=0.16$), pušenju ($p=0.73$) i ekspozicionom radnom stažu ($p=0.93$). Ispitanici obe grupe pregledani su u skladu sa Odlukom o stručnoj spremi i zdravstvenim uslovima ljudi koja rade sa izvorima jonizujućih zračenja (Sl. list SRJ 45/97). U laboratoriji za citogenetiku INN »Vinča« urađen je mikronucleus test po modifikovanoj metodi Fenech-a i Morley-a. Doza zračenja procenjena je na osnovu rezultata lične dozimetrije sprovedene kalibrisanim ličnim termoluminiscentnim dozimetrima (TLD) tipa $CaF_2:Mn$. Arterijska hipertenzija i katarakta su oboljenja značajno veće učestalosti u eksponiranih. Spontana učestalost MN značajno je veća u profesionalno izloženih lica ($31 \pm 10/1000BN$) u odnosu na kontrolnu grupu ($17 \pm 8/1000BN$) ($p=0.000$). Učestalost MN nešto je veća u žena, ali je razlika značajna samo između muškaraca grupa K i E ($p=0.0001$), kao i žena ($p=0.0002$). Povišena učestalost hromozomskih aberacija nije bila značajno povezana sa brojem mikronukleusa, iako je tvrđena značajna zavisnost učestalosti mikronukleusa od doza ($p=0.00022$) i trajanjem ekspozicionog radnog staža ($p=0.0000$). Pretpostavili smo to može biti posledica razlika u DNK reparativnim procesima i/ili antioksidativnoj odbrani, kao i apoptoznoj aktivnosti.

UVOD

Mikronucleusni test uveden je 1973 god. kao biomarker mutagenog potencijala novih lekova i hemijskih sredstava. Za ispitivanje humanih limfocita prvi put su ga koristili Countryman and Heddle 1976 god., a poboljšanje metode i uvođenje bloka citokineze uveli su Fenech i Morley 1985 god. Test se dokazao kao dobar za monitoring hromozomskih

oštećenja populacije pri ekspoziciji malim dozama različitih genotoksičnih agenasa, uključujući radiotoksične supstance ili ispitivanju radiosetljivosti. Jednostavnost izvođenja testa u kombinaciji sa statističkom pouzdanošću, postignutom analiziranjem čak hiljadu ćelija, učinili su ga opšte prihvaćenim.[1] Učestalost mikronukleusa (MN) u neekspoziranih je različita i zavisi od starosti, pola, životnih navika (pušenje, ishrana) i zdravstvenog stanja. Većina autora nalazi da je broj MN veći u žena 1.2-1.6 puta. [2] I pozitivno koreliran sa godinama. Porast broja MN sa godinama je značajniji u žena, ali je u obe grupe uočljivo da su najveće varijacije u starosnim grupama od 40-59 godina. te je MN indeks predložen za biomarker hronološke i biološke starosti. [3]

ISPITANICI I METODE

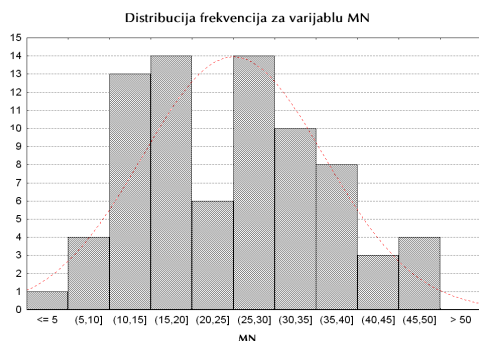
Istraživanjem je obuhvaćeno 25(32.47%) žena i 52(67.53%) muškarca.U kontrolnoj grupi (K), koju su činili medicinski radnici koji nisu izloženi JZ, bilo je 10 (30.30%) žena i 23 (69.70%) muškarca, a u grupi ispitanika izloženih JZ (E), bilo je 15 (34.10%) žena i 29 (65.90%) muškarca. Ispitanici grupe E podeljene su na dve podgrupe: ekspozirane x-zračenju, (Ex) I ekspozirane gama zračenju (En).

Ispitanici obe grupe pregledani su u skladu sa Odlukom o stručnoj spremi i zdravstvenim uslovima ljudi koja rade sa izvorima jonizujućih zračenja (Sl. list SRJ 45/97). U laboratoriji za citogenetiku INN »Vinča« uzorak periferne krvi (0.5 ml) zasejan je na 5ml podloge RPMI-1640, obogaćene sa 15 % fetalnog bovinog seruma. Limfociti su inkubirani na 37°C, a prethodno stimulisani na deobu dodavanjem 2.4µg/ml fitohemaglutinina-PHA(Wellcome). Da bi se obezbedila analiza mikronukleusa u prvoj deobi, modifikovana je klasična metoda citokinetičkog bloka Fenech i Morley-a, tako što je 44h kasnije dodat citohalazin B u koncentraciji 6µg/ml. Sedamdeset dva sata posle postavljanja kulture, centrifugiranjem su odvojene ćelije su dva puta isprane Heksovim rastvorom, a zatim tretirane 5min. u hipotonom rastvoru (0.56%KCl i 0.9% NaCl u jednakim zapreminama) i fiksirane u meta-nolu:sirćetnoj kiselini (3:1). Pločice su bojene po Giemsa-i i sušene na vazduhu. Učestalost mikronukleusa analizirana je na 1000 binuklearnih ćelija prema važećim kriterijumima Countrymann-a i Henddle-a i Fenech-a i Morley-a. Svi preparati su postavljeni u dva primerka. Za analizu je korišćen mikroskop firme Zeiss pri uveličanju od 400 ili 1000 puta kada je to bilo potrebno. [4] Sva merenja sprovedena su kalibrisanim ličnim termoluminiscentnim dozimetrima (TLD) tipa CaF₂:Mn.

REZULTATI I DISKUSIJA

Starost ispitanika bila je 43.35±6.017 god.(32-55 god) bez značajne razlike (p=0.76). Ispitanici obe grupe rade u istim uslovima kondicioniranog vazduha. Prema dobijenim anamnestičkim podacima nije bilo naslednih bolesti koje bi mogle značajno da utiču na rezultate istraživanja. Nisu registrovani ispitanici koje se po načinu ishrane značajno razlikuju. Supstitucija vitamina i minerala je u nekih ispitanika bila kratkotrajna i sporadična, tako da po dozama i trajanju nije od značaja Ispitanici nisu bili izlagani JZ u dijagnostičke svrhe, niti su uzimali medikamente koji bi, mogli značajno da utiču na rezultate citogenetskih ili biohemijskih testova. Nije bilo značajnih razlika u broju konzumenata alkohola (p=0.16) I duvana, kako po broju (p=0.73), tako i po broju dnevno konzumiranih cigareta (p=0.52) i trajanju pušačkog staža (p=0.98).

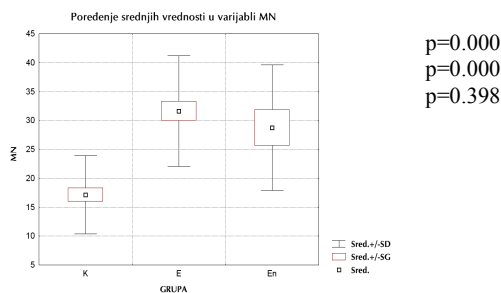
Arterijska hipertenzija i katarakta su oboljenja značajno veće učestalosti u eksponiranih. Vrednosti parametara standardnih laboratorijskih analiza značajno se razlikuju samo za: broj limfocita ($p=0.02^*$), albumine ($p=0.00^*$) i ukupni bilirubin ($p=0.00^*$). Iako su razlike srednjih vrednosti navedenih parametara statistički značajne, one su u okviru fizioloških za sve ispitivane grupe. Razlika srednjih vrednosti doza Ex i En je statistički visoko značajna u svim posmatranim godinama ($p=0.00$ do 0.02), ali su obe grupe znatno ispod maksimalno dopustivih. Srednja vrednost ekspozicionog radnog staža iznosi 15.00 ± 5.96 god za Ex i 14.91 ± 5.21 god za En, što nije značajna razlika ($p=0.93$). U ispitivanom uzorku je registrovana srednja vrednost od 25 ± 11 MN/1000BN. Registrovani rezultati su se kretali od 5-50 MN/1000BN. (Slika 1)



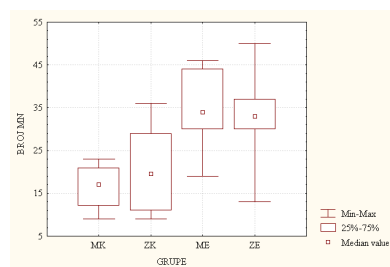
Slika 1. Broj MN

U grupama K, E, Ex i En registrovane su srednje vrednosti od 17 ± 8 , 31 ± 10 , 32 ± 10 i 29 ± 11 MN/1000BN respektivno. Razlika srednjih vrednosti broja mikronukleusa između grupa K i E bila je statistički visoko značajna ($p=0.000^{**}$), kao i između grupe K i podgrupe Ex i En ($p=0.000^{**}$). (Sl. 2.)

Bazična učestalost MN iznosila je 15.56 ± 4.43 za muškarce grupe K i 19.80 ± 9.34 za žene grupe K, što nije imalo statistički značaj ($p=0.34$). Ni u grupi E nije bilo značajnih razlika, jer je učestalost MN za muškarce iznosila 33.39130 ± 7.744436 i 33.2000 ± 9.271222 za žene ($p=0.64$). Istovremeno postoji veoma značajna razlika između muškaraca ispitivanih grupa ($p=0.0001$), i između žena E i K grupe ($p=0.0002$) (Sl. 3.) Našim istraživanjem nije potvrđen značajan uticaj pušenja na spontanu učestalost mikronukleusa ($p=0.20$), iako neka istraživanja na to ukazuju [5].



Slika 2. Razlike srednjih vrednosti broja MN



Slika 3. Učestalost MN-distribucija po polu

Uočljiva je povišena spontana učestalost mikronukleusa ispitanika grupe K za naše uslove. Naime, pre 1999 godine spontana učestalost MN odraslih stanovnika naše teritorije iznosila je 9 ± 3 za žene i 7 ± 2 za muškarce. U periodu 1999-2000 godine iznosila je 28 ± 3 za žene i 24 ± 3 za muškarce. Procenjuje se da bi ova razlika mogla biti posledica hemijskih zagađenja životne sredine uzrokovanih ratnim dejstvima. [6] Utvrđena je značajnu zavisnost učestalosti mikronukleusa od doza ($p=0.00022$), i trajanjem ekspozicionog radnog staža ($p=0.0000$). U našem istraživanju povišena učestalost hromozomskih aberacija nije bila značajno povezana sa brojem mikronukleusa. Pretpostavili smo to može biti posledica razlika u DNK reparativnim procesima i/ili antioksidativnoj odbrani i apoptoznoj aktivnosti.

LITERATURA

- [1] Peace BE, Succop P. Spontaneous micronucleus frequency and age: what are normal values?, Mutation Research 1999; 425: 225-230.
- [2] Streffer C, Muller W-U, Kryscio A, Bocker W. Micronuclei-biological indicator for retrospective dosimetry after exposure to ionizing radiation, Mutation Research 1998; 404: 101-105
- [3] Fenech M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations, Mutation Research 1998; 404: 155-165.
- [4] Fenech M. The in vitro micronucleus technique, Mutation Research 2000; 455: 81-95.
- [5] DiGeorgio M, Nasazzi N, Heredia LM. Influence of Age, Sex and Life Style Factors on the Spontaneous and Radiation Induced Micronuclei Frequencies. Proceedings of Ninth International Congress of the International Radiation Protection Association; 1996 April 14-19; Vienna, 1996; Vol 3:89-91.
- [6] G.Joksić, A.Petrović-Novak, M.Stanković and M.Kovačević Radiosensitivity of human lymphocytes in vitro correlates more with proliferative ability of cells than with the incidence of radiation-induced damages of the genome. Neoplasma 1999; 46(1): 40-49.

ABSTRACT

MICRONUCLEI FREQUENCY IN MEDICAL WORKERS OCCUPATIONALLY EXPOSED TO IONIZING RADIATION

B. Đurović, S. Petrović¹, D. Mirković, S. Tomanović
Occupational Medicine Institute, Military Medical Academy,
¹ Vinca Institute for Nuclear Sciences

One of the most suitable tests for accidental biodosimetry, examining genotoxicity and radio sensitivity is cytochalazin-B micronucleus test because of its

simplicity, sensitivity and low price comparing with other cytogenetic tests. The aim of this study is to investigate if occupational radiation exposures induce higher micronuclei score.

Investigation comprised 77 medical workers on their routine yearly medical exam, 44 occupationally exposed to ionizing radiation (E), divided in two subgroups-exposed to x-rays (Ex) or gamma rays (En) and 33 controls (K). Informed consent and questionnaire containing dietary, habits, medical factors and exposure history were taken. Groups were matched in gender ($p=0.72538$), age ($p=0.76839$), habits - dietary, alcohol consumption ($p=0.1653$), smoking ($p=0.738$) and specific exposure time ($p=0.9367$).

Radiation dose accumulated by occupationally exposed over years was calculated on the basis of individual TL-dose records and multiplied with exposure time.

Micronuclei analysis was carried out on cultures of phytohaemagglutinin-stimulated blood lymphocytes (Wellcome, 2.4 $\mu\text{g/ml}$). Peripheral blood samples (0.5 ml) were cultured in 5ml RPMI-1640 medium supplemented with 15% calf serum at 37°C. At $t=44$ h Cytolalazin B was added at a final concentration of 6 $\mu\text{g/ml}$ to induce binuclear cell formation. At $t=72$ h, cells were spun down, the medium removed and the cells were washed using Henk' s basic salt solution. The cells were fixed in methanol: acetic acid (3:1) after 5min of mild hypotonic treatment (0.56% KCl + 0.9% NaCl in equal volumes). Slides were air-dried and stained in alkaline Giemsa (2%). Slides for each donor were coded and duplicates of 1000 binucleated cells were examined for micronuclei by same experienced cytogenetics. Criteria set by Countyman and Heddle (LIT) and Fenech and Morley (LIT) were applied for micronuclei identification.

The average frequency of micronuclei was significantly increased in occupationally exposed $31\pm 10/1000\text{BN}$ versus controls $17\pm 8/1000\text{BN}$ ($p=0.000$). There was statistically significantly higher micronuclei incidence increased in men ($p=0.0001$) and women ($p=0.0002$) of exposed versus the same gender controls.

Micronuclei score was not highly correlated with chromosomal aberration score, even it was highly correlated with doses ($p=0.00022$) and specific exposure time ($p=0.0000$). We supposed it could be the consequence of DNA-repair, antioxidative defense and apoptotic activity.