

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Јелена Р. Пајић

МАРКЕРИ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ У ХУМАНИМ ЛИМФОЦИТИМА
ПЕРИФЕРНЕ КРВИ КАО ПОКАЗАТЕЉИ ИНТЕР-ИНДИВИДУАЛНЕ
ВАРИЈАБИЛНОСТИ У ОДГОВОРУ НА ДЕЛОВАЊЕ ЈОНИЗУЈУЋЕГ ЗРАЧЕЊА

докторска дисертација

Београд, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Jelena R. Pajić

GENOTOXICITY MARKERS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD
LYMPHOCYTES AS INDICATORS OF INTER-INDIVIDUAL VARIABILITY IN
RESPONSE TO IONIZING RADIATION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Ментор: проф. др Александар П.С. Миловановић, редовни професор катедре Медицина рада Медицинског факултета Универзитета у Београду

Коментор: проф. др Ивана Новаковић, редовни професор катедре Хумана генетика Медицинског факултета Универзитета у Београду

Комисија:

1. Проф. др Вера Буњевачки, редовни професор Медицинског факултета у Београду, научна област: хумана генетика
2. Проф. др Иванка Марковић, редовни професор Медицинског факултета у Београду, научна област: биохемија
3. Проф. др Дубравка Јовичић, редовни професор Факултета за примењену екологију „Футура“, Универзитет Сингидунум, Београд, научна област: екогенотоксикологија и генотоксични агенси животне средине

“Ко је пронашао пријатеља, пронашао је благо” Менандар

*Ова дисертација угледала је светлост дана захваљујући пријатељима:
др Браниславу Ровчанину, проф. др Дубравки Јовичић, Бобану Ракићу, проф. др
Јовану Станковићу, доц др Весни Пајић, др Душану Кекићу, физичарима из
Института за онкологију и радиологију Србије и мојим драгим колегама из
Института за медицину рада Србије, учесницима у овом истраживању.*

*Посебну захвалност дугујем члановима комисије: проф. др Вери Буњевачки и
проф. др Иванки Марковић, на сугестијама, саветима и драгоцену помоћу.*

*Проф. др Ивани Новаковић, коментору, хвала за стрпљење, подстрек, подршку,
благост и изузетну стручну помоћ у изради дисертације.*

*Мојим најдражима – Богдану, Душану, Александри и Миленки хвала што су били
уз мене кад је било најлепше и најтеже.*

*Највећу захвалност дугујем ментору, проф. др Александру Миловановићу, који је
остварио мој највећи сан и родитељима, који су ме научили да у животу увек
идем најкраћим путем до победе.*

Посвећено Миленки и Радомиру

МАРКЕРИ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ У ХУМАНИМ ЛИМФОЦИТИМА
ПЕРИФЕРНЕ КРВИ КАО ПОКАЗАТЕЉИ ИНТЕР-ИНДИВИДУАЛНЕ
ВАРИЈАБИЛНОСТИ У ОДГОВОРУ НА ДЕЛОВАЊЕ ЈОНИЗУЈУЋЕГ ЗРАЧЕЊА

Резиме:

Досадашња истраживања: Јонизујућа зрачења у контакту са живом материјом изазивају оштећења биомолекула. Биолошки маркери експозиције и ефекта озрачивања (хромозомске аберације и микронуклеуси) и репаративни капацитети (способност поправке зрачењем индукованих оштећења), испитивани су у досадашњим истраживањима у евалуацији индивидуалне радиосензитивности *in vitro*. Како је један од узрочника оштећења молекула ДНК дејством јонизујућег зрачења и настанак слободних радикала, циљ овог истраживања био је утврђивање утицаја параметара оксидативног стреса, антиоксидантног одговора и оксидативног статуса испитаника, на учесталост цитогенетичких биомаркера деловања зрачења у лимфоцитима периферне крви и испитивање корелације између формирања две врсте биомаркера.

Метод: Истраживање је обухватило анализу узорака крви 56 испитаника-донора на постојање цитогенетички видљивих промена генетичког материјала и биохемијски потврђених промена у вредностима параметара оксидативног стреса, у одговору на деловање три различите апликоване дозе зрачења у односу на неозрачене узорке.

Резултати: У истраживању је анализирано укупно 103 цитогенетичка и биохемијска параметра на 4 дозе зрачења (0, 0.75, 1.5 и 3 Gy). Резултати су показали постојање интер-индивидуалне варијабилности у свим анализираним параметрима, на свим дозама зрачења, као и дозно-зависно формирање свих параметара, уз издвајање две групе: прве-која обухвата скоро све анализиране параметре и која се карактерише повећањем вредности са порастом дозе и друге, која се карактерише смањењем вредности са порастом дозе, а обухвата само један параметар-тотални антиоксидантни статус. За појединачне параметре, корелациона анализа показала је, на свакој од апликованих доза зрачења, одсуство корелација дицентричних хромозома и микронуклеуса са биохемијским параметрима. Међутим, корелациона анализа параметара који говоре о

свеукупном одговору донора, израженом кроз однос између броја „Н“ вредности и укупног броја мерења (*H-response ratio* - „HRR“ параметар) потврдила је налазе Т-теста – донори лошијег антиоксидантног статуса, показали су већи степен цитогенетичких оштећења и бурније одговорили на озрачивање. Насупрот њима, група донора са бољом антиоксидантном заштитом, показала је нижи одговор на зрачење од очекиваног при датој дози.

Закључак: Резултати добијени у овој студији показали су да поред добро проучених и бројним истраживањима валидованих дицентрика и микронуклеуса, и параметри оксидативног статуса могу, у рутинској пракси радиолошке здравствене заштите, употпунити профил одговора на континуирану експозицију малим дозама, али и реакцију на нежељена, но ипак присутна, инцидентална/акцидентална озрачивања у примени извора јонизујућих зрачења.

Кључне речи: јонизујуће зрачење, дицентрични хромозоми, микронуклеуси, оксидативни стрес, антиоксидантни одговор, оксидативни статус.

Научна област: медицина; **Ужа научна област:** молекуларна медицина

GENOTOXICITY MARKERS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD
LYMPHOCYTES AS INDICATORS OF INTER-INDIVIDUAL VARIABILITY IN
RESPONSE TO IONIZING RADIATION

Abstract

Background: Ionizing radiation in living cells can directly act on atomic structures, producing damage to biomolecules. Earlier investigations evaluating individual radiosensitivity *in vitro* were focused on biomarkers of exposure and effect (chromosomal aberrations and micronuclei) as well as reparative capacity. Since ionizing radiation can also cause oxidative damage and produce reactive oxygen species, the main goal of this investigation was to establish the influence of parameters of oxidative status and oxidative damage on chromosomal aberrations and micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes from donors and to examine possible correlations.

Method: Blood samples from fifty six health male and female donors were irradiated with four different doses (0, 0.75, 1.5 and 3 Gy) and then analyzed cytogenetically and biochemically.

Results: A total of 103 cytogenetic and biochemical parameters were evaluated. The results showed significant inter-individual variability in all analyzed parameters, as well as dose-dependent increases of almost all of them, except for total antioxidant status, which exhibited a dose-dependent decrease. Correlation analysis indicated no association between cytogenetic radiation biomarkers (chromosomal aberrations and micronuclei) and biochemical oxidative stress parameters. However, findings for overall response („HRR“ parameters) confirmed the t-test analysis, i.e. donors with lower values for antioxidant status parameters had increased levels of cytogenetic damage and higher responses to irradiation. Unlike them, the group of donors with better antioxidative protection showed a lower response than expected.

Conclusion: Besides well established cytogenetic biomarkers of radiation exposure, our results indicated a promising future use for biochemical oxidative status parameters in routine radiation protection practice, since together they can provide a complete radiation response profile in cases of continuous low dose exposure, as well as in a radiation emergency.

Key words: ionizing radiation, dicentric chromosomes, micronuclei, oxidative stress, antioxidative response, oxidative status

Scientific area: medicine- molecular medicine

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1 Временски редослед фаза у ћелији након озрачивања	5
1.1.1 Фаза физичких процеса	6
1.1.2 Фаза физичко-хемијских и хемијских процеса	6
1.1.3 Фаза биолошких процеса	9
1.1.3.1 Дејство зрачења на ћелијску мембрану	9
1.1.3.2 Дејство зрачења на генетички материјал	10
1.2 Биодозиметрија и радиолошка здравствена заштита	16
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	18
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	19
3.1 Селекција испитаника	19
3.2 Опште карактеристике испитиване популације	20
3.3 Узорковање крви и озрачивање	24
3.4 Цитогенетичке методе	25
3.4.1 Дицентрик тест	25
3.4.2 CBMN тест	26
3.5 Биохемијске методе	29
3.5.1 Одређивање концентрације протеина у плазми	29
3.5.2 Спектрофотометријско одређивање активности супероксид – дисмугазе (SOD)	29
3.5.3 Одређивање тоталног оксидативног статуса (TOS)	29
3.5.4 Одређивање тоталног антиоксидантног статуса (TAS)	30
3.5.5 Одређивање садржаја завршних оксидативних продуката протеина (AOPP)	30
3.5.6 Одређивање укупног садржаја липидних пероксида у плазми	31
3.5.7 Одређивање укупне активности каталазе (CAT) у плазми	31
3.6 Статистичка анализа	32

4. РЕЗУЛТАТИ	34
4.1 Утврђивање интер-индивидуалне варијабилности у одговору на зрачење праћењем појаве цитогенетичких биомаркера у функцији апликоване дозе кроз формирање дозно-зависних крива	34
4.1.1 Анализа учесталости цитогенетичких параметара у односу на пол, навику конзумирања цигарета и животне навике испитаника	34
4.1.2 Анализа учесталости цитогенетичких параметара у односу на апликовану дозу зрачења	37
4.2 Одређивање показатеља оксидативног статуса и утврђивање интер-индивидуалне варијабилности у одговору на зрачење	46
4.2.1 Параметри оксидативног стреса и антиоксидантног одговора (MDA, SOD, CAT, AOPP)	46
4.2.1.1 Анализа вредности параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора у односу на пол, навику конзумирања цигарета и животне навике испитаника	46
4.2.1.2 Анализа вредности параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора у односу на апликовану дозу зрачења	49
4.2.2 Параметри оксидативног статуса (TOS, TAS, IOS)	60
4.2.2.1 Анализа вредности параметара оксидативног статуса у односу на пол, навику конзумирања цигарета и животне навике испитаника	60
4.2.2.2 Анализа вредности параметара оксидативног статуса у односу на апликовану дозу зрачења	61
4.3 Утврђивање корелације цитогенетичких биомаркера деловања јонизујућег зрачења и показатеља оксидативног статуса у функцији апликоване дозе зрачења	70
4.3.1 Повезаност свих испитиваних параметара на дози од 0 Gy	70
4.3.2 Повезаност свих испитиваних параметара на дози од 0.75 Gy	72
4.3.3 Повезаност свих испитиваних параметара на дози од 1.5 Gy	73
4.3.4 Повезаност свих испитиваних параметара на дози од 3 Gy	74
4.4 Параметар „HRR“. Интер-индивидуална варијабилност у одговору на зрачење	75

4.4.1 Повезаност HRR параметара	78
4.5 Дозно-зависне криве – криве које описују одговор на зрачење	80
4.5.1 Дозно-зависни одговор изражен учесталошћу цитогенетичких параметара	80
4.5.2 Дозно-зависни одговор изражен концентрацијом биохемијских параметара MDA, AOPP, SOD, CAT	82
4.5.3 Дозно-зависни одговор изражен вредностима биохемијских параметара TOS, TAS, IOS	87
4.6 Коефицијент варијације – групна варијабилност у одговору на зрачење	91
5. ДИСКУСИЈА	96
6. ЗАКЉУЧЦИ	115
7. РЕФЕРЕНЦЕ	116

1. УВОД

Јонизујуће зрачење (ЈЗ) је електромагнетно или честично зрачење које може да изазове јонизацију материје кроз коју пролази, било директним дејством на саму материју, било дејством настале секундарне радијације. Јонизацију материје може да изазове пролаз брзих наелектрисаних честица, пролаз електромагнетног X и γ -зрачења, као и неутронско зрачење. Према особинама јонизујућа зрачења деле се на електромагнетна и честична (корпускуларна). У прву групу спадају γ - и рендгентско зрачење, а у другу: монохроматско енергетско зрачење, α -, β -, протонско, неутронско и јонска зрачења. Условно узевши, ултраљубичасто зрачење се може сврстати у јонизујуће, због тога што може изазвати јонизацију молекула и атома у појединим кристалима¹.

Људски организам је континуирано изложен јонизујућем зрачењу природног порекла. Више од 80% излагања потиче од природних извора (космичко зрачење, зрачење из земљишта, ваздуха, воде, хране, биљака, животиња, људског организма)¹. Поред природне радијације, излагање може бити и резултат хуманих активности. Ова тзв. вештачка излагања подразумевају излагања у медицинске сврхе (радиодијагностика и радиотерапија), као и излагања зрачењима пореклом од индустријских извора, нуклеарних електрана, падавина итд. Слика 1 приказује релативни удео појединих видова излагања природним и вештачким изворима зрачења на нивоу светске популације.



Слика 1. Релативни удео појединих видова излагања природним и вештачким изворима зрачења на нивоу светске популације

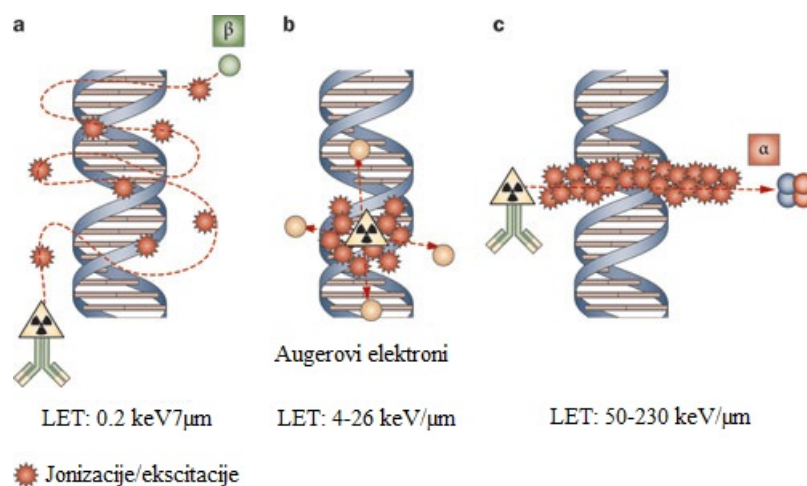
(Извор: Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, National Research Council Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: BEIR VII – Phase 2, 2006, ISBN: 978-0-309-09156-5)

Милијарду година пре открића радиоактивности природа је предухитрила човека у њеној примени, али у којој мери је природна радиоактивност одиграла улогу у еволуцији и развоју живота на Земљи, у овом тренутку није потпуно разјашњено. Са открићем рендгентских зрака и радиоактивности, касних година XIX века, запажено је да јонизујуће зрачење интерагује са живом материјом изазивајући оштећења живих система.

Механизам настанка оштећења биомолекула под утицајем зрачења повезан је са иницијалним догађајима јонизације и предаје енергије јонизујуће честице атомима и молекулима средине кроз коју зрачење пролази². Линеарни енергетски трансфер (ЛЕТ) представља предату енергију упадног снопа јонизујућег зрачења материји по дужини пређеног пута $(-ΔE/Δx)^{2,3}$. Стварна брзина губитка енергије наелектрисане честице није константна величина и расте како њена енергија опада, па се због тога ЛЕТ дефинише као просечна вредност губитка енергије на трагу честице^{2,3}.

У контексту проучавања дејства зрачења на биолошке системе веома је важно дефинисати количину енергије депоноване по јединици путање (ЛЕТ), јер ова карактеристика одређује ефикасност различитих квалитета зрачења у индукцији биолошких последица.

У том смислу разликујемо зрачења ниског ЛЕТ-а (X и γ -зрачење) који се одликују великом продорношћу и, следствено, депозицијом мале количине енергије по јединици путање, што се на биолошке системе одражава мањим оштећењима већег броја ћелија³. Насупрот њима, зрачења високог ЛЕТ-а (α -честице, протони) предају већу количину енергије по јединици пута, те ће ћелије које им се нађу на путањи претрпети мултипла оштећења³. Слика 2 приказује типове оштећења молекула ДНК узроковане зрачењем различитог линеарног енергетског трансфера.



Слика 2. Типови оштећења молекула ДНК узроковани зрачењем различитог линеарног енергетског трансфера

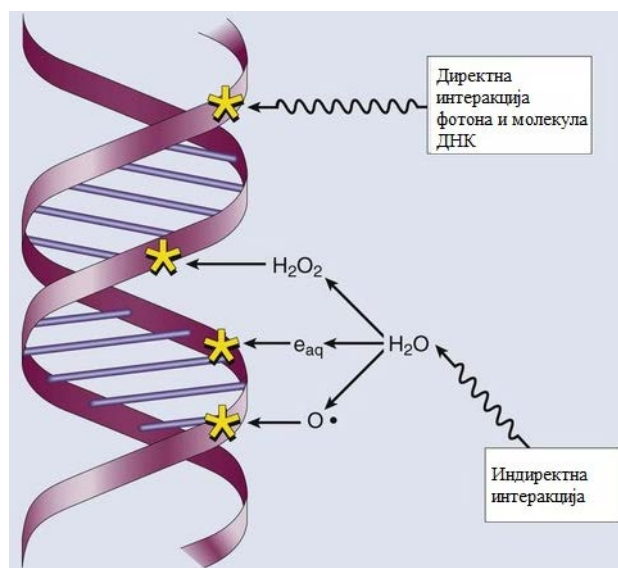
(Извор: Pouget JP, Navarro-Teulon I, Bardiès M, Chouin N, Cartron G, Pèlegriin A, Azria D. Clinical radioimmunotherapy—the role of radiobiology. Nature Reviews Clinical Oncology. 2011. 8: 720-734.)

Ефективност различитих типова зрачења у индукцији одређених биолошких последица означена је као релативна биолошка ефикасност (РБЕ)³. РБЕ се дефинише као однос дозе референтног зрачења (обично ортоволтажног X-зрачења) и дозе проучаваног типа зрачења, а која даје исти биолошки ефекат³. Релативна биолошка ефикасност узрок је и разлика у дозно-зависним кривама које описују одговор на озрачивање: за зрачења ниског ЛЕТ-а одговор се описује

линеарно-квadratним моделом; одговор на зрачења високог ЛЕТ-а биће линеаран или близак линеарном³.

Процеси јонизације имају велики утицај на физичко, хемијско и биолошко стање материје, јер је предата енергија довољно велика да може да изазове и раскидање веза у молекулима, при чему настају слободни радикали.

Са аспекта медицинске примене јонизујућих зрачења и радиолошке заштите, принципијелно посматрајући, постоје два типа интеракције јонизујућег зрачења и биолошког система: директна (на биолошки активан молекул) и индиректна (преко продуката радиолитске присутних хемијских једињења, чија је концентрација доминантна)²⁻⁴. Не искључује се и истовремена појава оба дејства, што биолошки одговор на зрачење чини комплексним и често непредвидивим^{3,4}. Релативни удео ових механизма на укупан ефекат зрачења на ћелију одређен је условима озрачивања, величином апсорбоване дозе зрачења, карактеристикама грађе ћелије и њеним метаболизмом². Слика 3 представља шематизован приказ директних и индиректних интеракција зрачења са молекулом ДНК.



Слика 3. Шематизован приказ директних и индиректних интеракција зрачења са молекулом ДНК

(Извор: Zeman EM, Schreiber EC, Tepper JE. Basics of Radiation Therapy. Published online 03.04.2015.)

Људски организам чини око 10^{14} ћелија, од којих свака представља високо организован и активно метаболишући систем. Пошто је ћелија основна градивна и функционална јединица живих организама, ефекти зрачења приписују се пре свега цитолошким променама.

1.1 Временски редослед фаза у ћелији након озрачивања

Да би се могло утицати на ток и могући исход дејства јонизујућих зрачења неопходно је познавати карактер, временски редослед и узрочну условљеност основних процеса који се одвијају у озраченој ћелији^{2,3}. Након излагања организма јонизујућем зрачењу следе 4 фазе различитог трајања које укључују међусобно повезане процесе. Физички процеси у ћелији реда су пикосекунде, физичко-хемијски и хемијски процеси трају приближно једну милисекунду, док биолошки процеси трају часовима, данима или месецима уколико за последицу имају смрт ћелије, године су неопходне за канцерогенезу, а генерације за појаву наследних ефеката^{2,3}.

У Табели 1 дат је приказ догађаја приликом интеракције јонизујућих зрачења и живе материје.

Табела 1. Временска скала догађаја приликом интеракције јонизујућих зрачења и живе материје

Време (s)	Догађај
10^{-18}	Зрачење путује од места настанка до молекула
10^{-15}	Интервал између узастопних јонизација
10^{-14}	Пренос енергије на вибрацију у молекулима, дисоцијација молекула, настанак слободних радикала и почетак јон-молекулских реакција
10^{-12}	Почетак дифузије насталих радикала
10^{-11}	Настанак солватисаног електрона
10^{-8}	Настанак нових молекула
10^{-5}	Захват радикала од стране “хватача”
1	Већина хемијских реакција је завршена
>1	У биолошким системима пост ирадијационе реакције могу да се наставе тј. продуже и на неколико дана/сати/недеља по озрачивању.

(Извор: Stanković J, Milošević N: *Osnovi radiološke fizike*, ISBN 978-86-909707-0-4, Beograd. 2007)

1.1.1 Фаза физичких процеса

У првој фази физичких процеса као резултат дејства зрачења и предаје енергије настају молекули “богати енергијом” (ексцитовани или јонизовани молекули). Како вода чини више од 60% садржаја ћелије, дејством зрачења на ћелију долази пре свега до радиоллизе воде, што за последицу има стварање више различитих производа радиоллизе (јона и слободних радикала):

Јонизација молекула воде: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{енергија зрачења} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$

Ексцитација молекула воде: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{енергија зрачења} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^* \rightarrow \text{H}\cdot + \text{OH}\cdot$

1.1.2 Фаза физичко-хемијских и хемијских процеса

У другој фази физичко-хемијских и хемијских процеса, нестабилни примарни продукти, односно слободни радикали, јони и молекули, настали као крајњи продукти ексцитације и јонизације, веома брзо дифундују са места настанка и међусобном реакцијом и реакцијом са осталим молекулима у ћелији производе секундарне продукте: стабилне молекуле, али и хемијски реактивне краткоживеће слободне радикале, који узрокују оксидативна оштећења биомолекула. У присуству кисеоника јонизујуће зрачење доводи до стварања реактивних кисеоничних (РОС) и реактивних азотних радикала (РНС)⁴. Реактивни кисеонични радикали се константно стварају у аеробним ћелијама електрон-транспортним процесима у току нормалног ћелијског оксидативног метаболизма⁴, али је њихово деловање лимитирано присуством антиоксиданаса – ензимских молекула који их деактивирају. Међутим, дејством јонизујућих зрачења настају РОС/РНС у знатно већем броју, па је потпуно инактивишуће дејство ензима онемогућено. Стање у коме настанак слободних радикала и реактивних интермедијера превазилази капацитет ћелијског заштитног система да их неутралише и елиминише означено је као оксидативни стрес⁵⁻⁸.

У дијапазону ниских доза зрачења, број радикала брзо расте са увећањем дозе, а у области високих доза зрачења знатно спорије, вероватно као последица рекомбинације радикала који се јављају у великом броју при већим дозама зрачења^{2,3}. Секундарни продукти брзо реагују са осталим молекулима у ћелији

доводећи до структурних и функционалних измена у њима. Биолошки најважнији РОС/РНС укључују супероксид ($O_2^{\bullet-}$), водоник-пероксид (H_2O_2), хидрокси радикал ($\bullet OH$) и азот-оксид ($\bullet NO$). Азот оксид се синтетише у ензимској реакцији од L-аргинина помоћу NO синтазе и не реагује са већином биомолекула⁴. Хумане ћелије развиле су антиоксидантне системе заштите од слободних радикала⁸. Ови системи укључују неке антиоксиданте створене у организму (ендогене), али и неке који се у организам уносе исхраном (егзогене). Антиоксидантни ензимски заштитни систем чине: супероксид-дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPx), други глутатиону сродни ензимски системи (глутатион S трансфераза (GST) и глутаредоксин (Grx)), пероксиредоксини (Prx), тиоредоксин редуктаза (TrxR), који метаболишу супероксид, водоник-пероксид и липидне пероксиде спречавајући у највећој мери формирање токсичног хидрокси радикала ($OH\bullet$). Неензимску одбрану чине глутатион (GSH), хистидин – пептиди, гвожђе – везујући протеини: трансферин и феритин, дихидролипоична киселина, мелатонин, урат и плазма протеини тиоли^{9,10}.

Најважнији РОС/РНС, ензими антиоксидантне заштите и продукти инактивације приказани су у Табели 2.

Табела 2. Најважнији РОС/РНС и њихов метаболизам

Слободни радикал	Извор	Одбрамбени ензим	Продукти
Кисеоник (O ₂) Singlet кисеоник ¹ O ₂	Екситована форма кисеоника у којој један од електрона прелази на виши енергетски ниво по апсорпцији енергије		
Супероксид (O ₂ ^{•-})	Губитак електрона из електрон – транспортног ланца. Ксантин оксидаза Флавоензими	Супероксид дисмутаза (SOD)	H ₂ O ₂ +O ₂
Водоник пероксид (H ₂ O ₂)	Од O ₂ ^{•-} помоћу SOD NADP оксидаза Глукозо-оксидаза Ксантин оксидаза	Глутатион (GSH) Пероксидаза Каталаза (CAT) Пероксиредоксин (Prx)	H ₂ O+GSSG H ₂ O + O ₂ H ₂ O
Хидрокси радикал (•OH)	Од O ₂ ^{•-} и H ₂ O ₂ преко транзиционих метала (Fe, Cu)		
Азот оксид (NO)	NO синтаза	GSH/тиоредоксин редуктаза (TrxR)	GSNO

(Извор: Lehnert, Shirley. Biomolecular action of ionizing radiation. Series in medical physics and biomedical engineering. ISBN-13: 978-0-7503-0824-3. CRC Press. Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487-2742)

Рана истраживања оксидативног стреса у одговору на зрачење указала су на значај супероксид дисмутазе у смањењу односа слободних радикала и заштити од леталних ефеката¹¹⁻¹³. Скорашње студије показале су да експозиција зрачењу може индуковати и до 50 пута већу интра- него екстрацелуларну метаболичку продукцију РОС и РНС (пореклом од •NO) у првих неколико сати по озрачивању¹⁴⁻¹⁶. Као главни извор овог повећања про-оксидантне продукције препозната је митохондрија, највероватније транзитном деполаризацијом митохондријалног мембранског потенцијала. Друге студије су пронашле појачану дозно-зависну хелијску продукцију РОС/РНС у НерG₂ хелијама (линија хуманих хелија канцера јетре), по експозицији кобалту (Co⁶⁰), у опсегу доза од 50–400 сGy¹⁴. Зрачењем индуковани РОС/РНС могу се детектовати у ланчаним

реакцијама које следе озрачивање и које су и просторно и хемијски удаљене од иницијалних догађаја јонизације. Овакве реакције укључују активацију одређених путева сигналне трансдукције, који воде настанку различитих ефеката озрачивања, укључујући и оштећења молекула ДНК¹³.

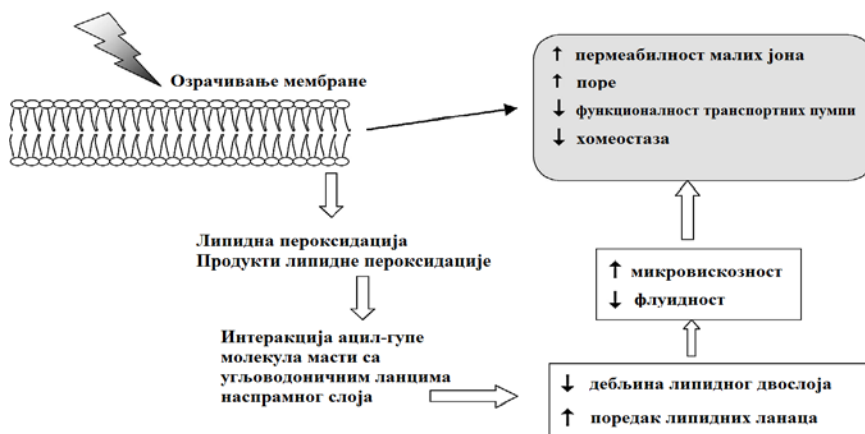
1.1.3. Фаза биолошких процеса

Пошто се енергија зрачења депонује по принципу случајности, подједнака је вероватноћа настанка радијационих оштећења свих ћелијских структура и биомолекула¹³. За разлику од протеина, којих у ћелији има у различитом (углавном великом) броју копија, молекул дезоксирибонуклеинске киселине присутан је само у једној копији. Ћелијска мембрана преноси сигнале који одређују одговор ћелије на озрачивање, било да се ради о директном излагању ћелије зрачењу, или реакцији на озрачивање суседних ћелија. Зато, са становишта хуманог биолошког одговора на озрачивање, највећи значај има деловање зрачења на ћелијску мембрану и генетички материјал, као структура круцијалних за одржање интегритета сваке ћелије.

1.1.3.1 Дејство зрачења на ћелијску мембрану

Физичко-хемијска структура биолошких мембрана чини их посебно осетљивим на зрачењем створене реактивне кисеоничне радикале. Реакција мембранских липида у присуству кисеоника резултује липидном пероксидацијом-ефектом који се појачава са опадањем брзине дозе и има озбиљне последице по мембранску структуру и функцију⁴. Липидна пероксидација има за резултат повећану пермеабилност малих јона и молекула¹⁷, док транспортни системи смештени у мембрани постају ригидни. Селективна пермеабилност је нарушена и формирањем протрузија и пора на специфичним местима у мембрани¹⁸, што нарушава и способност мембране да одржи унутрашњу јонску хомеостазу (слика 4). Експозиција зрачењу може иницирати путеве сигналне трансдукције који започињу оштећењем плазма мембране, а за последицу могу имати апоптозу, али и промене у генској експресији, индукцију хромозомских оштећења и, следствено,

појаву хромозомске и геномске нестабилности^{2,3}. Осим тога, стварање слободних радикала под утицајем јонизујућег зрачења, и њихова интеракција са липидима мембране, један је од извора настанка малондиалдехида^{19,20}, који у интеракцији са азотним базама може изазвати настанак ДНК адуката²¹. Непоправљени ДНК адукти могу такође индуковати мутације и апоптозу – значајне догађаје у основи многих поремећаја - канцерогенезе, атеросклерозе, неуродегенерације²¹.



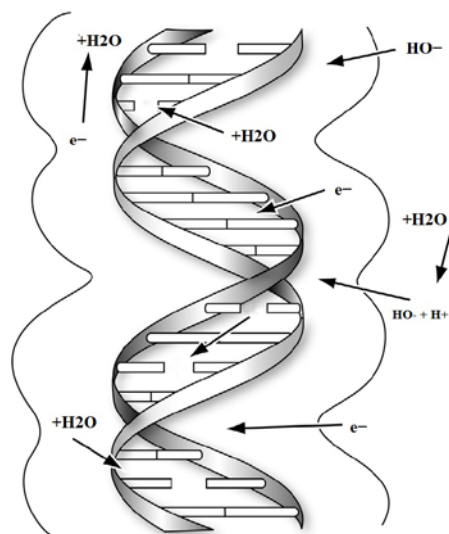
Слика 4. Биофизичке промене плазма мембране индуковане јонизујућим зрачењем

(Извор: Lehnert, Shirley. Biomolecular action of ionizing radiation. Series in medical physics and biomedical engineering. ISBN-13: 978-0-7503-0824-3. CRC Press. Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487-2742)

1.1.3.2 Дејство зрачења на генетички материјал

Јонизујуће зрачење је потентан генотоксични агенс који може индуковати широк спектар оштећења молекула ДНК, укључујући оштећења азотних база, укрштене везе (crosslinking) између молекула ДНК (ДНК-ДНК) и молекула ДНК и протеина, једно- и дволанчане прекиде молекула ДНК^{2,3}.

Јонизујуће зрачење је и препознати канцероген захваљујући способности да изазове оксидативна оштећења молекула ДНК и то на такав начин да узокује појаву хромозомске и геномске нестабилности која се данас сматра главним узрочником радијационе канцерогенезе (слика 5).



Слика 5. Механизми деловања слободних радикала на молекулу ДНК

(Извор: Lehnert, Shirley. Biomolecular action of ionizing radiation. Series in medical physics and biomedical engineering. ISBN-13: 978-0-7503-0824-3. CRC Press. Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487-2742)

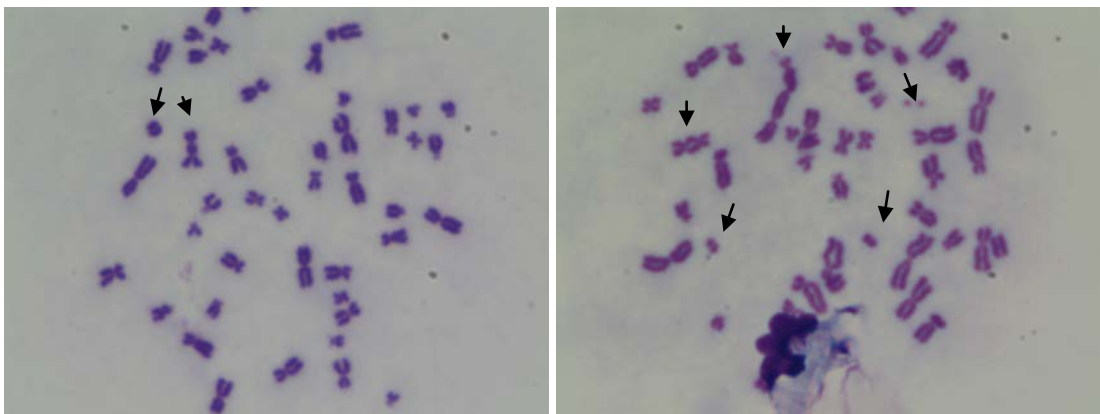
Оксидативни стрес настао из оксидативног метаболизма узрокује оштећења молекула ДНК различитим механизмима; основни механизми укључују формирање слободних радикала који интерагују са незасићеним везама у азотним базама и/или уклањају атом водоника из дезоксирибозе⁴. Генерално, међу компонентама нуклеинских киселина, гуанин је најосетљивија ДНК мета за оксидативне реакције посредоване OH^- јонима²², а модификована база 8-хидрокси-деокси-гуанозин (8-OHdG), сматра се осетљивим маркером оксидативних оштећења молекула ДНК. Ови су ефекти најчешће узроковани реактивним кисеоничним радикалима: O^{2-} , OH^- и H_2O_2 ²². Око 70% радијацијом индукованих ДНК оштећења производ је интеракције молекула ДНК са реактивним слободним радикалима, насталим радиолизом воде у околини молекула ДНК^{23,24}. Молекул ДНК могу оштетити и липидни пероксиди^{2,4,6,19-21} (настали оксидацијом полинезасићених масних киселина) и/или продукти оксидације хелијских протеина реактивним кисеоничним радикалима^{4,6} - оба процеса дешавају се као последица деловања јонизујућег зрачења на хелију^{2,4}.

Ова оштећења могу бити појединачна или груписана дуж молекула ДНК, када се зову места мултиплих оштећења^{23,24}. Ward и сарадници²³⁻²⁷ истражили су и

предложили механизме настанка комплексних оштећења интрацелуларне ДНК: енергија зрачења ниског линеарног енергетског трансфера, предата молекулима воде који окружују ДНК, таква је да ствара 2-5 парова радикала у радијусу од 1-4 nm. Као резултат, формирају се мултипла оштећења ДНК од истог зрачењем индукованог догађаја депозиције енергије. Ова оштећења нису обавезно летална за ћелију, али сматрају се високо мутагеним²⁸.

Генерални је став у генотоксикологији да су дволанчани ДНК прекиди кључна зрачењем индукована примарна оштећења, која воде настанку хромозомских аберација – дицентричних хромозома, реципрочних транслокација и прстенастих (ринг) хромозома, чије формирање подразумева међусобне интеракције дволанчаних прекида^{3,4}. Ове промене представљају биомаркере деловања зрачења видљиве на цитогенетичком нивоу³. Поред ових, тзв. аберација хромозомског типа (које укључују обе хроматиде), зрачење у мањој мери може довести и до формирања аберација хроматидног типа³. Ове промене у структури хромозома карактеристичне су за хемијске генотоксичне кластогене агенсе, али се због појаве закаснеле хромозомске нестабилности и ефекта на околне ћелије проучавају и прате и у радиобиологији³.

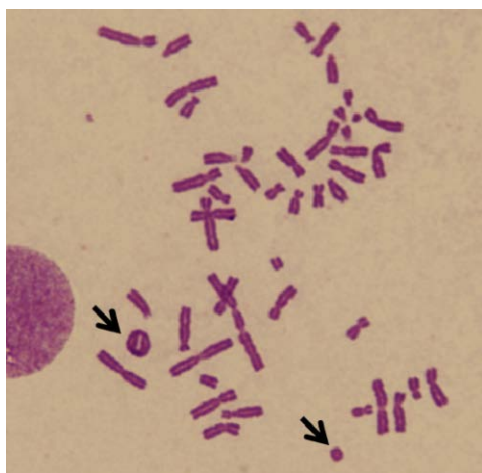
Дицентрични хромозоми (слика ба) су биомаркери деловања зрачења, који се у високом проценту (чине више од 70% свих структурних аберација) могу уочити у метафазним фигурама озраченим *in vivo* или *in vitro*³. Спадају у транслокације, а формирају се разменом центромерних делова два зрачењем оштећена хромозома. У комплетној форми праћени су ацентричним фрагментом, насталим од ацентричних делова хромозома који су учествовали у формирању дицентрика. Морфолошки се одликују присуством две центромере. Нарочито при акутној експозицији високим дозама може се уочити и присуство мултицентричних фигура (са више од две центромере)³; трицентрици су праћени са два, а квадрицентрици са три ацентрична фрагмента³ (слика бб).



Слика 6. Метафазна фигура са (а) дицентричним хромозомом и пратећим ацентричним фрагментом (б) дицентричним и трицентричним хромозомом са пратећим ацентричним фрагментима (означени стрелицама)

(Извор: Фотодокументација Лабораторије за биодозиметрију и цитогенетику. Институт за медицину рада „Др Драгомир Карајовић“ 2015.)

Центрични ринг хромозоми су у хуманим озраченим лимфоцитима периферне крви далеко ређе присутни него дицентрици. Неки их научници узимају у обзир (заједно са дицентричним хромозомима) приликом прорачуна апсорбоване дозе биодозиметријском методом^{2,3,29}, док их неки занемарују. Настају разменом (спајањем) два дволанчана прекида на различитим крацима истог хромозома и такође су праћени ацентричним фрагментом (слика 7).



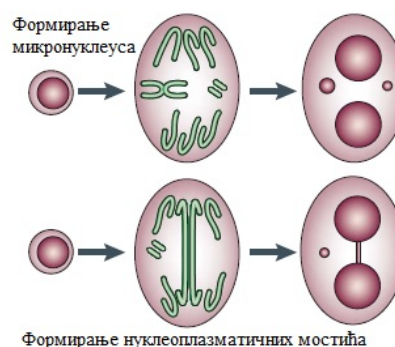
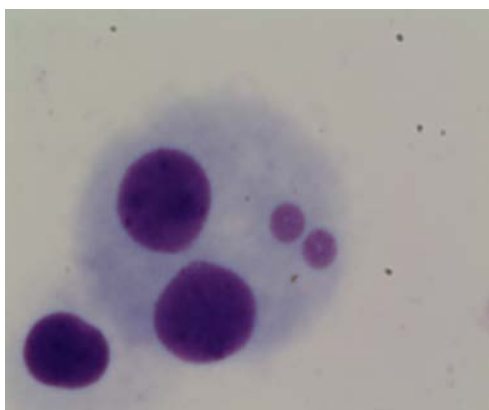
Слика 7. Центрични ринг хромозом (стрелица лево) са пратећим ацентричним фрагментом (стрелица десно)

(Извор: International Atomic Energy Agency. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna: IAEA; 2011)

Ацентричне аберантне фигуре могу бити формиране независно (самостално) од претходно описаних аберација и у том случају означени су као „прекобројни“ ацентрични фрагменти. Могу бити терминалне или интерстицијалне делеције различите величине. Често није могуће утврдити њихово порекло јер могу настати и комбинацијом делова пореклом од различитих хромозома оштећених зрачењем³.

Описане структурне хромозомске аберације детектују се дицентрик тестом у оквиру кога се прати њихова учесталост и дистрибуција на 100-1000 метафазних фигура (у зависности од апликоване дозе) у циљу прорачуна апсорбоване дозе зрачења³.

Као кластогени агенс, јонизујуће зрачење води и формирању микронуклеуса (слика 8а). Микронуклеуси настају од ацентричних хромозомских фрагмената и читавих хромозома који, због оштећења индукованих јонизујућим зрачењем, не успостављају правилну интеракцију са микротубулама деобног вретена и заостају у анафази ћелијског циклуса, те се не укључују у састав главног једра тј. нуклеуса³. Овај материјал добија посебну мембрану у телофази, чиме настаје структура означена као микронуклеус³. Шема настанка микронуклеуса приказана је на слици 8б.



Слика 8. Бинуклеарни лимфоцит са два микронуклеуса (а); шематски приказ настанка микронуклеуса и нуклеоплазматичних мостића (б)

(Извор слика 8а: Фотодокументација Лабораторије за биодозиметрију и цитогенетику. Институт за медицину рада „Др Драгомир Карајовић“, 2015.; слика 8б: Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature Protocols. 2007; 2:

1084-1104)

Микронуклеуси који носе хромозомске фрагменте могу настати од директних дволанчаних ДНК прекида, конверзијом једно- у дволанчане прекиде после репликације или инхибицијом ДНК синтезе. Микронуклеуси који носе целе хромозоме примарно се формирају као последица дефеката у генима који контролишу ћелијски циклус, дефеката у формирању деобног вретена или других делова митотичког апарата. Судбина микронуклеуса је слабије проучавана и укључује:

- елиминацију микронуклеираних ћелија кроз процес апоптозе³⁰
- експулзију из ћелије (када ДНК из микронуклеуса није способна да се реплицира, због одсуства неопходних цитоплазматичних компоненти)³¹
- реинкорпорацију у главни нуклеус (када реинкорпорирани хромозоми могу вратити биолошку активност)³¹
- задржавање у ћелијској цитоплазми као екстрануклеусни ентитет (када микронуклеус може комплетирати један или више циклуса ДНК/хромозомске репликације)³¹.

Критеријуми за анализу микронуклеуса успостављени су и валидовани Human MicroNucleus (HUMN) пројектом, у оквиру кога су праћени и услови који могу утицати на резултате теста³². Тест којим се прате микронуклеуси - цитокинезис-блок микронуклеус (CBMN) тест је подједнако осетљив за откривање оштећења деобног вретена и аберација хромозома³³, па се присуство микронуклеуса сматра квантитативним показатељем постојања структурних и/или нумеричких аберација хромозома насталих под утицајем генотоксичних агенаса³⁴. Осим капацитета детекције микронуклеуса, CBMN тест може обезбедити додатне податке о гено- и цитотоксичности праћењем: формирања нуклеоплазматичних мостова - НПБ (маркера хромозомских реаранжмана), пупова – НБ (маркера амплификације гена)³⁵, инхибиције ћелијске деобе (проценом индекса деобе једра)³⁶, некрозе и апоптозе³⁷. CBMN тест се, дакле, може посматрати као тест којим се детектује хромозомска нестабилност, дисфункција митотичког апарата, ћелијска пролиферација и ћелијска смрт^{38,39}.

1.2 Биодозиметрија и радиолошка здравствена заштита

Како је формирање дицентричних, прстенастих хромозома и микронуклеуса скоро ексклузивно индуковано деловањем јонизујућег зрачења на хумани геном, ове промене се већ више деценија успешно примењују у биодозиметрији – методологији заснованој на истраживању зрачењем индукованих биолошких ефеката у циљу њиховог повезивања са примљеном дозом зрачења².

Биолошка дозиметрија је посебно значајна у области радиолошке здравствене заштите, јер подразумева сличну радиосензитивност сваке јединке, али не искључује постојање интер-индивидуалне варијабилности у одговору на зрачење³. Важећа ограничења доза у професионалној експозицији заснована су, међутим, на претпоставци да је хумана популација хомогена у својој радиосензитивности; тако ће радиосензитивне особе показати повећану инциденцу и детерминистичких и стохастичких ефеката⁴⁰. У радиотерапији, код пацијената који примају идентичне дозе, последице по нормална ткива варирају од недетектабилних до озбиљних⁴⁰. Око 5-7% онколошких пацијената развије нежељене ефекте на зрачну терапију у нормалним ткивима захваћеним зрачним пољем, који се означавају као „клиничке радијационе реакције“, а укључују акутне ефекте, касне ефекте и појаву секундарних карцинома⁴².

Клиничке студије⁴¹⁻⁴⁵ сугеришу да је велики део спектра реакција нормалних ткива на озрачивање управо последица разлика у индивидуалној радиосензитивности, као и да комплексност појединачног одговора на озрачивање (мерена појавом и учесталашћу биомаркера деловања зрачења на генетичком нивоу) и тежина последица нису једнаке за све и зависе од међусобно уско повезаних фактора: репаративних капацитета и оксидативног статуса (односа између количине продукованих слободних радикала као последице озрачивања и капацитета антиоксидантне заштите, која може свести на минимум или значајно ублажити штетна дејства јонизујућих зрачења). Како ови фактори показују значајну интер-индивидуалну варијабилност у хуманој популацији, то и јединке показују значајне разлике у осетљивости на зрачење, па је идентификација посебно осетљивих/резистентних подгрупа значајна за радиолошку здравствену заштиту, без обзира на вид излагања.

Циљ и основна сврха радиолошке здравствене заштите јесте превенција детерминистичких ефеката од клиничког значаја и ограничавање стохастичких ефеката на прихватљиве нивое⁴⁶.

Како нови правци истраживања у овој области теже оптимизацији свакодневног професионалног излагања, али и лечења/дијагностике болести које подразумевају примену зрачења, циљ је да се на већем броју здравих испитаника прате ефекти различитих доза зрачења, да би се утврдили параметри који могу бити изабрани за сигурне показатеље интер-индивидуалне варијабилности у одговору на зрачење. Ти параметри ће помоћи да се формира универзално применљива батерија тестова која би се изводила пре или приликом сваког значајнијег излагања зрачењу (пре почетка и током професионалне експозиције и/или излагања које подразумева примену већих доза) и омогућила процену одговора на зрачење, а самим тим одредила лимите професионалног излагања или оптимални опсег доза који код датог пацијента постиже максималан учинак.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Биолошки маркери експозиције и ефекта озрачивања, као што су хромозомске аберације и микронуклеуси, и репаративни капацитети (способност поправке зрачењем индукованих оштећења), испитивани су у досадашњим истраживањима^{41,45-49} у евалуацији индивидуалне радиосензитивности *in vitro*. Како је један од узрочника оштећења молекула ДНК дејством јонизујућег зрачења и настанак слободних радикала, активност ензима антиоксидантне заштите и баланс параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора требало би да имају значајну, мада индиректну, улогу у крајњем одговору на овај генотоксични агенс.

Ово истраживање је зато имало за циљ утврђивање утицаја параметара оксидативног стреса (концентрација малондиалдехида и завршних оксидативних продуката протеина), параметара антиоксидантног одговора (активност супероксид дисмутазе и каталазе) и оксидативног статуса испитаника (одређеног параметрима – тотални оксидативни статус, тотални антиоксидантни статус и индекс оксидативног стреса), на учесталост биомаркера деловања зрачења (дицентричних, прстенастих хромозома и микронуклеуса) у лимфоцитима периферне крви и испитивање корелације између формирања две врсте биомаркера - дицентрика и микронуклеуса, у одговору на излагање зрачењима, под истим експерименталним условима кроз:

1. Утврђивање интер-индивидуалне варијабилности у одговору на зрачење праћењем појаве цитогенетичких биомаркера у функцији апликоване дозе кроз формирање дозно-зависних крива
2. Одређивање показатеља оксидативног статуса и утврђивање интер-индивидуалне варијабилности у одговору на зрачење
3. Утврђивање корелације цитогенетичких биомаркера деловања јонизујућег зрачења и показатеља оксидативног статуса у функцији апликоване дозе зрачења

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 Селекција испитаника

Истраживање је обухватило анализу узорака крви здравих испитаника-донора на постојање цитогенетички видљивих промена генетичког материјала и биохемијски потврђених промена у вредностима параметара оксидативног стреса, у одговору на деловање различитих апликованих доза зрачења у односу на неозрачене узорке.

Донори су пре почетка истраживања упознати са организацијом, циљевима и очекиваним исходом експеримента, те су потписали информисани пристанак. Организација цитогенетичких испитивања, комуникација са испитаницима, узорковање крви, поступци при руковању узорцима крви у лабораторијским условима, као и поступање са добијеним резултатима, спроведени су у складу са етичким начелима и смерницама претпостављеним за биомониторинг људских популација⁴⁴. Истраживање је одобрио Етички комитет Медицинског факултета Универзитета у Београду.

Селекција испитаника спроведена је на основу вредновања података прикупљених стандардизованим упитником за цитогенетичка истраживања. Упитник обухвата основне анамнестичке податке, податке о занимањима и животним навикама, посебно о навици конзумирања цигарета, конзумирању алкохола и евентуалним медицинским излагањима испитаника. Испитаници су изабрани на начин који искључује евентуалне придружене факторе који би могли утицати на оксидативни статус и параметре оксидативног стреса: дијабетес, малигна обољења, нестабилна ангина, сепса, хронична аутоимуна обољења, изложеност зрачењу⁵¹⁻⁵⁵ и повећану базалну учесталост микронуклеуса: године старости и конзумирање преко 20 цигарета дневно^{3, 54, 55}.

У студију су укључени испитаници који:

- а) су старости између 20-50 година⁵⁵
- б) су здрави (не болују од акутних инфекција) у време узорковања крви за експеримент
- б) не болују од хроничних обољења

- в) нису подвргнути дијагностичким/терапијским процедурама које укључују излагање зрачењима/цитостатицима 6 месеци пре узорковања крви за експеримент
- г) имају сличне навике у исхрани
- д) не конзумирају алкохол
- ђ) су непушачи или конзумирају до 20 цигарета дневно^{3,54}
- ж) на својим радним местима и у животном окружењу нису изложени препознатим физичким/хемијским мутагеним агенсима.

3.2 Опште карактеристике испитиване популације

Истраживање је обухватило 56 здравих донора (27 жена и 29 мушкараца), просечне старости 30.45 ± 10.43 година. Просечна старост особа женског пола износила је 30.44 ± 10.41 година, а просечна старост мушких испитаника 30.45 ± 10.64 година. У испитиваној групи било је укупно 20 пушача (9 особа женског и 11 особа мушког пола). Табела 3 и графикони 1 – 5 приказују опште карактеристике испитиване популације.

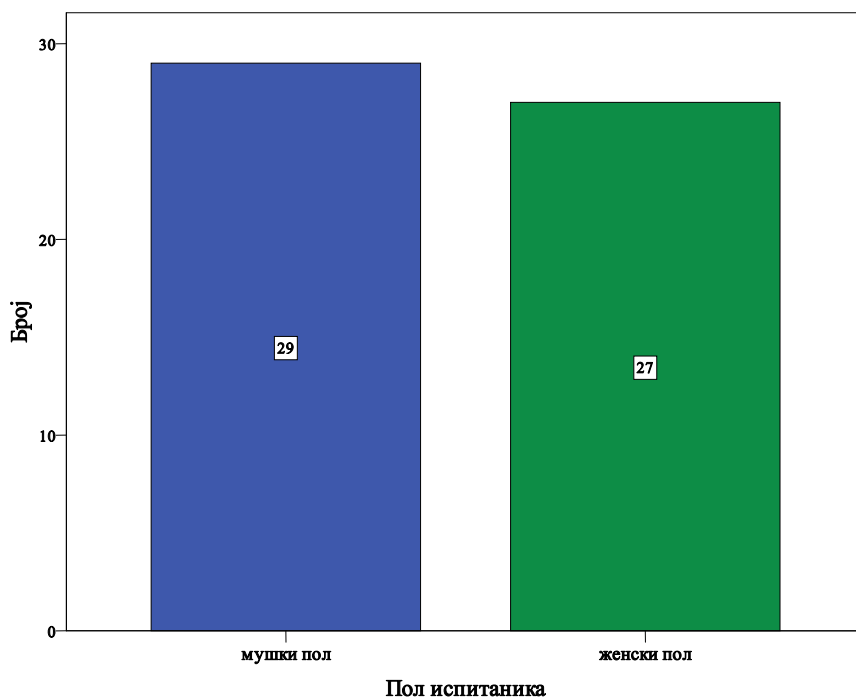
Табела 3. Опште карактеристике испитиване популације

Обележје \ Пол	Женски	Мушки
Старост (средња вредност; SD)	30.44; 10.41	30.45; 10.64
Конзумирање цигарета ^а (да; не)	Да (9) Не (18)	Да (11) Не (18)
Медицинска излагања зрачењима/хемијским мутагенима годину дана пре узорковања крви (да; не)	Да (0) Не (27)	Да (0) Не (29)
Хронична обољења ^б	0 (26) 1(0) 2(1) 3(0)	0 (27) 1(0) 2(1) 3(1)
Животне навике ^в	0 (0) 1(7) 2 (20)	0 (1) 1 (18) 2 (10)

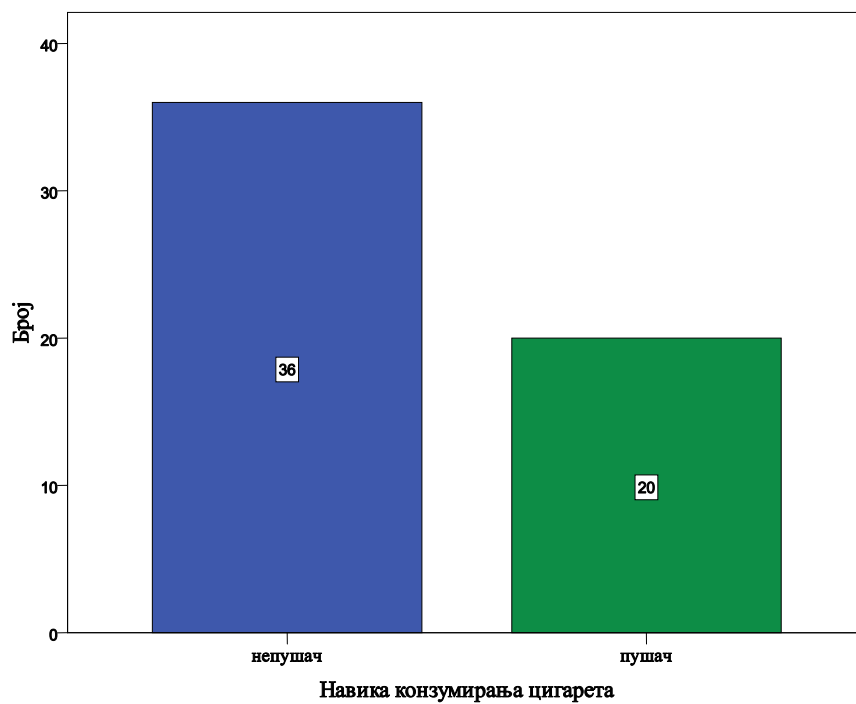
^а Сви пушачи конзумирали су највише 20 цигарета дневно

^б Хронична обољења: 0-без хроничних обољења; 1-хронична обољења са могућим утицајем на цитогенетички статус; 2-хронична обољења са могућим утицајем на оксидативни статус; 3 – хронична обољења са могућим утицајем на цитогенетички и оксидативни статус испитаника

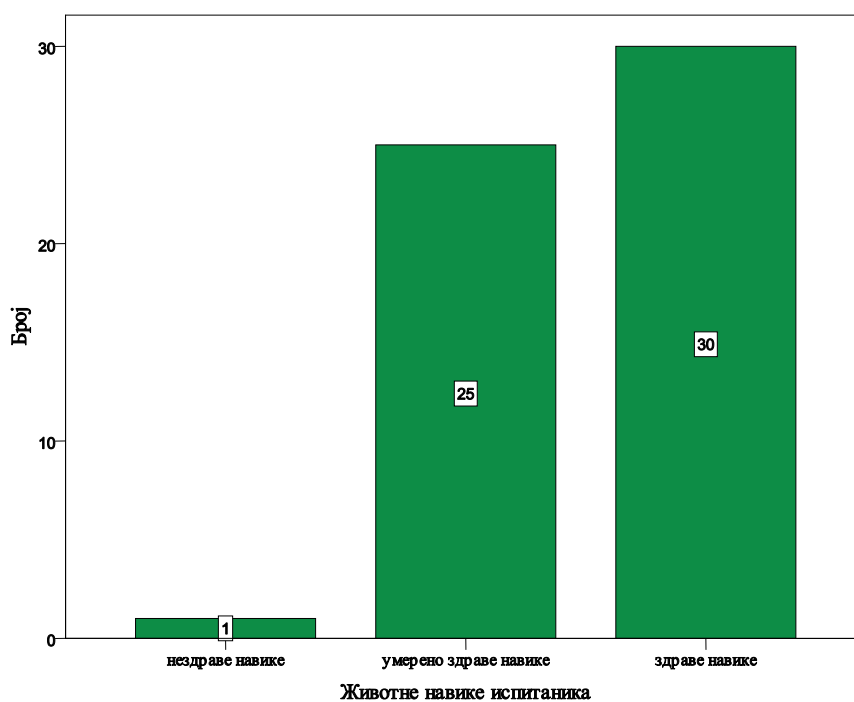
^в Животне навике: 0-нездраве; 1-умерено здраве; 2-здраве



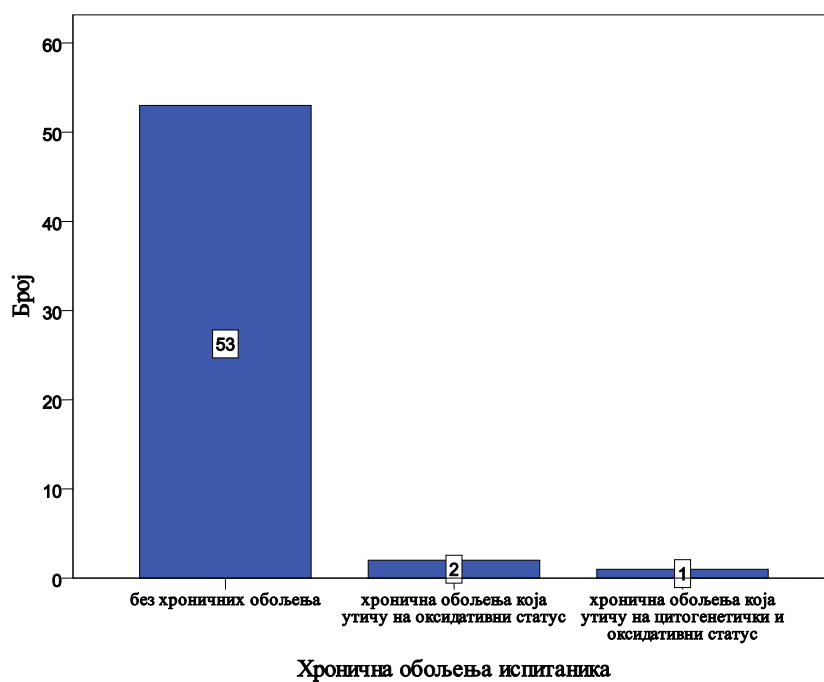
Графикон 1. Учесталост испитаника у односу на пол



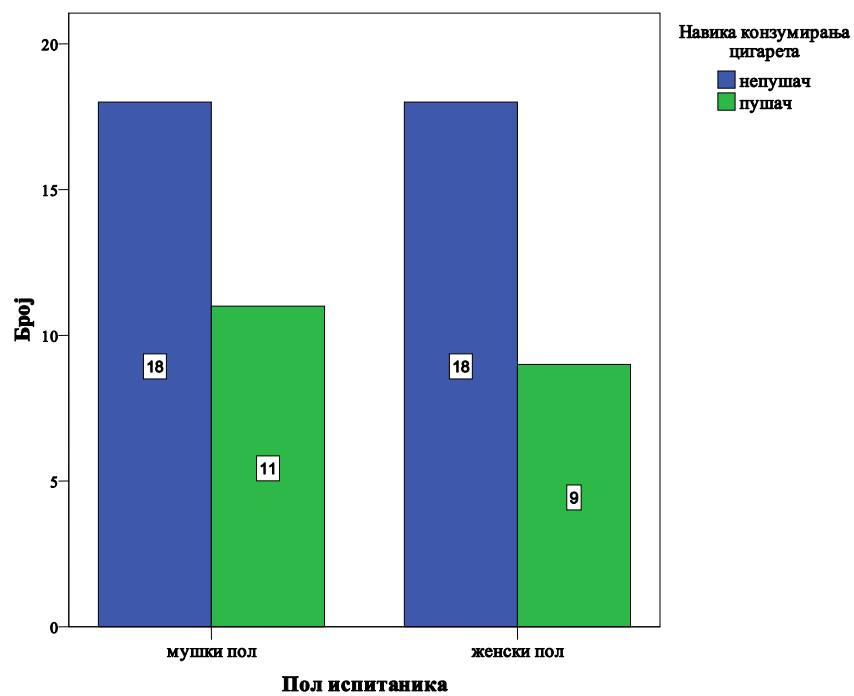
Графикон 2. Учесталост испитаника у односу на навику конзумирања цигарета



Графикон 3. Учесталост испитаника у односу на животне навике



Графикон 4. Учесталост испитаника у односу на хронична обољења



Графикон 5. Учесталост пушача/непушача у односу на пол

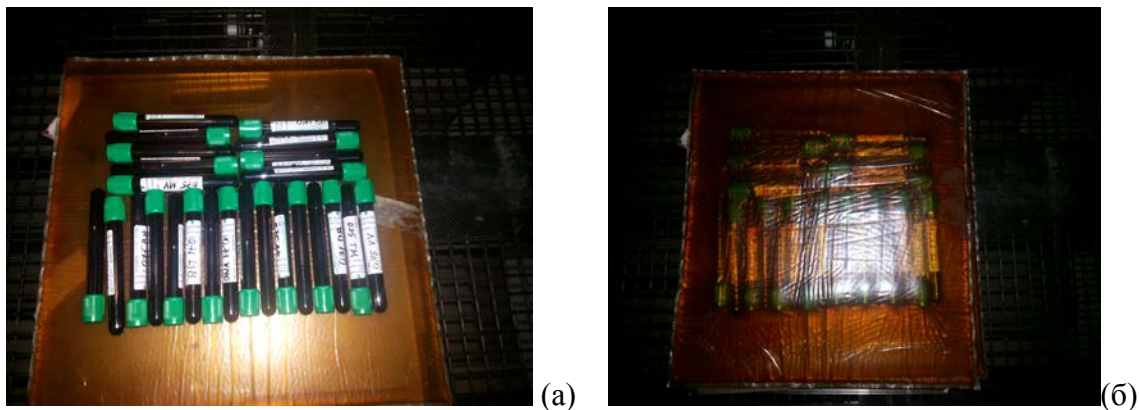
3.3 Узорковање крви и озрачивање

Испитаници су подвргнути минимално инвазивном захвату кубиталне венепункције. Крв је узоркована у Li-хепаринске вакутајнере. Четири једнака узорка венске крви (5ml) сакупљена су од сваког испитаника 2 часа пре почетка озрачивања³. По један узорак од сваког испитаника (контролни) озрачен је са 0 Gy, док су остала три озрачена следећим дозама X – зрачења енергије 6MeV: 0,75 Gy, 1,5 Gy и 3 Gy.

Озрачивање вакутајнера са узорцима крви обављено је на уређају за зрачну терапију CLINAC 600EX (слика 9). Узорци су озрачени у PMMA фантому, одговарајућих димензија, зрачним пољем 15x15 cm, на удаљености 100cm од извора зрачења, на дубини од 2 cm. Пре мерења је извршена дозиметријска провера радијационог излаза коришћењем еталонираног дозиметријског система. На слици 10 приказани су узорци крви припремљени за озрачивање.



Слика 9. Уређај за зрачну терапију CLINAC 600EX



Слика 10. Припрема узорка за озрачивање (а) узорци у РММА фантому (б)

(Извор: Фотодокументација Лабораторије за биодозиметрију и цитогенетику. Институт за медицину рада „Др Драгомир Карајовић“ 2015.)

3.4 Цитогенетичке методе

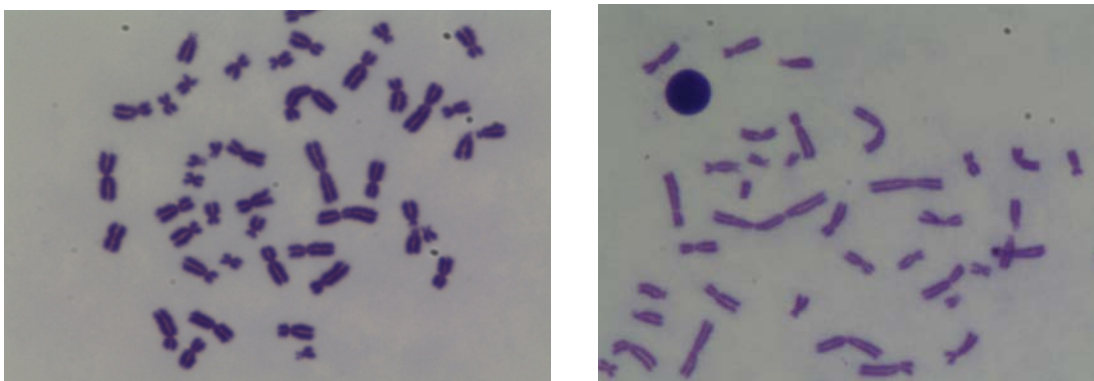
У студији су, у циљу праћења утицаја јонизујућих зрачења на генетички материјал испитаника, употребљене две цитогенетичке методе: дицентрик тест, који, као „златни стандард“ у радиобиологији, омогућава праћење структурних хромозомских аберација у метафазним фигурама, и микронуклеус тест, који поред праћења микронуклеуса, биомаркера деловања зрачења, омогућава и детекцију хромозомске нестабилности, дисфункције митотичког апарата, ћелијске пролиферације и ћелијске смрти.

3.4.1 Дицентрик тест

Хромозомске аберације у лимфоцитима периферне крви анализирани су у складу са стандардним протоколом³. Пуна периферна крв култивисана је у комерцијално доступном медијуму за култивацију (Pb-MAX Karyotyping Medium (Gibco)). Културе су инкубирани у трајању од 48 h на температури од 37° C у влажној атмосфери са 5% CO₂. Последња два часа инкубације културама је додат цитостатик колхицин (Colchicine), финалне концентрације 0.05 µg/ml. Након завршетка култивације, приступило се изради микроскопских препарата у складу са стандардним протоколом³. Поступак укључује додавање хипотоничног раствора културама (0.075M KCl), вишекратно центрифугирање (10 минута на

1300 обртаја/мин), испирање и обраду талога и његово фиксирање мешавином метанола и глацијалне сирћетне киселине у односу 3:1. Фиксиране ћелије су распршене по микроскопским плочицама и превучене преко пламена. Препарати су обојени 10%-тним воденим раствором Giemsa боје, обележени и анализирани под светлосним микроскопом (Zeiss Jenaval Contrast, Olympus BX-51, увеличање 1600x).

У сваком узорку прегледано је 200 метафазних фигура у циљу детекције структурних оштећења хромозомског типа (дицентричних хромозома, прстенастих хромозома, ацентричних фрагмената). Слика 11 приказује метафазне фигуре са дицентричним хромозомомима.



Слика 11. Метафазне фигуре са дицентричним хромозомомима

(Извор: Фотодокументација Лабораторије за биодозиметрију и цитогенетику. Институт за медицину рада „Др Драгомир Карајовић“ 2015.)

3.4.2 CBMN тест

За CBMN тест лимфоцити су култивисани на исти начин као за анализу хромозомских абериција- дицентрик тест³. После 44 часа инкубације, културама је додато 0.1ml цитохалазина Б раствореног у диметил-сулфоксиду, финалне концентрације 3µg/mL, а затим је култивација настављена још 24 часа.

Потом су културе третиране 0.9% раствором NaCl, па хладним хипотоничним раствором (0.075M KCl), у циљу лизирања црвених крвних ћелија. Супернатант се уклања и замењује фиксативом (метанол : глацијална сирћетна киселина 3:1) са 1% формалдехидом. По завршетку двадесетоминутне инкубације, узорци су испрани и талог обрађен. Прочишћени талог ресуспендован је у свежем

фиксативу и накапан на микроскопске плочице. Добијени препарати осушени су на ваздуху, обојени 10%-тним воденим раствором Giemsa боје, обележени и анализирани под светлосним микроскопом (Zeiss Jenaival Contrast, Olympus BX-51, увељичање 1250x). У сваком узорку прегледано је по 1000 бинуклеарних лимфоцита у којима је утврђен укупан број микронуклеуса, а упоредо су анализирани хелије са микронуклеусима и њихова расподела (дистрибуција). Праћена је и појава специфичних параметара микронуклеус теста – нуклеоплазматичних мостова (NPB) и нуклеусних пупова (NB).

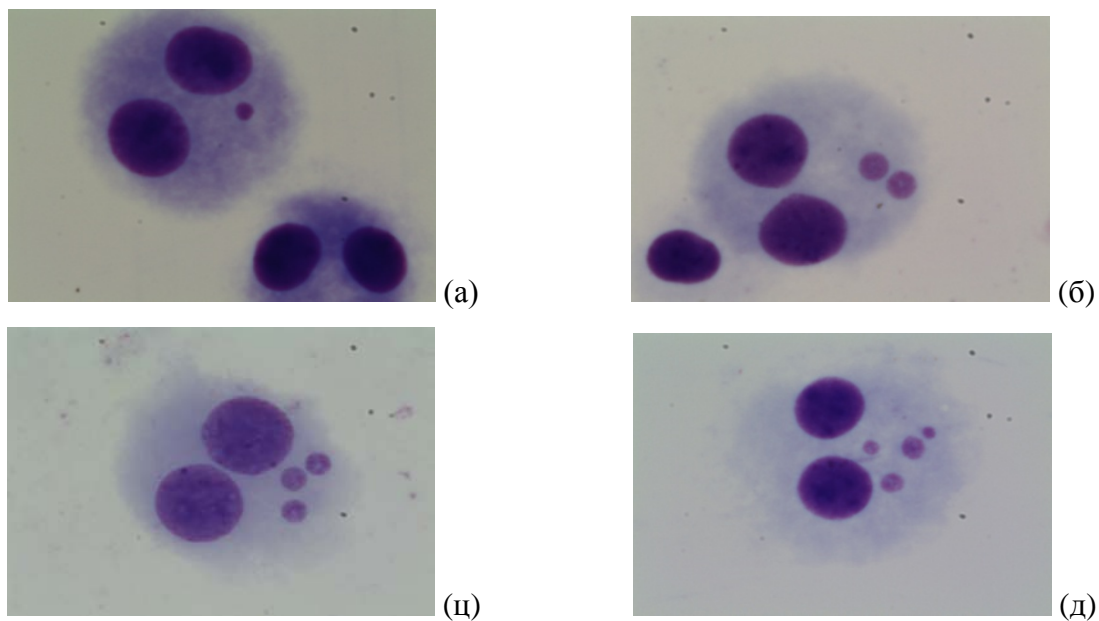
Бинуклеарни лимфоцити су анализирани у складу са стандардним протоколом³ и прописаним критеријумима HUMN пројекта^{32,39,56}.

Параметри цитостазе (параметри који описују индекс деобе једра) дефинисани су као: M_1 (број лимфоцита са 1 главним нуклеусом на 500 анализираних вијабилних хелија), M_2 (број лимфоцита са 2 главна нуклеуса-бинуклеарних лимфоцита, на 500 анализираних вијабилних хелија), M_3 (број лимфоцита са 3 главна нуклеуса на 500 анализираних вијабилних хелија), M_4 (број лимфоцита са 4 главна нуклеуса на 500 анализираних вијабилних хелија) и NDI (индекс деобе једра, енг. nuclear division index, који се рачуна по формули:

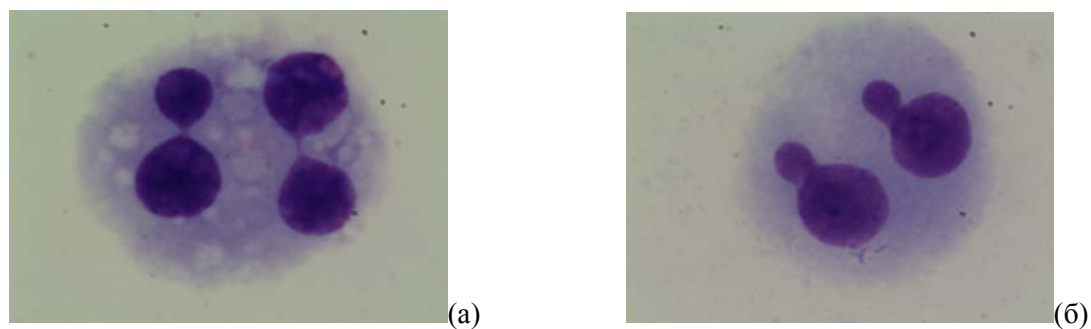
$$NDI = (M_1 + 2 * M_2 + 3 * M_3 + 4 * M_4) / (M_1 + M_2 + M_3 + M_4).$$

Параметри који описују дистрибуцију микронуклеуса анализирани су на 1000 бинуклеарних лимфоцита и дефинисани су као: MN_1 (број бинуклеарних лимфоцита са 1 микронуклеусом), MN_2 (број бинуклеарних лимфоцита са 2 микронуклеуса), MN_3 (број бинуклеарних лимфоцита са 3 микронуклеуса), MN_4 (број бинуклеарних лимфоцита са 4 микронуклеуса), MN_5 (број бинуклеарних лимфоцита са 5 микронуклеуса), MN_6 (број бинуклеарних лимфоцита са 6 микронуклеуса). Облици дистрибуције микронуклеуса приказани су на слици 12 (а-д), а специфични параметри микронуклеус теста на слици 13.

У циљу детекције цитотоксичних ефеката одређен је број некротичних (NC) и апопототичних (AC) хелија на 500 вијабилних лимфоцита. Слика 14 приказује хелије у процесу апоптозе (а), односно некрозе (б).

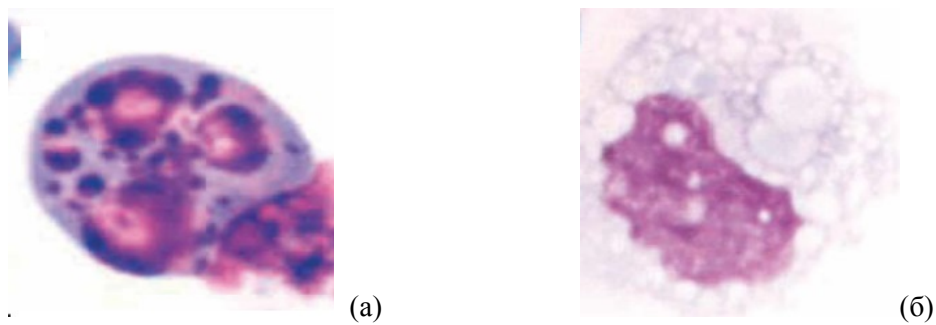


Слика 12. Дистрибуција микронуклеуса. Бинуклеарни лимфоцити са једним (а), два (б), три (ц) и четири микронуклеуса (д)



Слика 13. Специфични параметри микронуклеус теста: нуклеоплазматични мостићи (а) и нуклеусни пупови (б)

(Извор за слике 12 и 13: Фотодокументација Лабораторије за биодозиметрију и цитогенетику. Институт за медицину рада „Др Драгомир Карајовић“ 2013-2015.)



Слика 14. Телија у процесу апоптозе (а); ћелија у процесу некрозе (б)

(Извор: Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature Protocols. 2007; 2: 1084-1104)

3.5 Биохемијске методе

За сваког испитаника утврђен је оксидативни статус на свим апликованим дозама зрачења и у неозраченим узорцима, праћењем вредности параметара: тотални оксидативни статус (TOS), тотални антиоксидантни статус (TAS) и индекс оксидативног стреса (IOS). На свим узорцима праћени су и параметри оксидативног стреса и антиоксидантног одговора (концентрација малондиалдехида-MDA, завршних оксидативних продуката протеина-AOPP, активност цитосолне супероксид дисмутазе-SOD и каталазе-CAT).

3.5.1 Одређивање концентрације протеина у плазми

Концентрација протеина у узорцима плазме одређена је спектрофотометријском методом по Брадфорду⁵⁷. Визуелном спектрофотометријском квантификацијом на $\lambda=595$ nm, очитане су апсорбанце узорака, а линеарном регресијом на основу стандардне праве, добијене концентрације изражене су као милиграм протеина по милилитру плазме [mg/ml].

3.5.2 Спектрофотометријско одређивање активности супероксид-дисмутазе (SOD)

Активност супероксид-дисмутазе у плазми одређена је спектрофотометријски, на $\lambda=340$ nm, коришћењем смеше 100 μ L плазме, 100 μ L реагенса [100 μ L адреналина (0.18 g/L у 0.1 mol/L HCl) и 1.8 mL Tris-HCl пуфера (0.05 mol/L, pH=10.2)] и очитавањем промене апсорбанце у минути на 25°C, током 10 минута реакције. Јединица ензимске активности (U/mg протеина) је она количина ензима која изазива промену $\Delta A/\text{min}$ од 0,001 под условима теста⁵⁸.

3.5.3 Одређивање тоталног оксидативног статуса (TOS)

Тотални оксидативни статус у плазми одређен је спектрофотометријском методом по Ерелу⁵⁹. Метода се заснива на оксидацији феро јона (Fe^{2+}) у фери јон (Fe^{3+}) у

присуству различитих оксиданата у киселој средини и мерења концентрације Fe^{3+} јона колорним индикатором ксиленол-оранжом. Реакциона смеша се састоји од 10 μl плазме, 200 μl реагенса 1 (кисели раствор ксиленол-оранжа у сумпорној киселини, концентрације 25 mmol/l , уз додатак глицерола и натријум хлорида) и 50 μl реагенса 2 (кисели раствор Морове соли ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$) у сумпорној киселини, концентрације 25 mmol/l , уз додатак о-дианизидина). Смеша се инкубира 10 минута на 37°C , а абсорбанца се читава на $\lambda=560 \text{ nm}$. За стандардизацију методе користи се водени раствор водоник пероксида у концентрацијама 0-100 $\mu\text{mol/l}$. Добијени резултати изражени су у јединицама $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ еквивалената/ mg протеина у плазми.

3.5.4 Одређивање тоталног антиоксидантног статуса (TAS)

Тотални антиоксидантни статус у плазми одређен је спектрофотометријском методом по Ерелу⁶⁰. Метода се заснива на способности антиоксиданата у узорку да инхибирају формирање АБТС⁺ јона који настаје оксидацијом АБТС (2,2'-азиноди-(3-етилбенз-тиазолин-сулфонат)) у киселој средини. Реакциона смеша се састоји од 5 μl плазме, 200 μl реагенса 1 (ацетатни пуфер концентрације 40 mmol/l , $\text{pH}=5.8$) и 20 μl реагенса 2 (раствор АБТС у ацетатном пуферу концентрације 30 mmol/l , $\text{pH}=3.6$, уз додатак H_2O_2). Смеша се инкубира 10 минута на 37°C , а абсорбанца се читава на $\lambda=660 \text{ nm}$. За стандардизацију методе коришћен је водени раствор Тролокса у концентрацијама 0-100 mmol/l . Добијени резултати изражени су у јединицама mmol Тролокс еквивалената/ mg протеина у плазми.

3.5.5 Одређивање садржаја завршних оксидативних продуката протеина (AOPP)

Садржај завршних оксидативних продуката протеина у плазми, одређује се UV-спектрофотометријском методом по Витко-Сарсату³¹. Метода се заснива на мерењу пораста абсорбанце приликом реакције калијум јодида и завршних оксидативних продуката протеина дитиروزинске природе у киселој средини.

Реакциона смеша се састоји од 5 μl плазме, 195 μl фосфатног пуфера ($c=20\text{ mmol/L}$, $\text{pH}=7.4$), 20 μl сирћетне киселине концентрације 0.5 mol/L и 10 μl воденог раствора калијум јодида концентрације 1.16 mol/L. Смеша се инкубира 10 минута на 37°C , а абсорбанца се читава на $\lambda=340\text{ nm}$. За стандардизацију методе користи се водени раствор хлорамина-Т у концентрацијама 0-100 $\mu\text{mol/L}$. Добијени резултати изражени су у јединицама μmol хлорамин-Т еквивалената/mg протеина у плазми.

3.5.6 Одређивање укупног садржаја липидних пероксида у плазми

Садржај малондиалдехида (MDA) у серуму одређен је спектрофотометријски TBARS методом као мера интензитета липидне пероксидације. Смеси од 100 μL плазме и 100 μL 10% SDS, додаје се 4 mL колорног реагенса [2 mL 20% воденог раствора CH_3COOH , 2 mL 1 mol/L воденог раствора NaOH и 21.2 mg тиобарбитурне киселине]. Након 1 h инкубирања смеше у кључалом воденом купатилу, узорци се пребацују на лед и инкубирају 10 min да би се зауставила реакција. Потом се центрифугирају 5 min на 6 000 rpm, сакупља се супернатант и абсорбанца се чита на $\lambda=532\text{ nm}$. На основу стандардне праве добијене абсорбанце се преводе у јединице моларне концентрације MDA у плазми⁶².

3.5.7 Одређивање укупне активности каталазе (CAT) у плазми

Активност каталазе у плазми одређена је спектрофотометријски, на $\lambda=240\text{ nm}$, коришћењем смеше 100 μL плазме, 1 mL реагенса [1.0 mL 0.18% H_2O_2 , раствореног у фосфатном пуферу (0.05 mol/L, $\text{pH}=7.0$) и 2.0 mL фосфатног пуфера (0.05 mol/L, $\text{pH}=7.0$)] и читавањем промене абсорбанце у минути на 25°C , током 6 минута реакције. Јединица ензимске активности (U/mg протеина) катализује трансформацију 1 μmol -а водоник-пероксида у минути под условима теста⁶³.

3.6 Статистичка анализа

Подаци од значаја за процену генетичких и биохемијских оштећења и промена статистички су обрађени, приказани табеларно и графички и образложени, у складу са природом анализираних варијабли.

Нумеричка обележја у студији описана су класичним методама дескриптивне статистике: аритметичком средином и медијаном (од средњих вредности), стандардном девијацијом, коефицијентом варијације и стандардном грешком (од мера варијабилитета), минималном и максималном вредношћу. У свим табелама приказани су релативни бројеви.

Анализа хомогености варијабли извршена је тестирањем нормалне расподеле тестом по Колмогоров-Смирнову; у складу са добијеним резултатима у даљој анализи коришћене су параметарске и непараметарске методе. Учесталости биомаркера (дицентричних и прстенастих хромозома и микронуклеуса) израчунате су за контролне (неозрачене) узорке и за узорке озрачене сваком од доза. Разлика између дозно-зависних вредности анализираних параметара утврђена је применом t-теста за везане узорке. За испитивање значајности разлике између биохемијских параметара на различитим дозама зрачења, употребљен је АНОВА тест за поновљена мерења. За поређење учесталости независних непараметарских обележја, за пропорције приликом анализе три и више група података, употребљена је анализа варијансе по Фишеру (АНОВА) и као непараметарска варијанта код независних узорака, АНОВА по Краскал Волису. Анализа повезаности посматраних карактеристика урађена је методама једноструке непараметарске корелације. Интер-индивидуална варијабилност дозно-зависних учесталости биомаркера евалуирана је Хи-квадрат тестом за један узорак. Коефицијент варијације (CV) коришћен је да се одреди групна варијабилност у одговору на јонизујуће зрачење за обе врсте биомаркера – групе су за ову врсту анализе састављене од свих узорака озрачених истом дозом. Дозно-зависне криве које дефинишу одговор на излагање зрачењу кроз учесталости цитогенетичких и биохемијских параметара, фитоване су Curve estimation нелинеарном регресионом анализом. Варијабилност у одговору на зрачење израчуната је као однос броја одговора већих од просечног и броја

озрачених узорака при датој дози. Одговор је дефинисан као учесталост цитогенетичких и биохемијских параметара при датој дози за сваког донора.

У свим примењеним аналитичким методама прихваћени ниво значајности је 0.05.

Сви статистички прорачуни урађени су помоћу софтверског пакета Statistical Package for Social Sciences, SPSS 17.0 statistics (SPSS Inc, IBM, USA), а величина дозно-зависног одговора цитогенетичких параметара помоћу софтвера за процену дозе и фитовање коефицијената дозно-зависних крива, DoseEstimate v.5⁶⁴.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 Утврђивање интер-индивидуалне варијабилности у одговору на зрачење праћењем појаве цитогенетичких биомаркера у функцији апликоване дозе кроз формирање дозно-зависних крива

Цитогенетички параметри анализирани у овој студији обухватају: број дицентричних и прстенастих хромозома (D+R), укупан број микронуклеуса (MN₁) и параметре дистрибуције микронуклеуса у бинуклеарним лимфоцитима (MN₁-MN₆), специфичне параметре микронуклеус теста (NB, NPВ), параметре цитостазе (NDI, M₁-M₄) и цитотоксичности (NC, AC).

У табелама 4а-г (прилог) приказане су просечне, минималне и максималне вредности анализираних цитогенетичких параметара на свим апликованим дозама зрачења, за цео узорак, женски и мушки пол, пушаче и непушаче.

4.1.1 Анализа учесталости цитогенетичких параметара у односу на пол, навику конзумирања цигарета и животне навике испитаника

Учесталост свих праћених цитогенетичких параметара анализирана је у односу на пол, навику конзумирања цигарета и животне навике испитаника, на свим апликованим дозама зрачења.

Статистичка анализа показала је значајност разлике између испитаника мушког и женског пола у средњим вредностима следећих параметара: број ћелија са 1 нуклеусом (параметар M₁) на 0 Gy; број бинуклеарних лимфоцита са 1 микронуклеусом (MN₁), број ћелија са 4 нуклеуса (M₄), број нуклеоплазматичних мостића (NPВ), број нуклеусних пупова (NB), као и број некротичних ћелија (NC) на 0.75 Gy; број ћелија са 3 нуклеуса (параметар M₃) на дози од 3 Gy. Параметри M₁ (0 Gy), M₄ (0.75 Gy), NDI (0.75 Gy) и M₃ (3 Gy) имају веће просечне вредности у мушком полу, док параметри M₁ (0.75 Gy), MN₁ (0.75 Gy), NPВ (0.75 Gy), NB (0.75 Gy), NC (0.75 Gy) и NC (1.5 Gy) показују више просечне вредности код донора женског пола.

Није утврђена статистички значајна разлика код осталих цитогенетичких параметара у односу на пол.

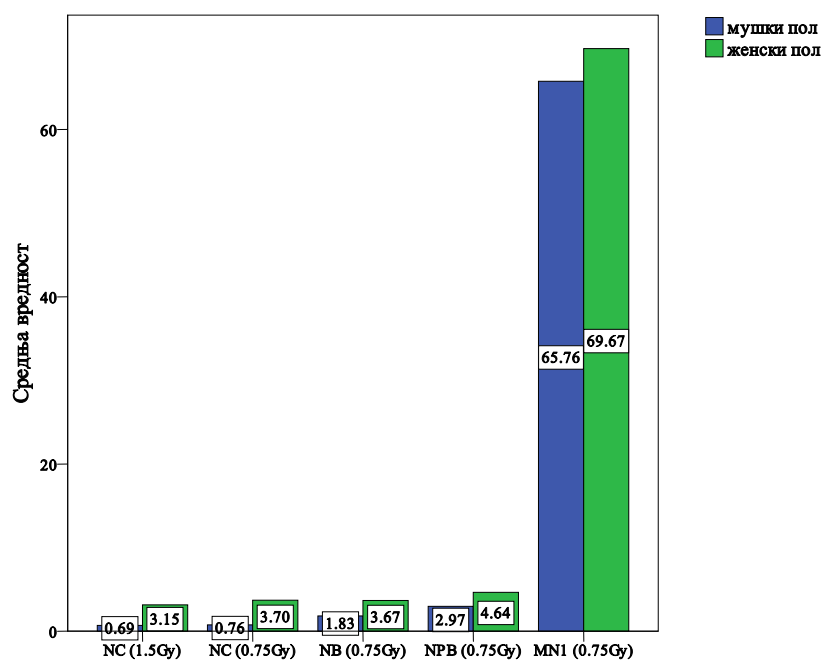
Табела 5 и графикони 6 и 7 приказују просечне вредности поменутих цитогенетичких параметара у односу на пол.

Поређење разлика просечних вредности параметара показало је да, у односу на категорију конзумирања цигарета и животне навике испитаника, не постоје статистички значајне разлике ни у једном од праћених цитогенетичких параметара.

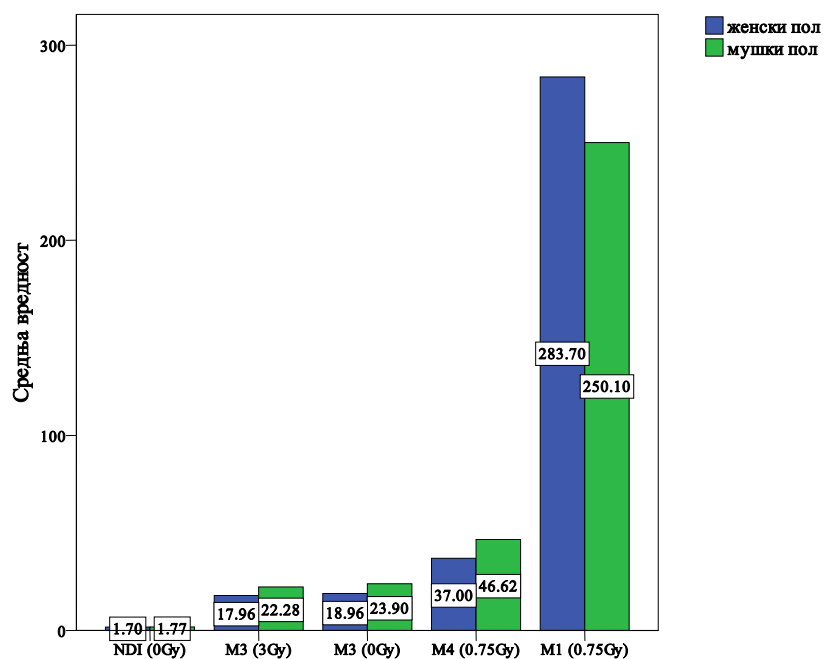
Табела 5. Просечне вредности цитогенетичких параметара у односу на пол, резултати теста и значајност разлике^а

Параметар	Пол	Просек±SD	T	Df	p
M ₃ (0 Gy)	Мушки	23.9±8.32	2.22	54	0.03*
	Женски	18.96±8.33			
MN ₁ (0.75 Gy)	Мушки	65.76±7.02	-1.99	54	0.05*
	Женски	69.67±7.62			
M ₁ (0.75 Gy)	Мушки	250.10±59.9	-2.16	54	0.03*
	Женски	283.70±56.28			
M ₄ (0.75 Gy)	Мушки	46.62±19.25	2.00	54	0.05*
	Женски	37.00±16.47			
NB (0.75 Gy)	Мушки	1.83±1.89	-2.48	54	0.02*
	Женски	3.67±3.47			
NPB (0.75 Gy)	Мушки	2.97±3.14	-2.18	54	0.03*
	Женски	4.74±2.94			
NC (0.75 Gy)	Мушки	0.76±0.95	-4.7	54	0.00**
	Женски	3.70±3.23			
NDI (0.75 Gy)	Мушки	1.77±0.12	2.72	54	0.01**
	Женски	1.70±0.21			
NC (1.5 Gy)	Мушки	0.69±1.36	-4.31	54	0.00**
	Женски	3.15±2.73			
M ₃ (3 Gy)	Мушки	22.28±6.59	2.50	54	0.01**
	Женски	17.96±6.28			

^аТабела приказује само цитогенетичке параметре код којих је t-тест за независне узорке показао значајност разлике у односу на пол; * p<0.05; **p<0.01



Графикон 6. Просечне вредности параметара NC (0.75 Gy), NC (1.5 Gy), NB (0.75 Gy), NPB (0.75 Gy) и MN₁ (0.75Gy) у односу на пол



Графикон 7. Просечне вредности параметара NDI (0Gy), M₃ (3Gy), M₃ (0 Gy), M₄ (0.75Gy) и M₁ (0.75 Gy) у односу на пол

4.1.2 Анализа учесталости цитогенетичких параметара у односу на апликовану дозу зрачења

Са повећањем дозе уочено је повећање учесталости скоро свих анализираних цитогенетичких параметара.

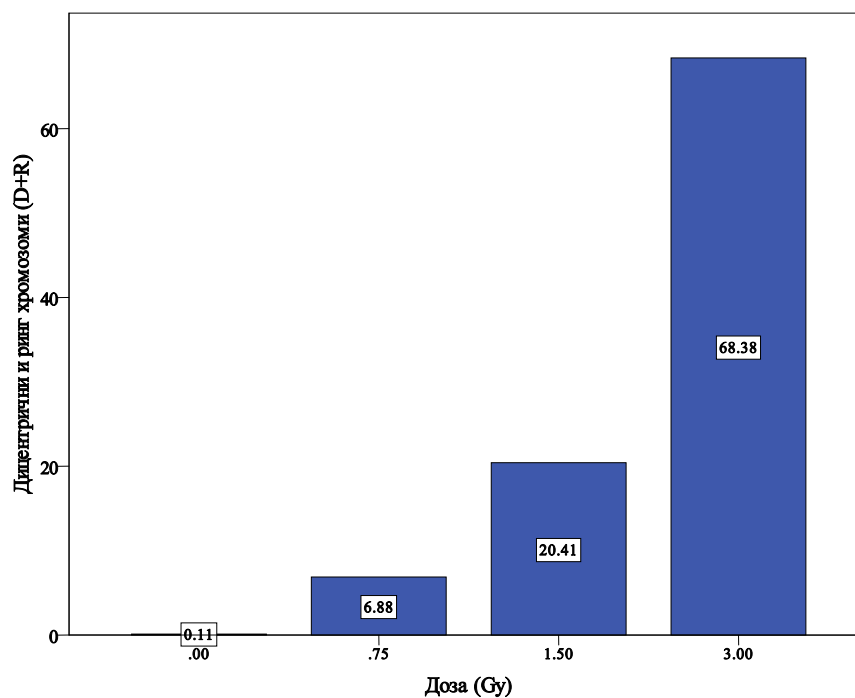
Табела 6 (прилог) приказује средње вредности свих анализираних цитогенетичких параметара при дозама 0 Gy, 0.75 Gy, 1.5 Gy и 3 Gy, резултат теста и значајност разлике. Звездицом су означена обележја која показују дозно-зависне, статистички значајне разлике.

Уочена је статистички значајна разлика ($p < 0.001$) како у учесталостима цитогенетичких параметара при дози од 0 Gy, у односу на озрачене узорке, тако и између узорака озрачених различитим дозама.

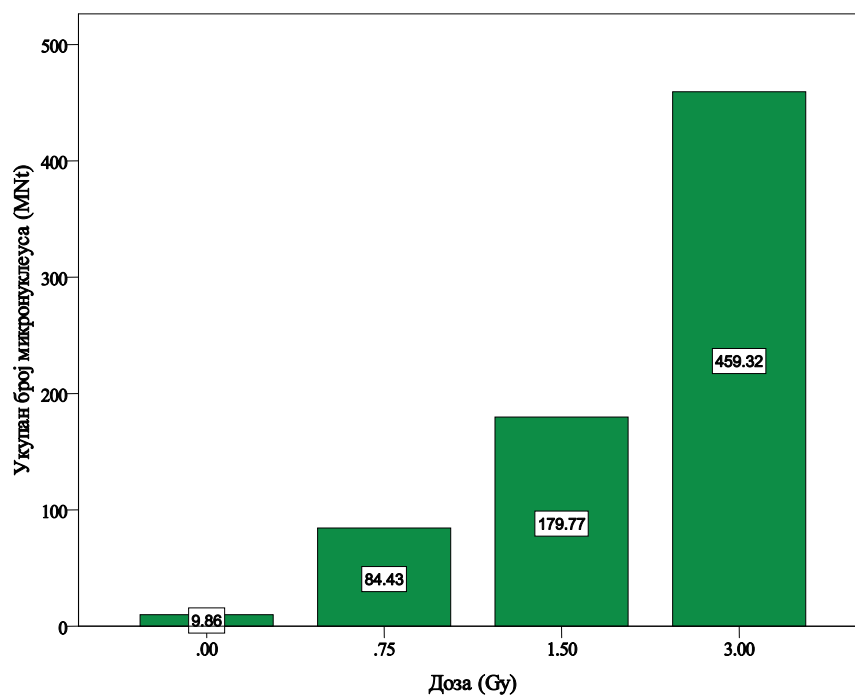
Међу анализираним цитогенетичким параметрима издвајају се три групе: прва, која обухвата параметре D+R, MN_t, MN₁, MN₂, MN₃, MN₄, која се одликује статистички значајном разликом у средњим вредностима на свим апликованим дозама, друга, у коју спадају параметри који показују статистички значајне разлике у средњим вредностима између појединих доза и трећа којој припадају они који не показују дозно зависне разлике. Другој групи припадају: специфични параметри микронуклеус теста - нуклеусни пупови (NB), без статистички значајне разлике на дозама од 0 и 0.75 Gy и нуклеоплазматични мостићи (NPB), без статистички значајне разлике у просечним вредностима између доза од 0.75 и 1.5 Gy. За параметре: MN₅ и MN₆ (параметри који описују дистрибуцију микронуклеуса), параметре цитотоксичности – број апоптоичних и број некротичних ћелија и параметре цитостазе (M₁ - M₄, NDI) није утврђена дозно зависна разлика у средњим вредностима.

Може се, ипак, уочити да је, без обзира на апликовану дозу зрачења и присуство значајности разлике, дистрибуција учесталости цитогенетичких параметара код различитих донаора слична.

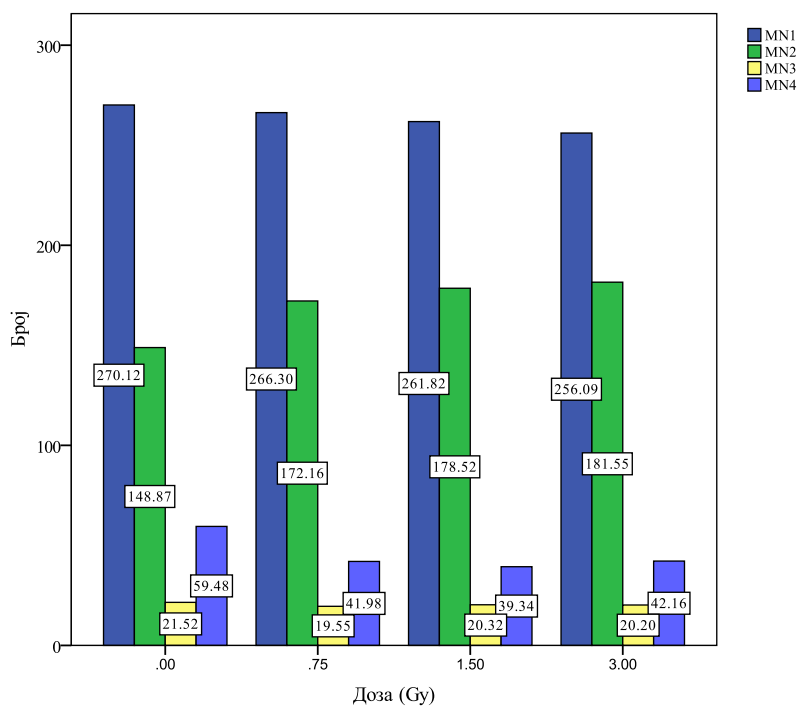
Графикони 8 - 11 приказују средње вредности цитогенетичких параметара D+R, MN_t, MN₁, MN₂, MN₃, MN₄, NB, NPB у односу на све апликоване дозе.



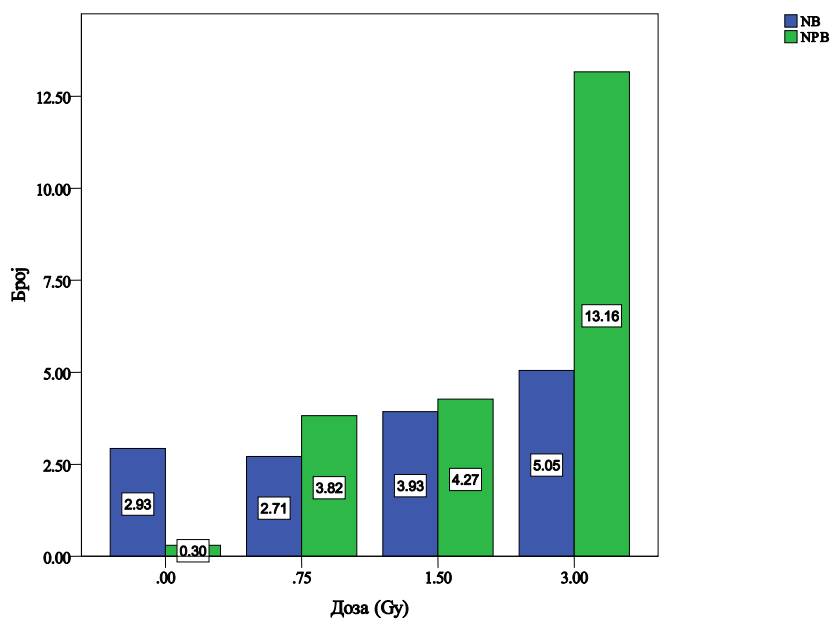
Графикон 8. Средње вредности параметра D+R у односу на апликовану дозу



Графикон 9. Средње вредности параметра MN_t у односу на апликовану дозу



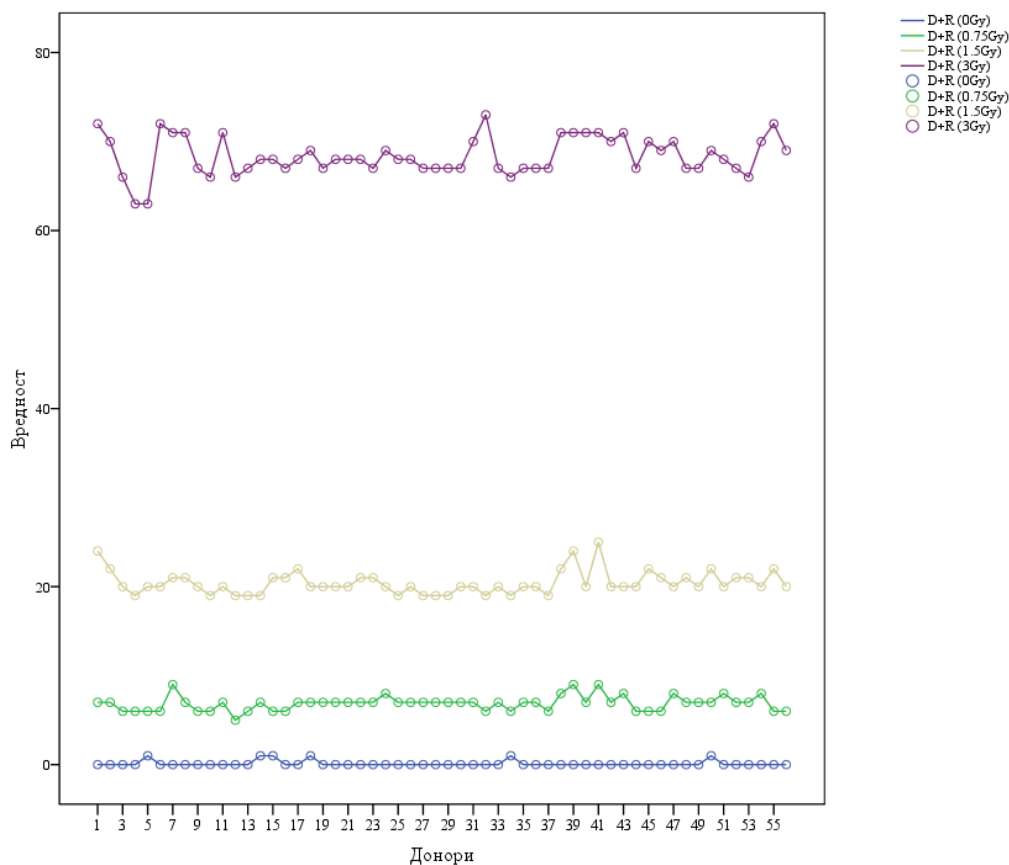
Графикон 10. Средње вредности параметара MN_1 , MN_2 , MN_3 , MN_4 у односу на апликовану дозу



Графикон 11. Средње вредности параметара NB и NPВ у односу на апликовану дозу

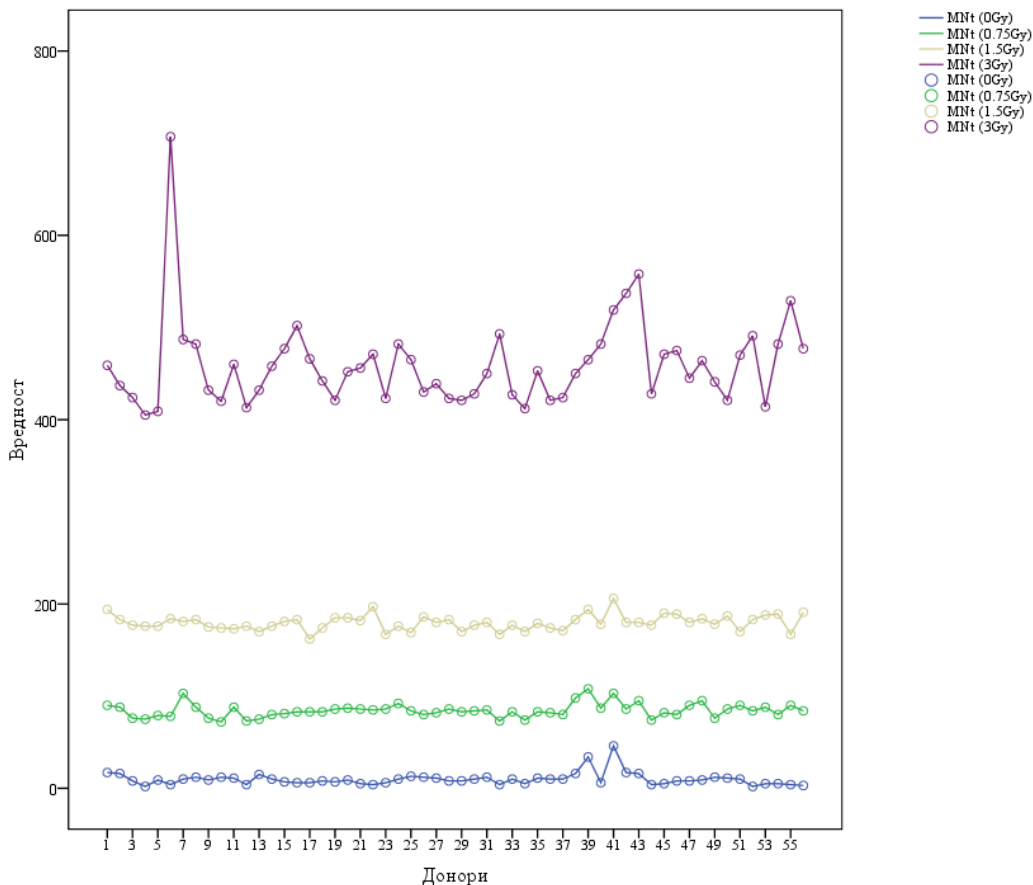
Детаљнија анализа показала је да извесни доноси имају више или ниже учесталости неких цитогенетичких параметара, у односу на просечне учесталости датих параметара при одређеној дози зрачења, тачније да одговоре донора карактерише постојање интер-индивидуалне варијабилности.

Графикон 12 приказује вредности укупног броја дицентричних и ринг хромозома сваког донора на свим апликованим дозама зрачења.



Графикон 12. Вредности укупног броја дицентричних и ринг хромозома сваког донора на свим апликованим дозама

Анализом графикана може се уочити да се доноси најмање међусобно разликују у приносу дицентричних и ринг хромозома при дози 0 Gy, док је интер-индивидуална варијабилност најизраженија на дози од 3 Gy.



Графикон 13. Разлике у вредностима укупног броја микронуклеуса на различитим дозама зрачења

Разлике у вредностима укупног броја микронуклеуса на различитим дозама зрачења приказане су на графикону 13, који показује сличан тренд у одговору на дозама од 0, 0.75 и 1.5 Gy, док се, као и у случају приноса дицентрика и рингова, на дози од 3 Gy уочава израженија интер-индивидуална варијабилност.

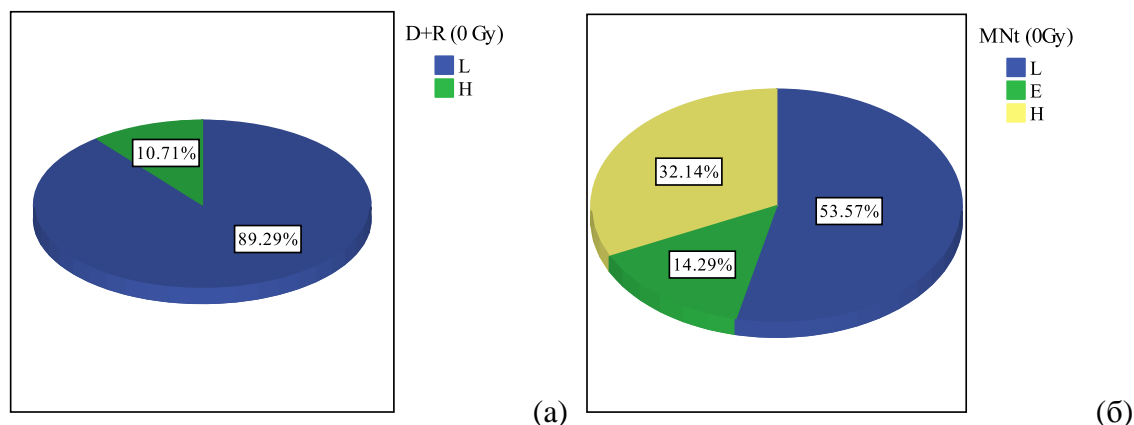
Поређењем графикона 12 и 13 може се уочити мања интер-индивидуална варијабилност у учесталостима дицентричних и ринг хромозома, него у учесталостима микронуклеуса, без обзира на дозу.

Како појединачни одговори на озрачивање одступају од просечног одговора, утврђеног за сваку дозу, уведени су параметри који их дефинишу: виши одговор у односу на просечан (означен са „H“ – од енг. „higher than average“), нижи у односу на просечан (означен са „L“ од енг. „lower than average“) и једнак са просечним (означен са „E“ од енг. „equal as average“). Просечан одговор при датој дози

израчунат је као средња вредност учесталости датог цитогенетичког параметра за све доноре при датој дози.

Графикони 14-17 приказују процентуалну заступљеност појединачних одговора донора на свакој од апликованих доза зрачења. Одговори су изражени кроз учесталост параметара: укупан број дицентричних и ринг хромозома и укупан број микронуклеуса.

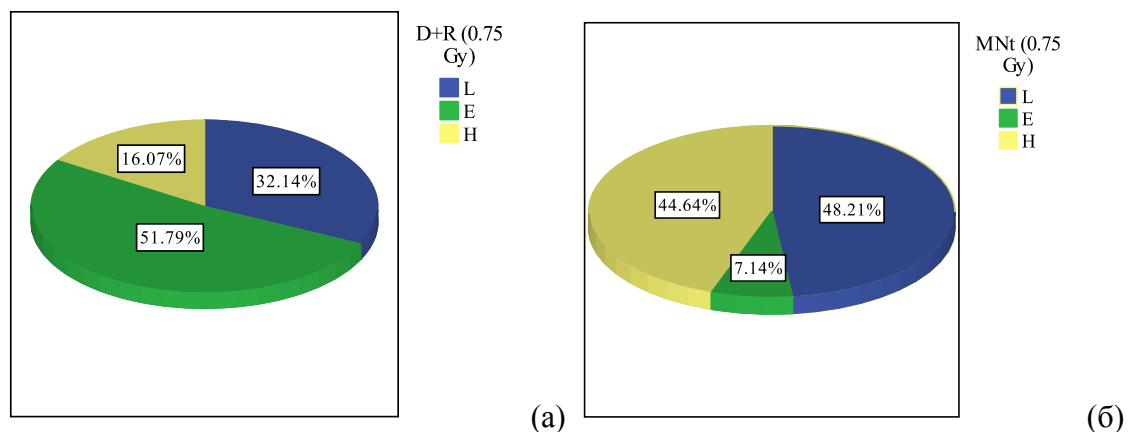
Табела 7, која приказује појединачни одговор сваког донора, изражен кроз учесталост параметара D+R и MN_t, дата је у прилогу.



Графикон 14. Процентуална заступљеност појединачних одговора донора на дози од 0 Gy изражена учесталošћу параметара (а) D+R (б) MN_t

У узорцима озраченим дозом од 0 Gy може се уочити одсуство одговора једнаког групном просеку за параметар D+R, при чему највећи број испитаника (скоро 90%) показује (у овом специјалном случају) очекивани, нижи одговор од просека, односно принос од 0 дицентричних и ринг хромозома на 1000 анализираних метафазних фигура. Само 10.71% испитаника показује виши одговор, односно присуство једног дицентричног/ринг хромозома у метафазама.

У случају одговора израженог кроз укупан број микронуклеуса, уочава се већа варијабилност, поново са највећим бројем испитаника са нижим учесталостима праћеног параметра у односу на групни просек (53.57%).



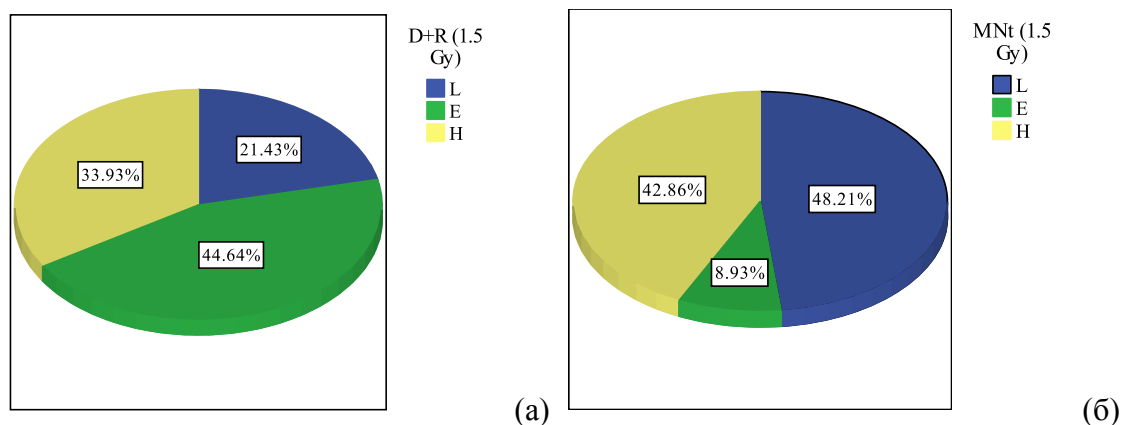
Графикон 15. Процентуална заступљеност појединачних одговора донора на дози од 0.75 Gy изражена учесталošћу параметара (а) D+R (б) MN_t

При дози од 0.75 Gy, за параметар укупан број дицентрика и рингова, уочава се разлика, како у односу на исти параметар при нижој дози (0 Gy), тако и у односу на принос микронуклеуса при истој дози (0.75 Gy).

У првој ситуацији разлика се огледа у присуству чак 52% испитаника са учесталošћу дицентрика/рингова једнакој групном просеку (на дози од 0 Gy ниједан испитаник није имао просечну учесталост) и, следствено, мањој процентуалној заступљености испитаника са нижим одговором (32.14% на 0.75 Gy у односу на 89.29% испитаника на дози од 0 Gy). Процент испитаника са вишим одговором већи је у односу на исту групу при дози од 0 Gy.

У другом случају, најочљивија је разлика у проценту испитаника са просечним одговором (51.79% за дицентрике и рингове у односу на 7.14% за параметар MN_t), која говори о, очекиваној, већој варијабилности у одговору, израженој микронуклеус тестом, у односу на „златни стандард“ у биодозиметрији – дицентрик тест.

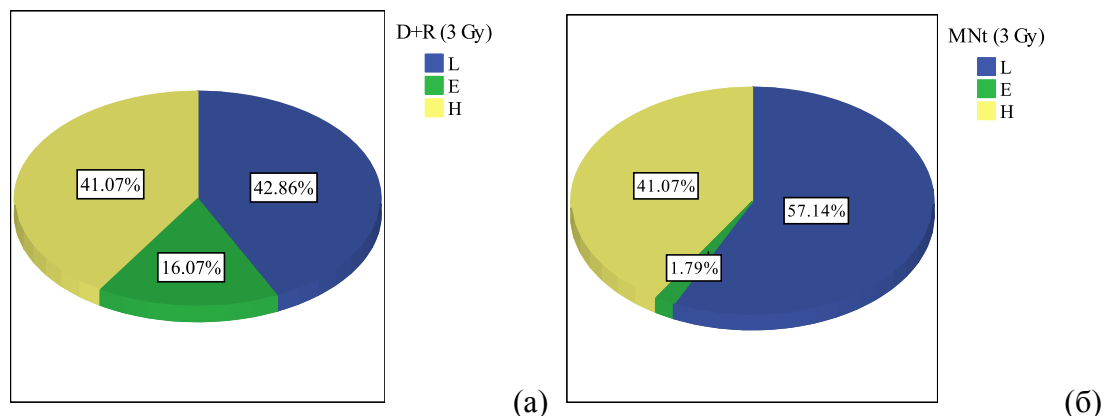
Даље се, за одговор изражен учесталošћу микронуклеуса на 1000 анализираних бинуклеарних лимфоцита, може уочити скоро једнака заступљеност испитаника са вишим, односно нижим одговором у односу на просек при датој дози.



Графикон 16. Процентуална заступљеност појединачних одговора донора на дози од 1.5 Gy изражена учесталошћу параметара (a) D+R (б) MN_t

Процентуална заступљеност одговора на дози од 1.5 Gy и у овом случају указује на мању варијабилност у учесталостима дицентричних и ринг хромозома у односу на микронуклеусе. Највећи проценат испитаника на овој дози има учесталост дицентрика и рингова блиску групном просеку, док се процентуална заступљеност донора са вишим одговором повећала у односу на ниже дозе (са 10.71% на 0 Gy, преко 16.07% на 0.75 Gy, до скоро 34% на дози од 1.5 Gy).

Процентуална заступљеност одговора мерена учесталошћу микронуклеуса слична је за дозе 0.75 и 1.5 Gy, са нешто већом заступљеношћу донора са нижим одговором, на рачун оних који су бурније реаговали на озрачивање.



Графикон 17. Процентуална заступљеност појединачних одговора донора на дози од 3 Gy изражена учесталошћу параметара (а) D+R (б) MN_t

Доза од 3 Gy одликује се специфичном расподелом заступљености – исти проценат донора са вишим одговором у односу на просек, без обзира на посматране биомаркере, при чему се, у складу са очекивањима, у случају дицентричних и ринг хромозома уочава већа заступљеност донора са одговором блиским групном просеку, него у случају микронуклеуса.

У случају дицентрика и рингова уочава се и слична процентуална заступљеност вишег и нижег одговора у односу на просек, док се за исту дозу, виши и нижи одговори изражени учесталошћу микронуклеуса, разликују у заступљености (41.07% испитаника имало је виши, а 57.14% испитаника нижи одговор од просечног).

У односу на ниже дозе, уочава се процентуално мања заступљеност одговора блиских просеку, поготово за микронуклеус тест.

4.2 Одређивање показатеља оксидативног статуса и утврђивање интер-индивидуалне варијабилности у одговору на зрачење

4.2.1 Параметри оксидативног стреса и антиоксидантног одговора (MDA, SOD, CAT, AOPP)

Биохемијски параметри оксидативног стреса и антиоксидантног одговора, анализирани у овој студији обухватају: концентрацију малондиалдехида (MDA) и завршних оксидативних продуката протеина (AOPP) - показатеље оксидативног стреса и активност ензима супероксид дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT), као параметре антиоксидантне заштите.

У табели 8, датој у прилогу, приказане су просечне, минималне и максималне вредности свих анализираних биохемијских параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора на свим апликованим дозама зрачења, за цео узорак, женски и мушки пол, пушаче и непушаче.

4.2.1.1 Анализа вредности параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора у односу на пол, навику конзумирања цигарета и животне навике испитаника

Вредности параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора на свим апликованим дозама анализирани су у односу на пол, навику конзумирања цигарета и животне навике испитаника.

Статистичка анализа показала је значајност разлике између испитаника мушког и женског пола у средњим вредностима следећих параметара: активност супероксид-дисмутазе (параметар SOD) на 0 Gy; концентрација малондиалдехида (параметар MDA) и активност каталазе (параметар CAT) на дози од 0.75 Gy. За параметре SOD и MDA уочене су веће средње вредности код особа мушког пола, док су у случају параметра CAT већу просечну учесталост имале жене.

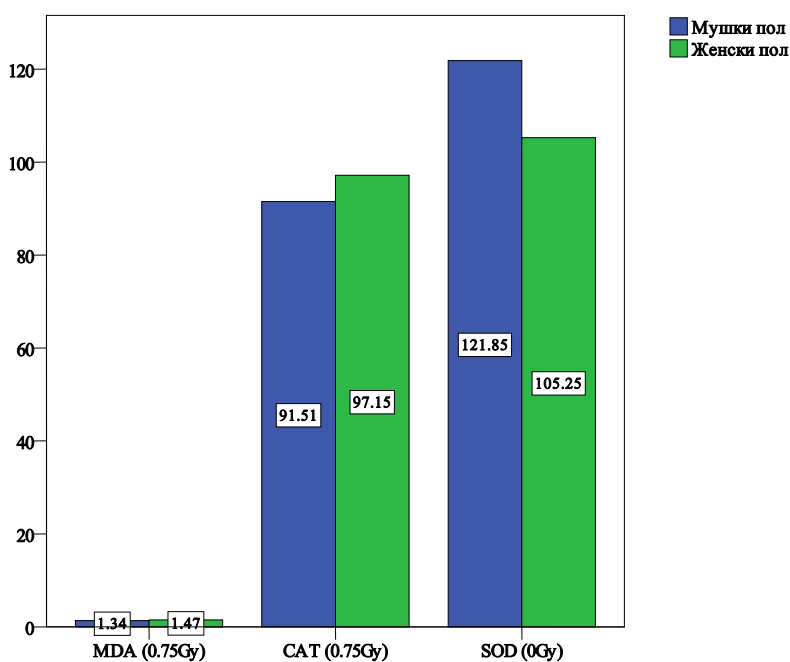
Није утврђена статистички значајна разлика код осталих параметара у односу на пол.

Табела 9 и графикон 18 приказују просечне вредности наведених параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора у односу на пол.

Табела 9. Просечне вредности параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора у односу на пол, резултати теста и значајност разлике^a

Параметар	Пол	Просек±SD	T	Df	p
SOD (0 Gy)	Мушки	121.85±24.55	2.8	54	0.01**
	Женски	105.25±19.27			
MDA (0.75 Gy)	Мушки	1.47±0.23	2.01	54	0.05*
	Женски	1.34±0.26			
CAT (0.75 Gy)	Мушки	91.51±10.80	-2.04	54	0.05*
	Женски	97.15±9.85			

^aТабела приказује само параметре оксидативног стреса и антиоксидантног одговора код којих је t-тест за независне узорке показао значајност разлике у односу на пол; * p<0.05; **p<0.01



Графикон 18. Просечне вредности параметара MDA (0.75Gy), CAT (0.75Gy) и SOD (0Gy) у односу на пол

Поређење разлика просечних вредности параметара показало је да, у односу на категорију конзумирања цигарета, статистички значајне разлике постоје између

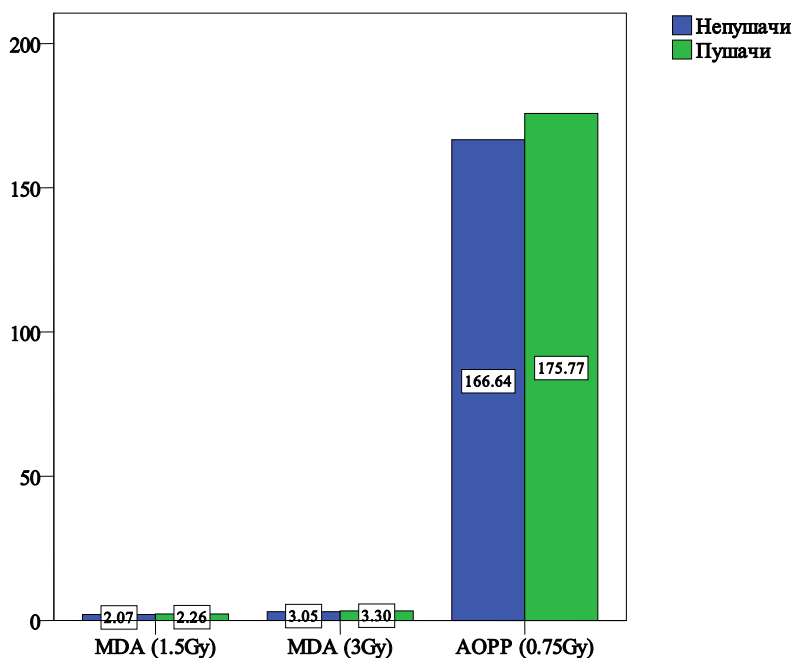
пушача и непушача за: АОРР на дози од 0.75 Gy и параметар MDA на дозама од 1.5 Gy и 3 Gy, у свим ситуацијама са вишим просечним вредностима параметара код пушача.

Табела 10 и графикон 19 приказују просечне вредности наведених параметара оксидативног стреса у односу на навику конзумирања цигарета.

Табела 10. Просечне вредности параметара оксидативног стреса у односу на навику конзумирања цигарета, резултати теста и значајност разлике^а

Параметар	Навика конзумирања цигарета	Просек±SD	T	Df	p
АОРР (0.75 Gy)	Непушач	166.64±13.77	-2.52	54	0.01**
	Пушач	175.77±11.04			
MDA (1.5 Gy)	Непушач	2.07±0.27	-2.42	54	0.02*
	Пушач	2.26±0.28			
MDA (3 Gy)	Непушач	3.05±0.39	-2.66	54	0.01*
	Пушач	3.30±0.17			

^аТабела приказује само параметре оксидативног стреса код којих је t-тест за независне узорке показао значајност разлике у односу на навику конзумирања цигарета; * p<0.05; **p<0.01



Графикон 19. Просечне учесталости параметара MDA (1.5 Gy), MDA (3 Gy) и АОРР (0.75 Gy) у односу на навику конзумирања цигарета

У односу на животне навике испитаника, не постоје статистички значајне разлике ни у једном од праћених параметара оксидативног стреса.

4.2.1.2 *Анализа вредности параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора у односу на апликовану дозу зрачења*

Повећана концентрација свих анализираних параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора уочена је са повећањем дозе, тј. посматрани параметри показали су дозно-зависно повећање концентрације.

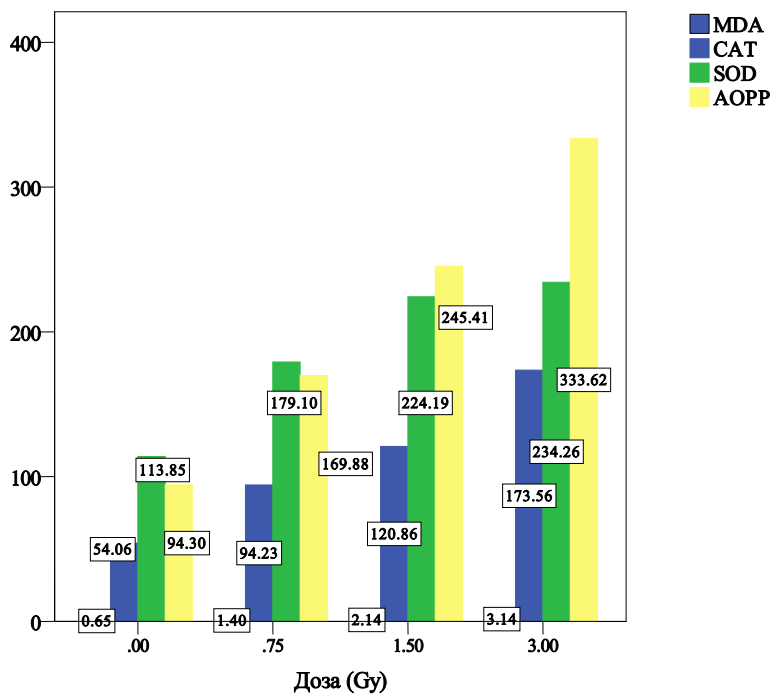
Табела 11 приказује средње вредности свих анализираних параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора при дозама 0 Gy, 0.75 Gy, 1.5 Gy и 3 Gy, резултат теста и значајност разлике. Звездицом су означена обележја која показују дозно-зависне статистички значајне разлике.

Табела 11. Средње вредности свих анализираних параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора у односу на апликовану дозу зрачења, резултат теста и значајност разлике^а

Параметар	Просек±СД	t	df	P
MDA (0Gy) - MDA (0.75Gy)	0.65±0.32 – 1.4±2.57	-14.75	55	0.00**
MDA (0.75Gy) - MDA (1.5Gy)	1.4±2.57 – 2.14±0.29	-13.60	55	0.00**
MDA (1.5Gy) - MDA (3Gy)	2.14±0.29 – 3.14±0.35	-19.68	55	0.00**
SOD (0Gy) - SOD (0.75Gy)	113.85±23.50 – 179.10±14.02	-19.79	55	0.00**
SOD (0.75Gy) - SOD (1.5Gy)	179.10±14.02 – 224.19±11.55	-17.30	55	0.00**
SOD (1.5Gy) - SOD (3Gy)	224.19±11.55 – 234.26±14.96	-3.95	55	0.00**
CAT (0Gy) - CAT (0.75Gy)	54.06±8.74 – 94.23±10.65	-20.89	55	0.00**
CAT (0.75Gy) - CAT (1.5Gy)	94.23±10.65 – 120.86±5.27	-17.36	55	0.00**
CAT (1.5Gy) - CAT (3Gy)	120.86±5.27 – 173.56±16.45	-23.71	55	0.00**
AOPP (0Gy) – AOPP (0.75Gy)	94.30±22.84 – 169.88±13.49	-21.18	55	0.00**
AOPP (0.75Gy) – AOPP (1.5Gy)	169.88±13.49 – 245.41±16.49	-27.70	55	0.00**
AOPP (1.5Gy) – AOPP (3Gy)	245.41±16.49 – 333.62±12.80	-33.73	55	0.00**

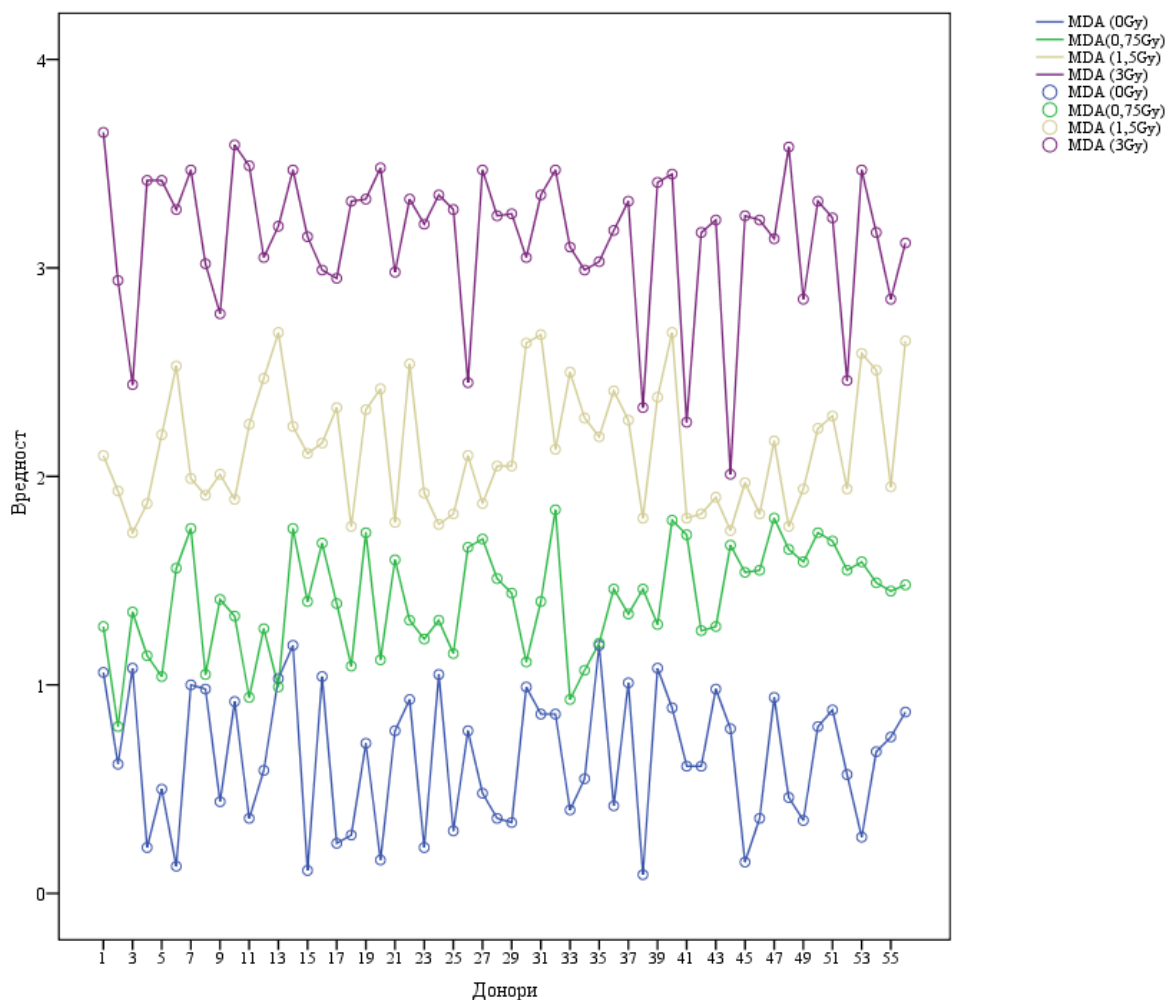
^аMDA-малондиалдехид; SOD-супероксид-дисмутаза; CAT-каталаза; AOPP-завршни продукти разградње протеина; * p<0.05; **p<0.01

Графикон 20 приказује средње вредности параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора у односу на све апликоване дозе.



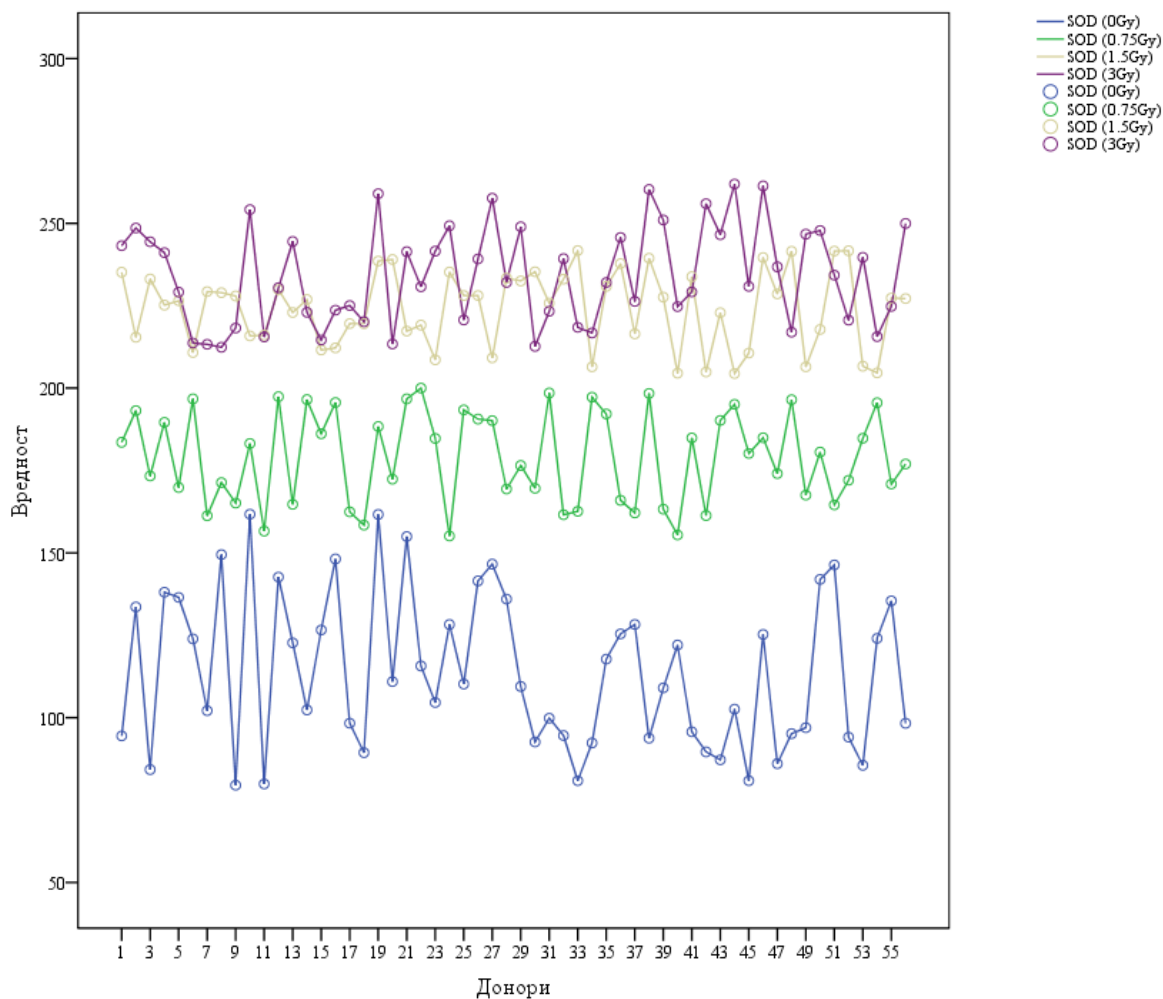
Графикон 20. Средње вредности параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора на свим апликованим дозама

Детаљна анализа појединачног одговора сваког донора показала је, као и у случају цитогенетичких параметара, постојање интер-индивидуалне варијабилности. У односу на просечне концентрације посматраних параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора, неки донори имали су више, а неки ниже вредности.



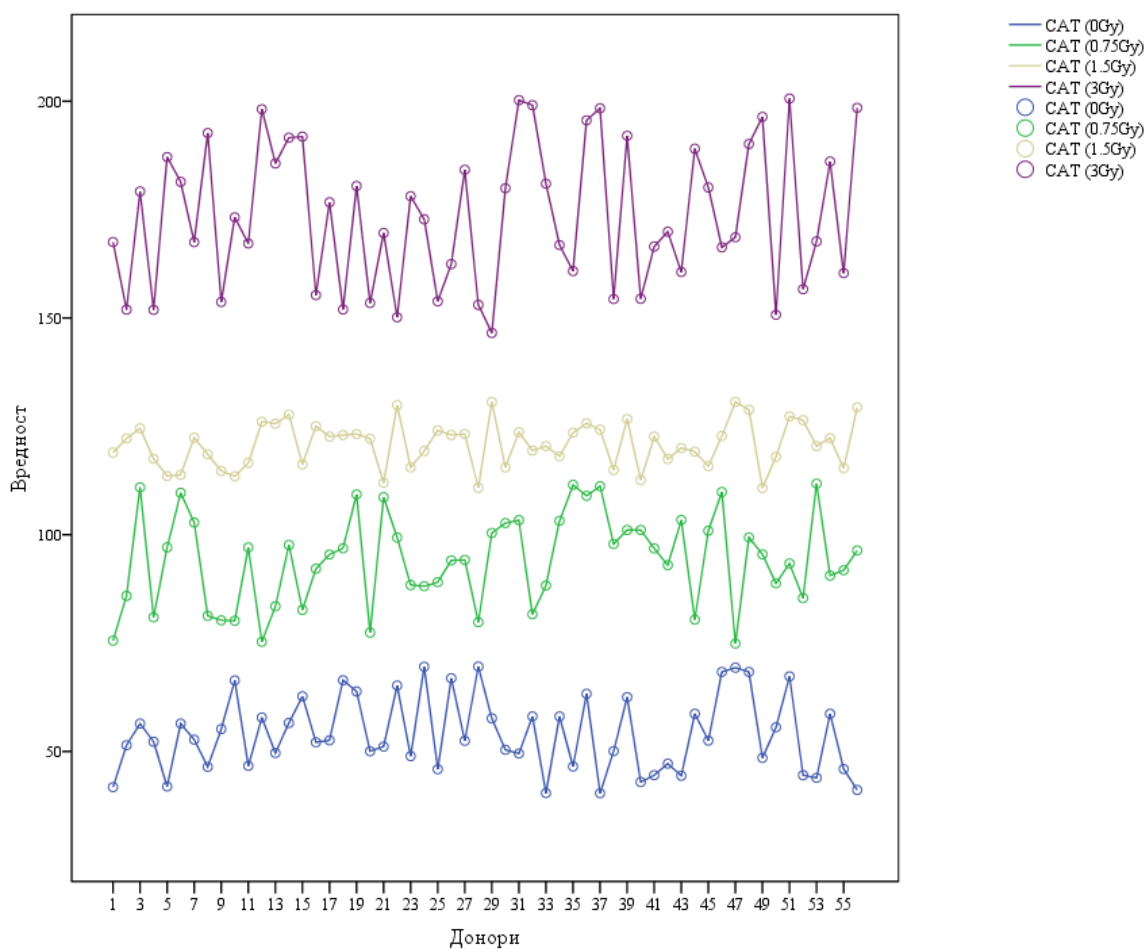
Графикон 21. Разлике у вредностима концентрације малондиалдехида за сваког донора на свим апликованим дозама

Графикон 21 приказује разлике у вредностима концентрације малондиалдехида за сваког донора на свим апликованим дозама, које указују на постојање изражене интер-индивидуалне варијабилности на свим дозама зрачења.



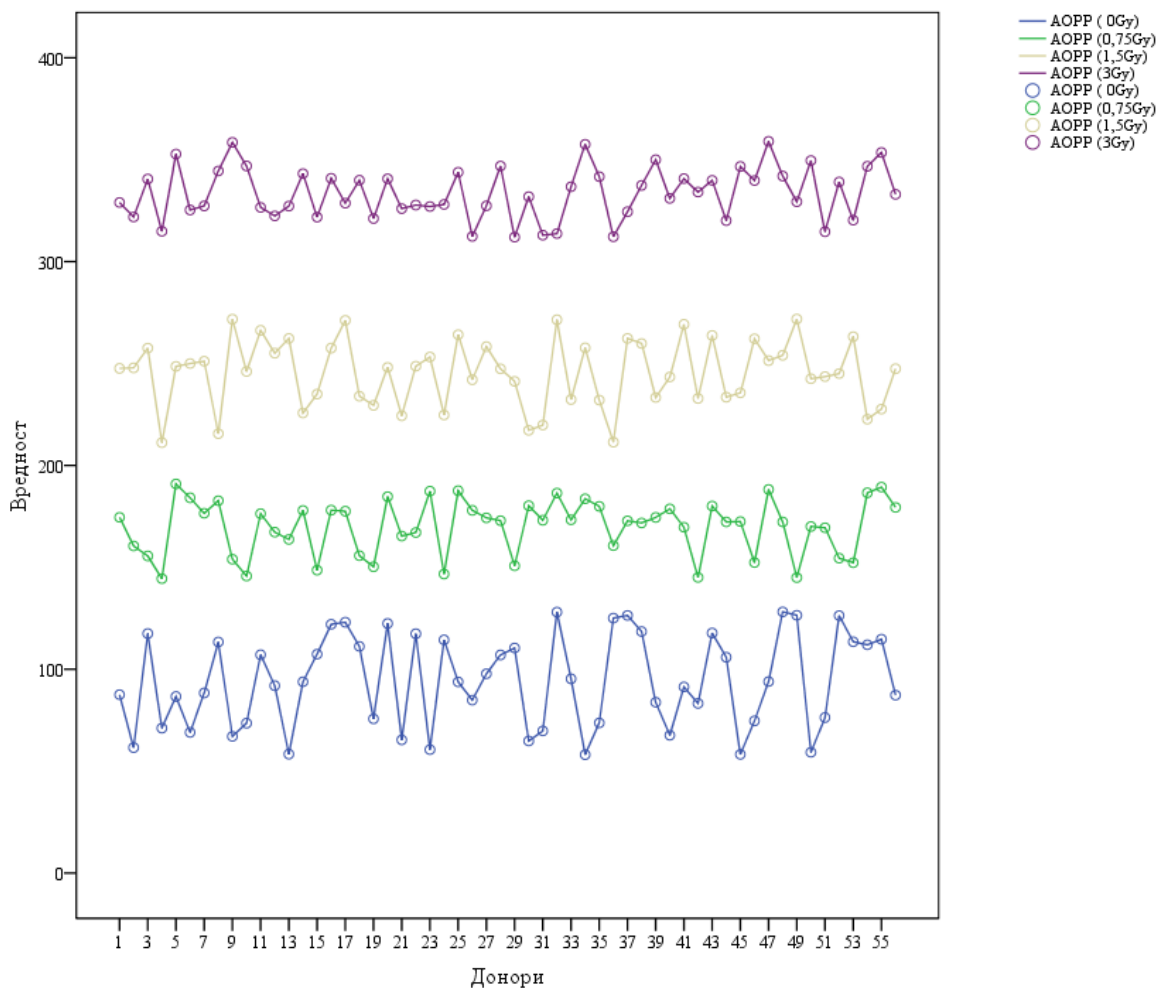
Графикон 22. Вредности параметра активност супероксид-дисмутазе за све доноре при свим дозама

Вредности параметра активност супероксид-дисмутазе за све доноре при свим дозама, приказане су на графикону 22. Анализом се, као и у случају малондиалдехида, уочава постојање разлика у појединим одговорима на свим апликованим дозама.



Графикон 23. Вредности параметра активност каталазе за све доноре на свим апликованим дозама зрачења

Детаљнијом анализом графикана 23, који приказује вредности параметра активност каталазе, за све доноре на свим апликованим дозама зрачења, уочава се најмања варијабилност у одговору на дози од 1.5 Gy, приближно једнака на дозама од 0 и 0.75 Gy и највећа на дози од 3 Gy.



Графикон 24. Вредности параметра концентрација АОРР за све доноре на свим дозама

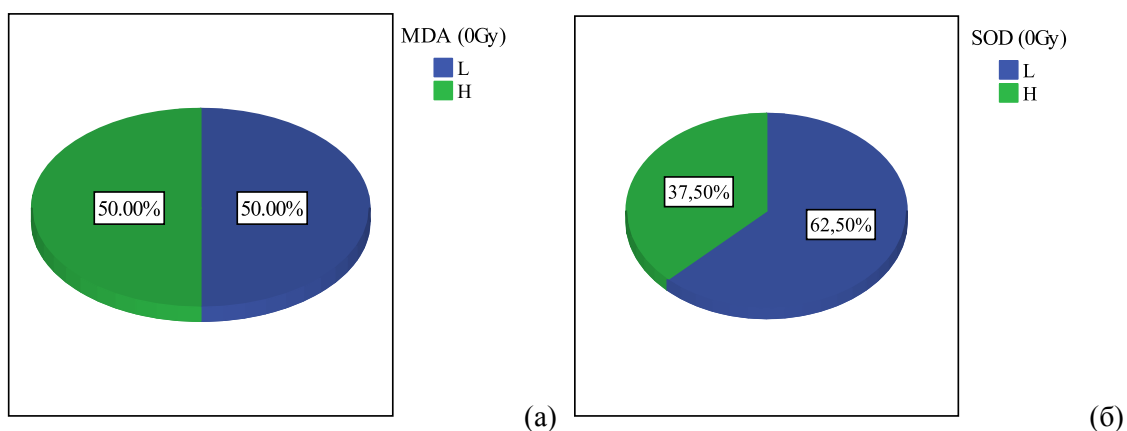
Графикон 24 приказује разлике у вредностима параметра концентрација АОРР на свим дозама зрачења. За разлику од осталих биохемијских параметара, у овом случају уочава се приближно једнака варијабилност у одговору на свим дозама.

Одговор изражен цитогенетичким параметрима одликује се мањим разликама међу донорима, у односу на анализирани биохемијске параметре, посебно на нижим дозама зрачења.

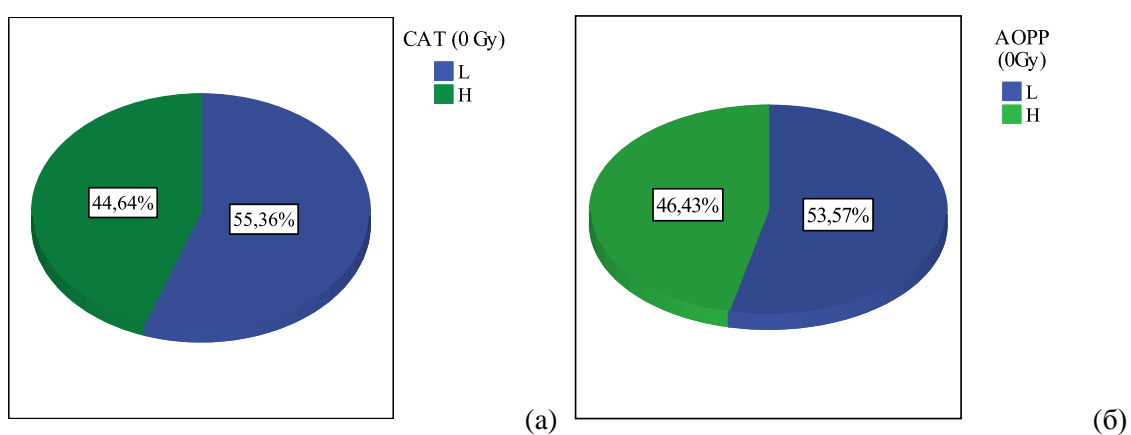
Као и у случају цитогенетичких параметара, утврђено одступање одговора донора у односу на просек, дефинисано је на следећи начин: виши одговор у односу на просечан (означен са „H“ – од енг. „higher than average“), нижи у односу на просечан (означен са „L“ од енг. „lower than average“) и једнак са просечним (означен са „E“ од енг. „equal as average“). Просечан одговор при датој дози израчунат је као средња вредност учесталости датог параметра оксидативног стреса за све доноре при датој дози.

Графикони 25-32 приказују процентуалну заступљеност одговора донора, изражених параметрима оксидативног стреса и антиоксидантног одговора.

Табела 12, дата у прилогу, приказује појединачне одговоре сваког донора на свим дозама, за праћене параметре.

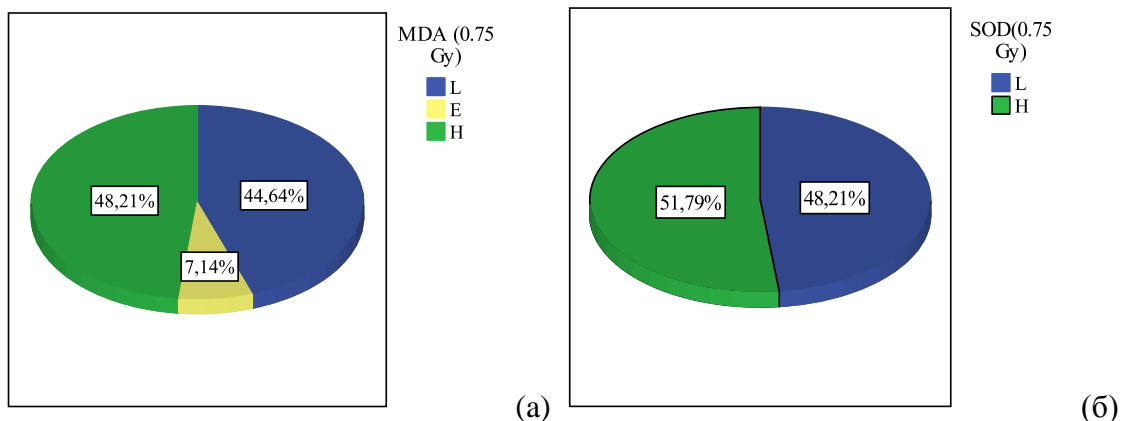


Графикон 25. Процентуална заступљеност појединачних одговора донора на дози од 0 Gy изражена учесталошћу параметара MDA (а) и SOD (б)

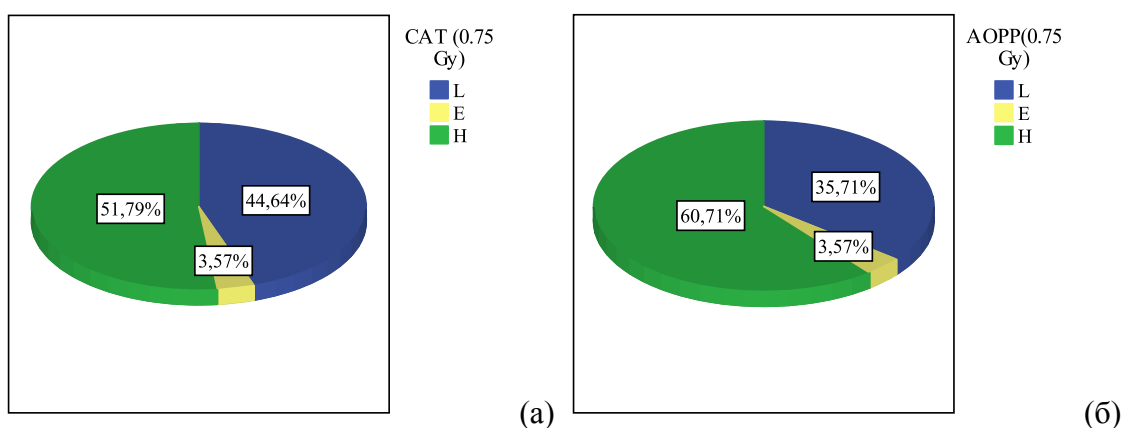


Графикон 26. Процентуална заступљеност појединачних одговора донора на дози од 0 Gy изражена учесталошћу параметара CAT (а) и AOPP (б)

При дози од 0 Gy за све параметре уочава се приближно једнака заступљеност донора са вишим и нижим одговором у односу на просек, уз одсуство одговора блиских просеку.

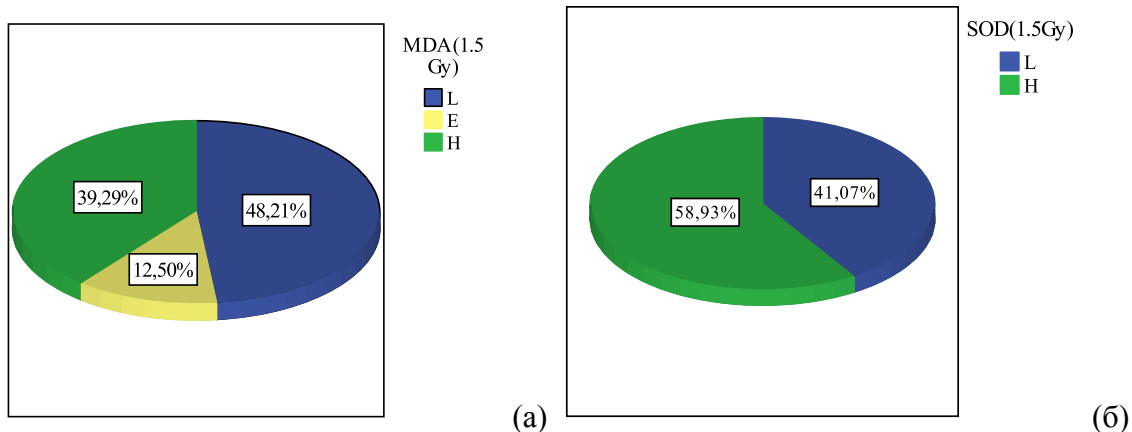


Графикон 27. Процентуална заступљеност појединачних одговора донора на дози од 0.75 Gy изражена учесталошћу параметара MDA (а) и SOD (б)

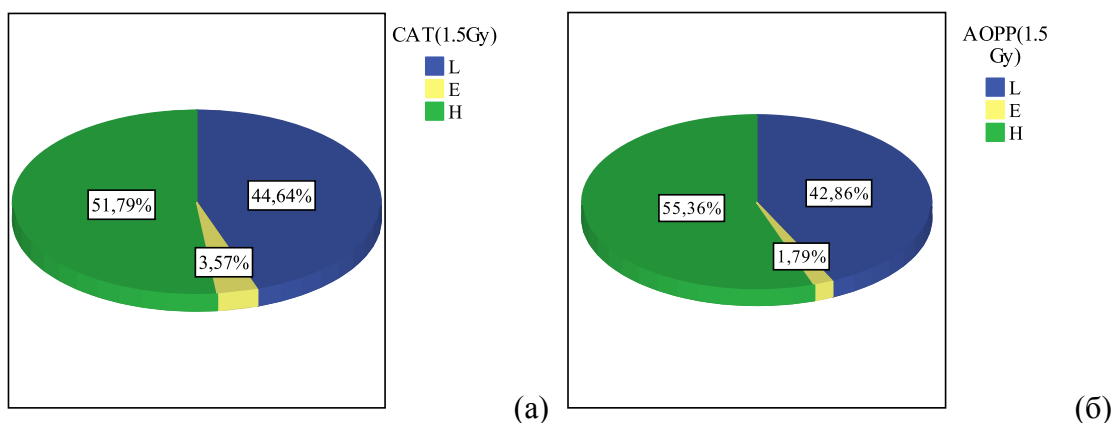


Графикон 28. Процентуална заступљеност појединачних одговора донора на дози од 0.75 Gy изражена учесталошћу параметара CAT (а) и AOPP (б)

На дози од 0.75 Gy једино за параметар SOD уочава се одсуство испитаника са одговором блиским групном просеку, док у случају остала три параметра такви испитаници постоје, али је њихова заступљеност мања од 10%. За сва четири параметра при овој дози уочава се већа заступљеност испитаника са вишим одговором.

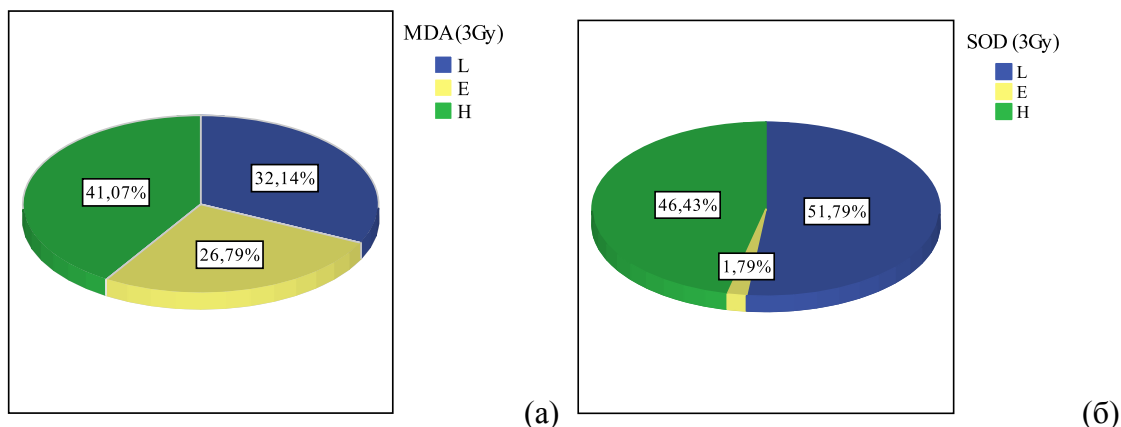


Графикон 29. Процентуална заступљеност појединачних одговора донора на дози од 1.5 Gy изражена учесталošћу параметара MDA (а) и SOD (б)

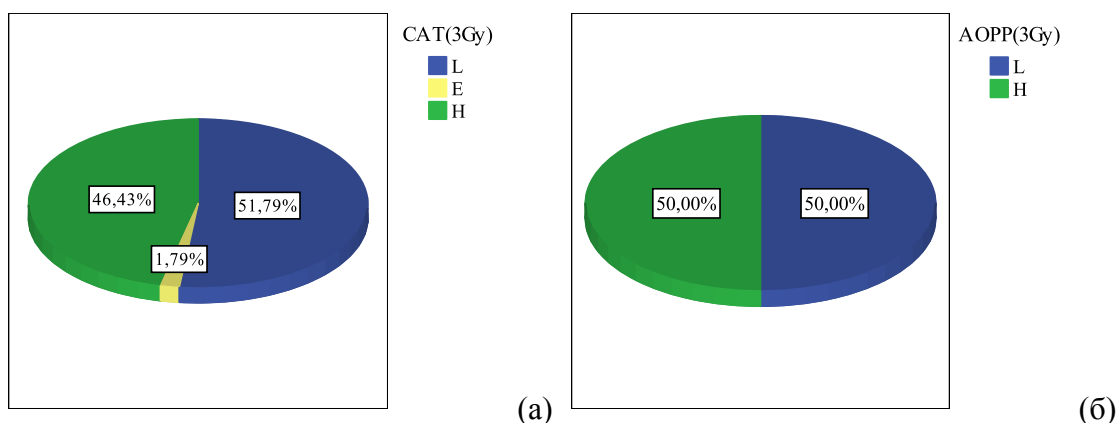


Графикон 30. Процентуална заступљеност појединачних одговора донора на дози од 1.5 Gy изражена учесталošћу параметара CAT (а) и AOPP (б)

Доза од 1.5 Gy карактерише се сличном расподелом одговора као доза од 0.75 Gy, поново са одсуством одговора блиских просеку за параметар активност SOD.



Графикон 31. Процентуална заступљеност појединачних одговора донара на дози од 3 Gy изражена учесталошћу параметара MDA (а) и SOD (б)



Графикон 32. Процентуална заступљеност појединачних одговора донара на дози од 3 Gy изражена учесталошћу параметара CAT (а) и AOPP (б)

На највишој апликованој дози уочава се слична расподела одговора донара за параметар MDA, мали проценат одговора блиских просеку, уз процентуално најзаступљеније донаре са нижим одговором од просечног за параметар SOD, већи проценат донара са нижим одговором у односу на просек за параметар CAT и једнаку заступљеност испитаника са вишим и нижим одговором за параметар AOPP.

Поређењем цитогенетичких и биохемијских параметара може се уочити већа интер-индивидуална варијабилност у другој групи параметара без обзира на дозу.

4.2.2 Параметри оксидативног статуса (TOS, TAS, IOS)

Биохемијски параметри оксидативног статуса, анализирани у овој студији, обухватају: тотални оксидативни (TOS), тотални антиоксидантни статус (TAS), и индекс оксидативног стреса (IOS).

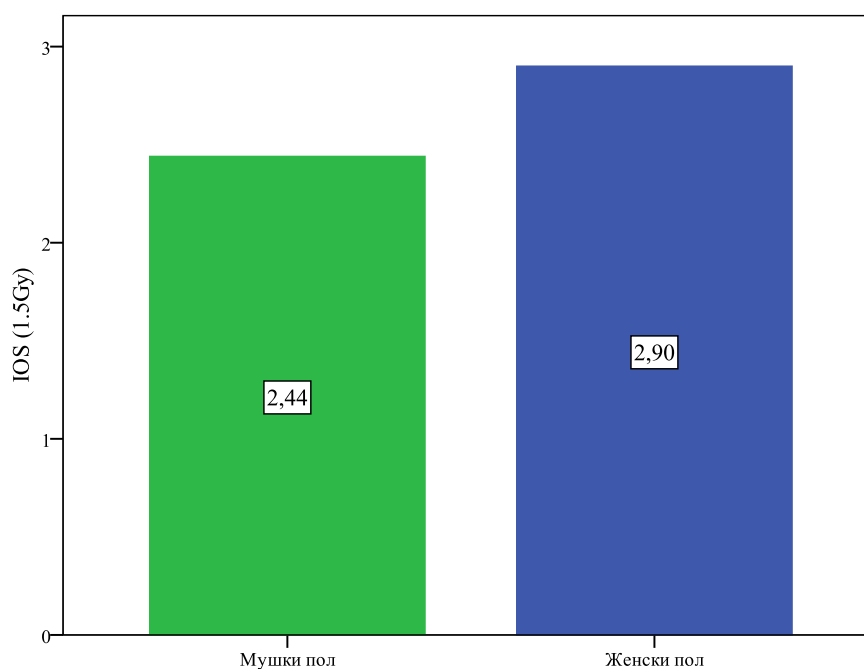
Табела 13, дата у прилогу, приказује просечне, минималне и максималне вредности датих биохемијских параметара на свим апликованим дозама зрачења, за цео узорак, женски и мушки пол, пушаче и непушаче.

4.2.2.1 Анализа вредности параметара оксидативног статуса у односу на пол, навику конзумирања цигарета и животне навике испитаника

Статистичка анализа показала је значајност разлике ($p < 0.05$) између испитаника мушког и женског пола у средњим вредностима параметра индекс оксидативног стреса (IOS) на дози од 1.5 Gy, са вишим средњим вредностима датог параметра код испитаника женског пола (2.9 ± 0.87) у односу на мушки (2.44 ± 0.79).

Није утврђена значајна разлика код осталих параметара у односу на пол.

Графикон 33 приказује разлике у средњим вредностима параметра IOS (1.5 Gy) у односу на пол донора.



Графикон 33. Средње вредности параметара IOS (1.5 Gy) у односу на пол донора

Поређење разлика просечних вредности параметара показало је да, у односу на категорију конзумирања цигарета и животне навике испитаника, не постоје статистички значајне разлике ни у једном од праћених параметара оксидативног статуса.

4.2.2.2 Анализа вредности параметара оксидативног статуса у односу на апликовану дозу зрачења

Сви анализирани параметри оксидативног статуса (осим параметра TAS на 0 Gy и 0.75 Gy) показали су статистички значајне разлике у просечним вредностима у односу на апликовану дозу зрачења. Параметар TAS показао је одсуство значајности разлике на дозама 0 и 0.75 Gy, а затим статистички значајно смањење средње вредности са повећањем апликоване дозе, почев од 0.75 Gy.

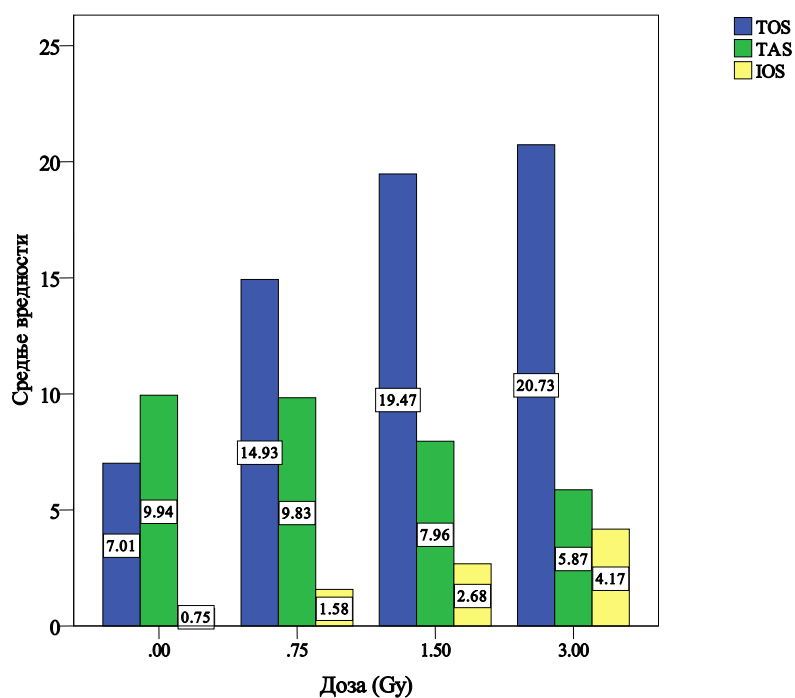
Табела 14 приказује средње вредности свих анализираних параметара при дозама 0 Gy, 0.75 Gy, 1.5 Gy и 3 Gy, резултат теста и значајност разлике. Звездицом су означена обележја која показују дозно-зависне статистички значајне разлике.

Табела 14. Средње вредности свих анализираних параметара оксидативног статуса у односу на апликовану дозу зрачења, резултат теста и значајност разлике^а

Параметар	Просек±СД	t	df	P
TOS (0Gy) - TOS (0.75Gy)	7.01±2.29 – 14.93±1.58	-22.68	55	0.00**
TOS (0.75Gy) - TOS (1,5Gy)	14.93±1.58 – 19.47±1.37	-16.40	55	0.00**
TOS (1.5Gy) - TOS (3Gy)	19.47±1.37– 20.73±1.17	-5.19	55	0.00**
TAS (0Gy) - TAS (0.75Gy)	9.94±2.80 – 9.83±1.93	0.22	55	0.83
TAS (0.75Gy) - TAS (1.5Gy)	9.83±1.93– 7.96±2.31	4.62	55	0.00**
TAS (1.5Gy) - TAS (3Gy)	7.96±2.31– 5.87±2.07	5.01	55	0.00**
IOS (0Gy) - IOS (0.75Gy)	0.75±0.31 – 1.58±0.34	-13.67	55	0.00**
IOS (0.75Gy) - IOS (1.5Gy)	1.58±0.34– 2.68±0.86	-9.29	55	0.00**
IOS (1.5Gy) - IOS (3Gy)	2.68±0.86 – 4.17±2.05	-4.90	55	0.00**

^аTOS-тотални оксидативни статус; TAS-тотални антиоксидантни статус; IOS-индекс оксидативног стреса; * p<0.05; **p<0.01

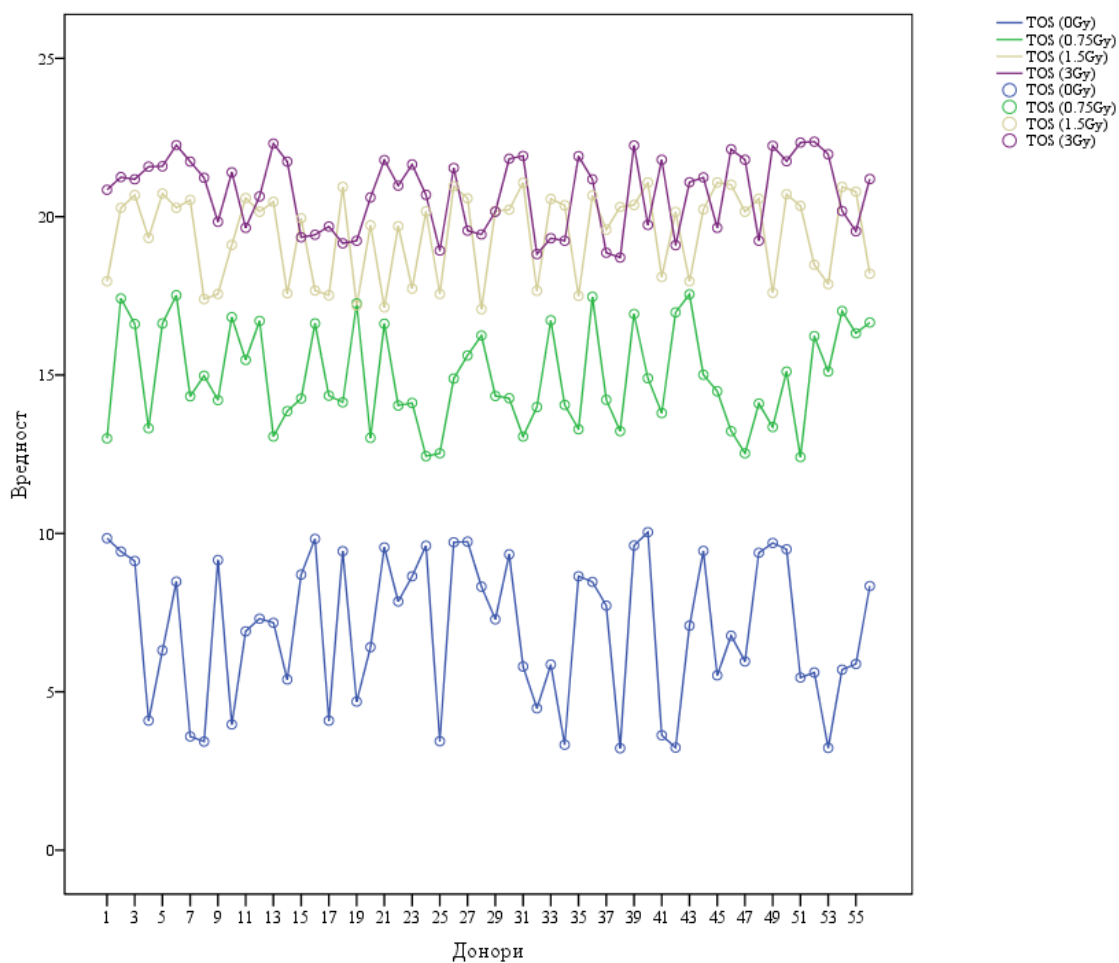
Графикон 34 приказује средње вредности параметара оксидативног статуса у односу на све апликоване дозе.



Графикон 34. Средње вредности параметара оксидативног статуса на свим апликованим дозама

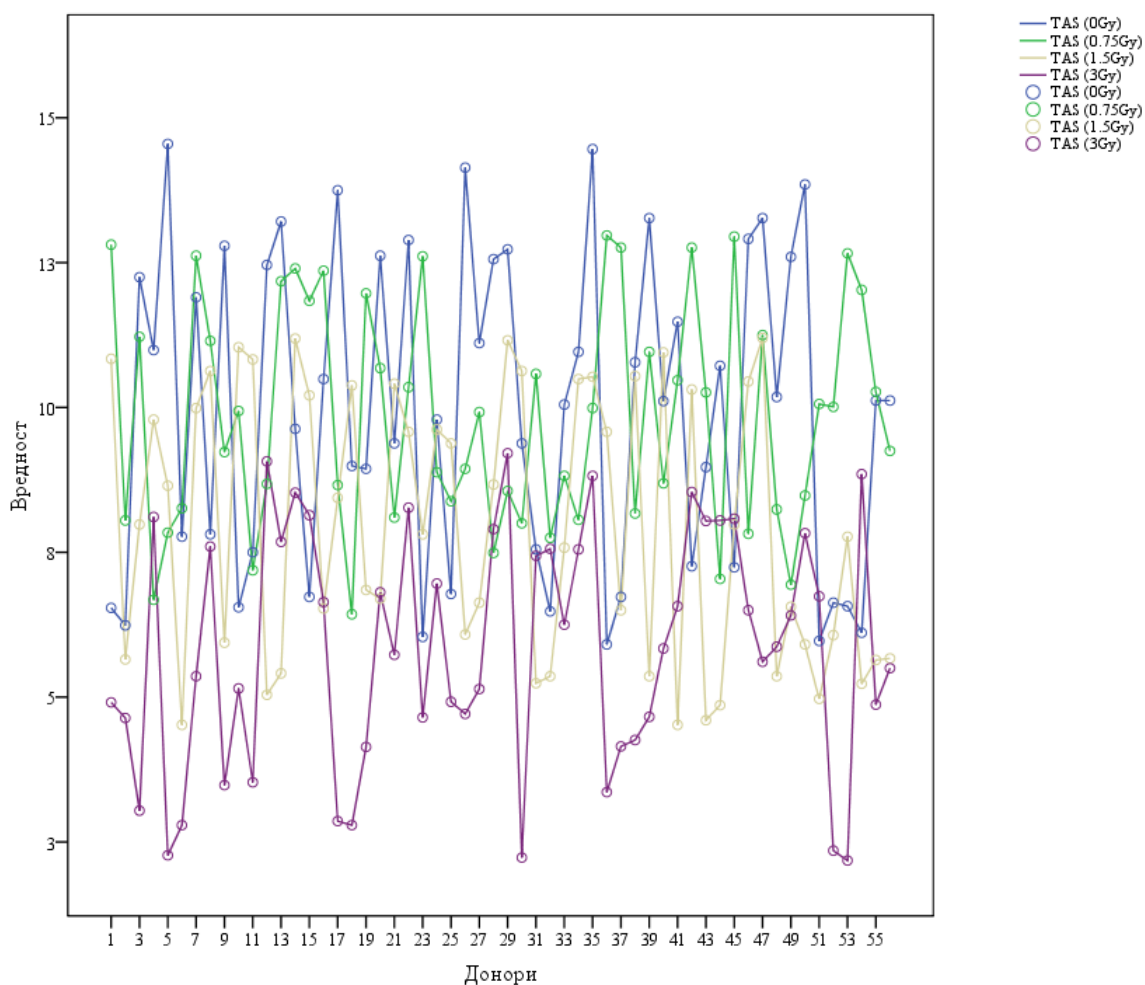
Појединачни одговори донора на различите дозе зрачења, изражени вредностима параметара TOS, TAS и IOS, такође указују на постојање интер-индивидуалне варијабилности.

Графикон 35 приказује разлике у одговору изражене параметром тотални оксидативни статус на свим апликованим дозама зрачења.



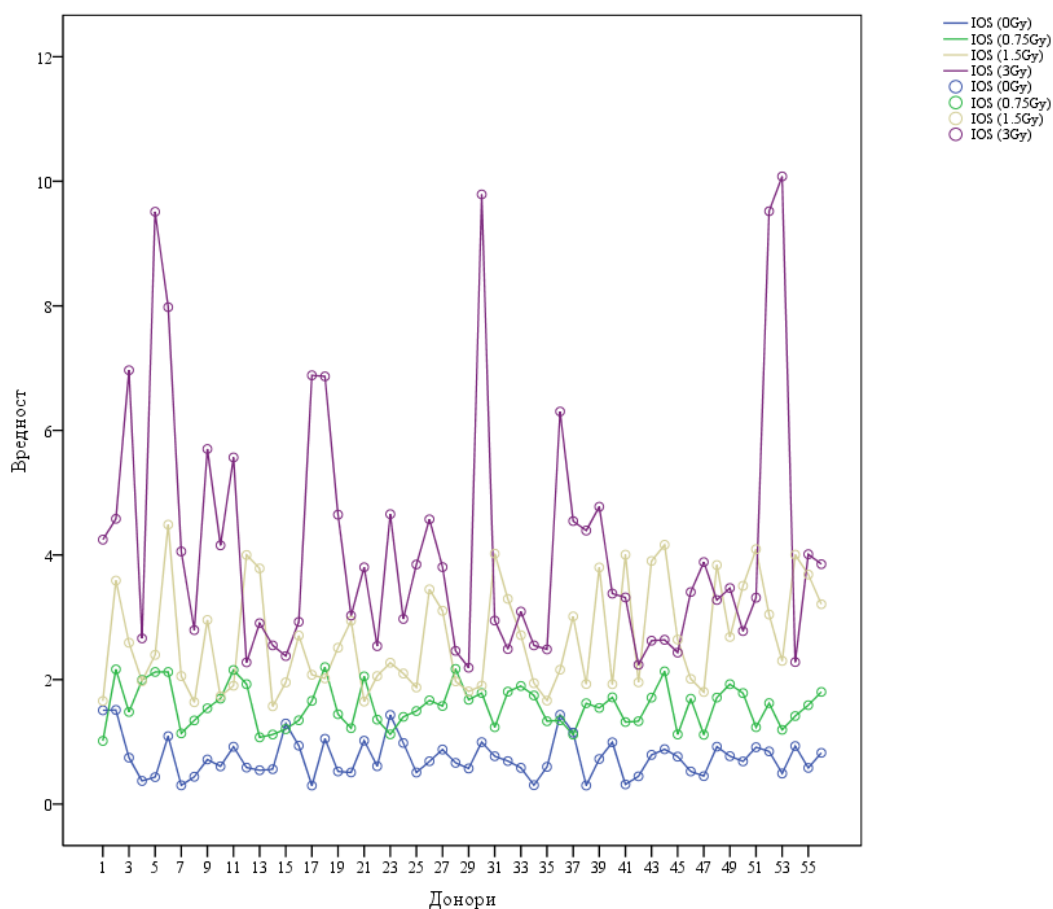
Графикон 35. Разлике у вредностима тоталног оксидативног статуса на свим дозама зрачења

Детаљнијом анализом графикана уочава се највећа варијабилност на дози од 0 Gy, а најмања на дози од 3 Gy. Две средње дозе показују сличан тренд.



Графикон 36. Вредности тоталног антиоксидантног статуса за све доноре на свим дозама зрачења

Вредности тоталног антиоксидантног статуса за сваког донора, приказане на графикону 36, одликују се израженом варијабилношћу међу донорима на свим дозама.

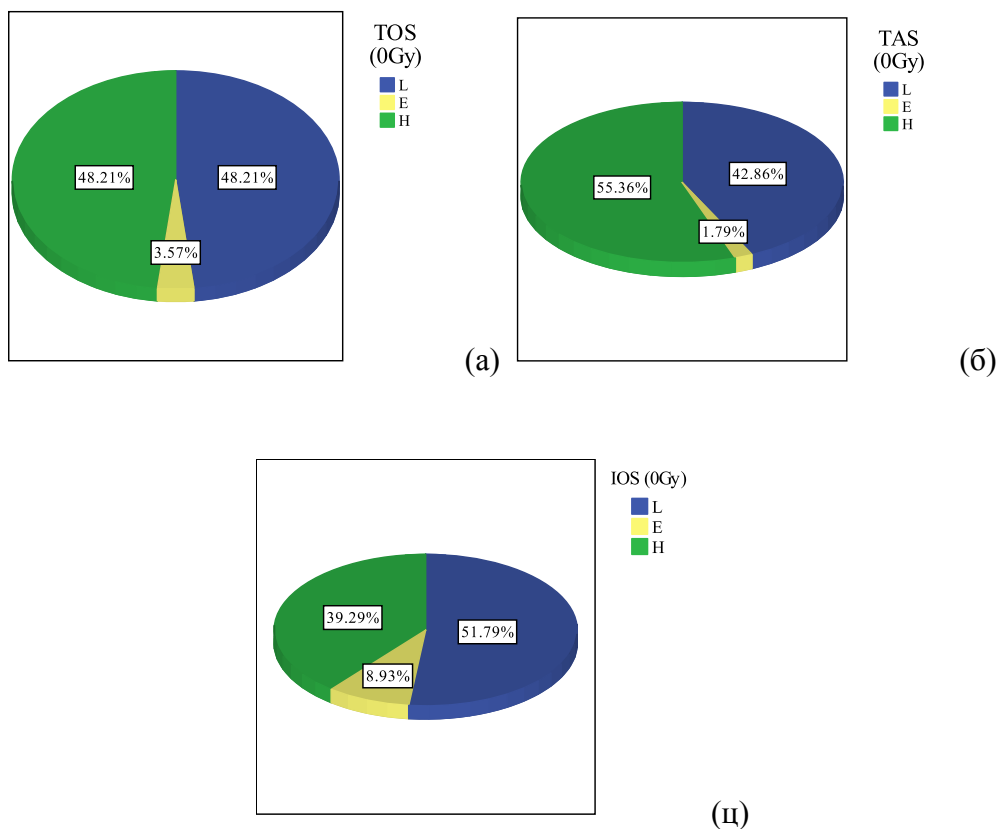


Графикон 37. Вредности параметра IOS за све доноре на свим дозама зрачења

Индекс оксидативног стреса највише се међу донорима разликује на дози од 3 Gy, нешто мања разлика у вредностима овог параметра уочена је на дози од 1.5 Gy, а приближно једнак тренд, праћен мање израженим интер-индивидуалним разликама, уочава се на дозама 0 и 0.75 Gy.

Графикони 38-41 приказују процентуалну заступљеност одговора свих донора, изражених параметрима оксидативног статуса TOS, TAS и IOS: виши одговор у односу на просечан (означен са „H“ – од енг. „higher than average“), нижи у односу на просечан (означен са „L“ од енг. „lower than average“) и једнак са просечним (означен са „E“ од енг. „equal as average“). Просечан одговор при датој дози израчунат је као средња вредност учесталости датог параметра оксидативног статуса за све доноре при датој дози.

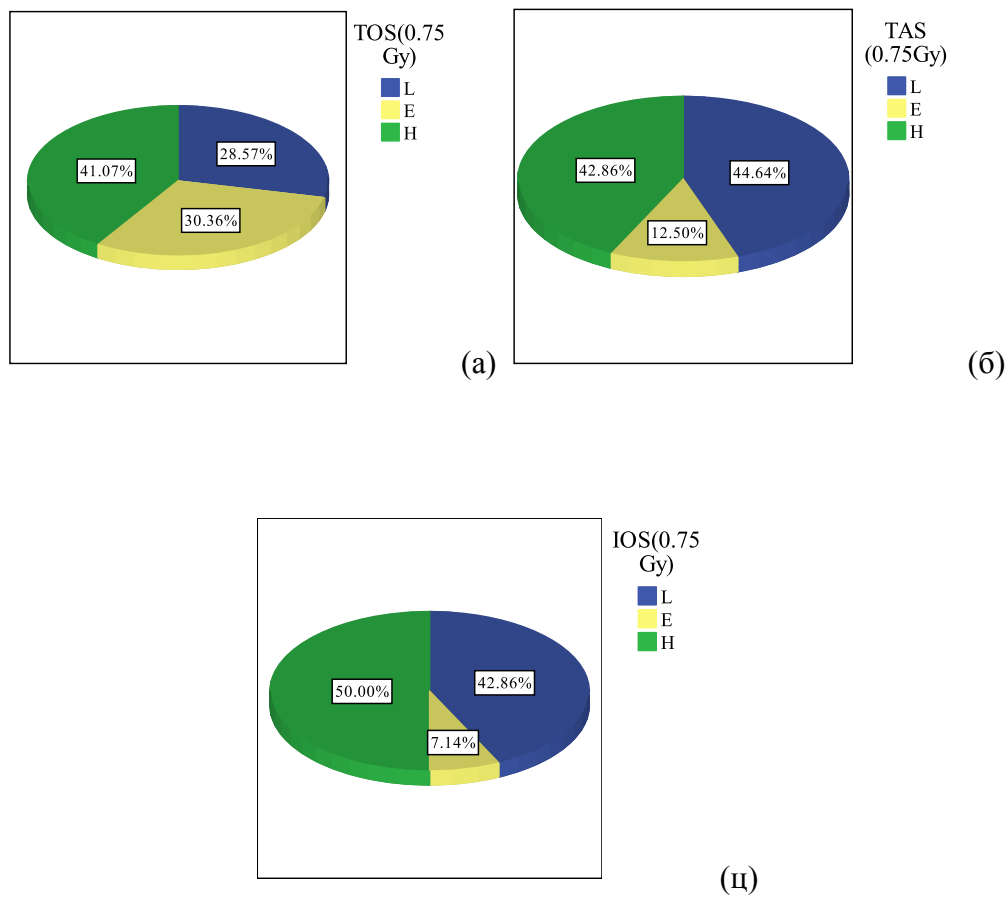
Табела 15 приказује појединачне одговоре свих донора на свим дозама и дата је у прилогу.



Графикон 38. Процентуална заступљеност одговора изражених параметрима оксидативног статуса TOS (а), TAS(б) и IOS(ц) на дози од 0 Gy

Тотални оксидативни статус донора одликује се једнаком заступљеношћу вишег и нижег одговора у односу на групни просек, док тотални антиоксидантни статус има другачију процентуалну заступљеност одговора: највећи проценат донора (55.36%) одликује се вишим одговором у односу на просек.

Индекс оксидативног статуса, величина која се израчунава као количник тоталног оксидативног и антиоксидантног статуса, одликује се присуством највеће варијабилности на групном нивоу: 39,29% донора има виши, 51,79% нижи, а скоро 9% има одговор једнак просечној вредности датог параметра за дозу од 0 Gy.

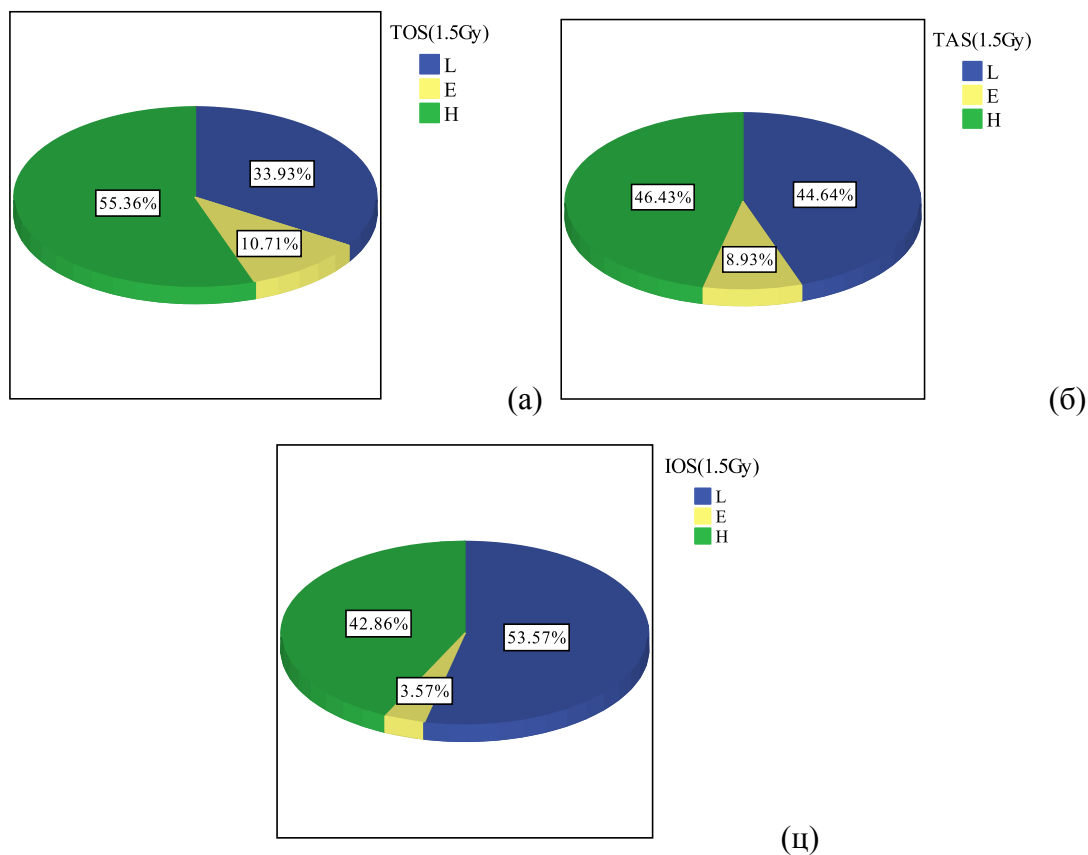


Графикон 39. Процентуална заступљеност одговора изражених параметрима оксидативног статуса TOS (а), TAS(б) и IOS(ц) на дози од 0.75 Gy

На дози од 0.75 Gy, за параметар TOS уочава се скоро једнака заступљеност све три врсте одговора, са нешто заступљенијим одговором вишим од просека (41.07% у односу на 30.36% донора са просечним и 28.57% донора са одговором нижим од просека).

Параметар TAS карактерише се једнако заступљеним вишим и нижим одговором у односу на просечан.

Највећи број испитаника (50%) има виши одговор од просечног, изражен параметром индекс оксидативног стреса, а најмање је донора са одговором блиским просеку.

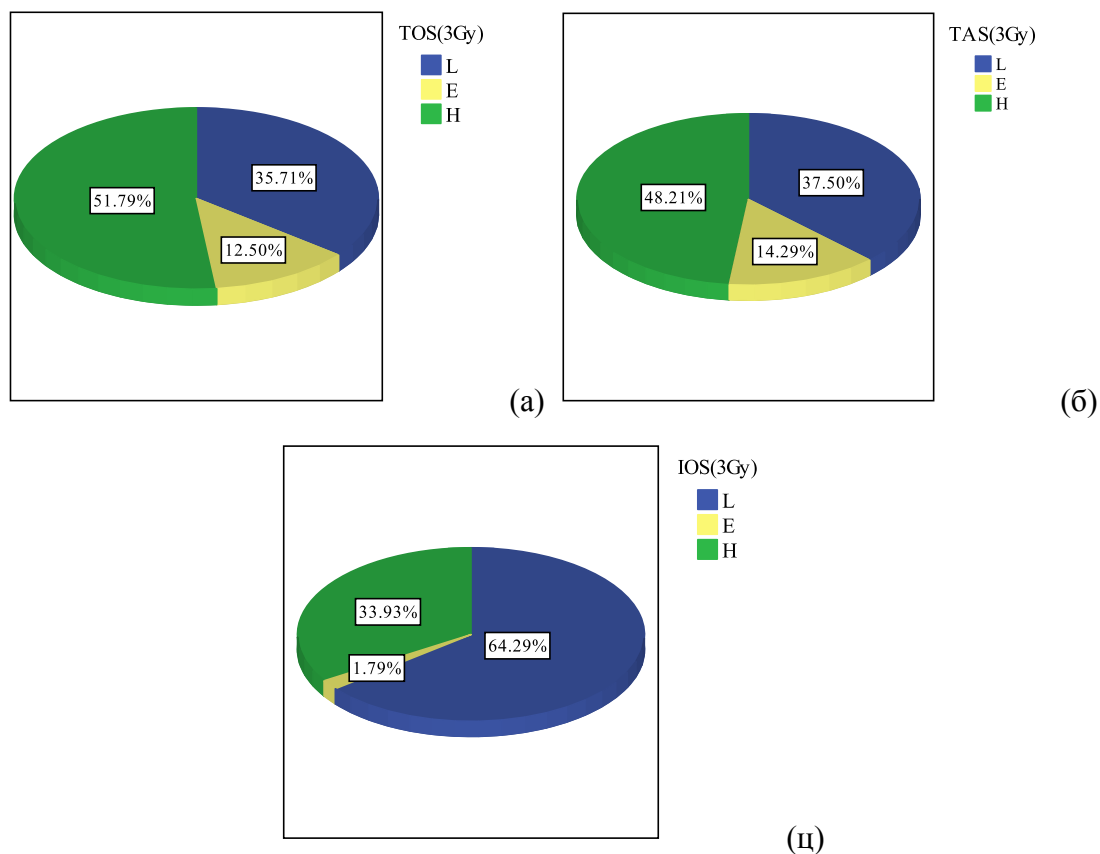


Графикон 40. Процентуална заступљеност одговора изражених параметрима оксидативног статуса TOS (а), TAS(б) и IOS(ц) на дози од 1.5 Gy

Параметри оксидативног статуса на дози од 1.5 Gy показују варијабилност у заступљености одговора: за параметар TOS уочава се највећи број испитаника (55.36%) са вишим одговором у односу на просечан, 33.93% испитаника са нижим и 10.71% са просечним одговором за дату дозу.

Параметар TAS одликује се, слично расподели на дози од 0.75 Gy, скоро равномерном заступљеношћу донора са вишим и нижим одговором (око 45%) и најмањим процентом донора са одговором блиским просеку (око 9%).

Параметар IOS карактерише највише донора са нижим одговором (53.57%), нешто мање са вишим (42.86%) и као и за претходна два параметра, најмање донора са одговором блиским просеку (3.57%).



Графикон 41. Процентуална заступљеност одговора изражених параметрима оксидативног статуса TOS (а), TAS(б) и IOS(ц) на дози од 3 Gy

Параметри TOS и TAS на дози од 3 Gy карактеришу се сличном расподелом одговора - у оба случаја највише је донора са вишим одговором од просека (51.79% за параметар TOS и 48.21% за параметар TAS), нешто мања је процентуална заступљеност донора са нижим одговором од просека (35.71% за параметар TOS, односно 37.50% за параметар TAS) и најмање је донора са просечним одговором (12.50% за параметар TOS и 14.29% за параметар TAS).

Параметар IOS има другачију расподелу донора према одговорима: 64.29% донора има нижи одговор од просека, 33.93% виши, а свега 1.79% донора одговор једнак просеку.

4.3 Утврђивање корелације цитогенетичких биомаркера деловања јонизујућег зрачења и показатеља оксидативног статуса у функцији апликоване дозе зрачења

4.3.1 Повезаност свих испитиваних параметара на дози од 0 Gy

Анализа повезаности резултата показала је присуство како позитивне, тако и негативне корелације међу неким од анализираних параметара на дози од 0 Gy.

У табели 16 приказане су вредности коефицијената корелације за параметре између којих је непараметарска корелациона анализа по Spearmanу установила статистички значајне позитивне и негативне корелације (ниво значајности 0.01).

Табела 16. Резултати непараметарске корелационе анализе на дози од 0 Gy

	MN ₁	MN ₂	M ₂	M ₄	NB	NDI	MDA	IOS
MN _t	.94**	.59**			.48**			
MN ₁		.36**			.48**			
M ₁			-.90**	-.45**		-.88**		
M ₂						.63**		
M ₃				.55**		.49**		
M ₄						.78**	-.33*	
TOS								.71**
TAS								-.51**

4.3.2 Повезаност свих испитиваних параметара на дози од 0.75 Gy

На дози од 0.75 Gy непараметарском корелационом анализом по Spearman такође су установљене статистички значајне позитивне и негативне корелације између извесних анализираних цитогенетичких и биохемијских параметара (табела 17).

Табела 17. Резултати непараметарске корелационе анализе на дози од 0.75 Gy

	CDDR	MNt	MN ₁	MN ₂	MN ₄	MN ₆	CD MN	M ₃	M ₄	NB	NC	AC	NDI	MDA	CAT	TAS	IOS
D+R	1.00**	0.75**	0.47**	0.28*			0.75**										
CDDR		0.75**	0.47**	0.28*			0.75**										
MNt			0.64**	0.34**	- 0.26*		1.00**										
MN ₁				-0.30*			0.64**										
MN ₂							0.34**									0.28*	
MN ₃						0.29*											
MN ₄							-0.27*	- 0.32*		0.42**							
MN ₆														- 0.29*			
M ₂													0.53**				
M ₃									0.57**	- 0.59**			0.42**			0.33*	-0.28*
M ₄													0.71**		- 0.32*		
NB											0.31*						
NPB											0.50**						
NC												0.32*					
NDI															- 0.29*		
TOS																	0.39**
TAS																	- 0.88**

Статистички значајне корелације су означене са две звезде у суперскрипту (ниво значајности 0.01) и једном звездом у суперскрипту (ниво значајности 0.05); CDDR/CDMN-калкулисана доза на основу приноса дицентрика и рингова/микронуклеуса (помоћу коефицијената калибрационе криве утврђене за општу популацију Србије⁶⁵)

4.3.3 Повезаност свих испитиваних параметара на дози од 1.5 Gy

Табела 18 приказује вредности коефицијената корелације на дози од 1.5 Gy. Означене су статистички значајне корелације (ниво значајности 0.01 – две звезде у суперскрипту и 0.05 – једна звезда у суперскрипту).

Табела 18. Резултати непараметарске корелационе анализе на дози од 1.5 Gy

	CDD R	MN _t	MN ₁	MN ₂	MN ₃	MN ₄	MN ₅	MN ₆	CD MN	M ₂	M ₄	NB	NPB	NC	AC	NDI	MD A	SOD	CAT	IOS
D+R	0.68*	0.53*	0.27*						0.52*						0.31*					
CDD R		0.45*							0.51*											
MN _t									0.38*											
MN ₁				-0.56*	0.47*	-0.39*	-0.34*		0.49*			-0.29*								
MN ₂					0.34*							0.33*								
MN ₃											-0.27*			0.34*						
MN ₆														0.29*						
M ₁									-0.90*								-0.70*			
M ₂											-0.32*						0.37*			
M ₃																			-0.36*	
M ₄																	0.68*			
NB															0.31*					
NC																	0.27*			
SOD																				0.35*
TOS																				0.31*
TAS																				-0.97*

Статистички значајне корелације су означене са две звезде у суперскрипту (ниво значајности 0.01) и једном звездом у суперскрипту (ниво значајности 0.05); CDDR/CDMN-калкулисана доза на основу приноса дицентрика и рингова/микронуклеуса (помоћу коефицијената калибрационе криве утврђене за општу популацију Србије⁶⁵)

4.3.4 Повезаност свих испитиваних параметара на дози од 3 Gy

На дози од 3 Gy позитивна корелација уочена је између укупно 22 цитогенетичка и биохемијска параметра, док је негативно корелирало свега 5 параметара (табела 19).

Табела 19. Резултати непараметарске корелационе анализе на дози од 3 Gy

	CDDR	MNt	MN ₁	MN ₂	MN ₄	MN ₅	MN ₆	CD MN	M ₁	M ₂	M ₄	NC	AC	NDI	AOPP	TOS	IOS
D+R	1.00**	0.74**	0.32**	0.55**	0.36**	0.27**		0.89**									
CDDR								0.89**									
MNt								1.00**									
MN ₁												0.28*	0.33*				
MN ₂								0.78**									
MN ₃								0.58**									
MN ₄								0.63**									
MN ₅								0.40*									
M ₁										0.78**				0.72**		0.45**	
M ₂											0.45**					0.37**	0.29*
M ₃											0.41**			0.47**			
M ₄														0.70**			
NB													0.29*				
NDI																0.28*	
TAS																	0.98**

Статистички значајне корелације (ниво значајности 0.01 – две звездице у суперскрипту и 0.05 – једна звездица у суперскрипту); CDDR/CDMN-калкулисана доза на основу приноса дицентрика и рингова/микронуклеуса (помоћу коефицијената калибрационе криве утврђене за општу популацију Србије⁶⁵)

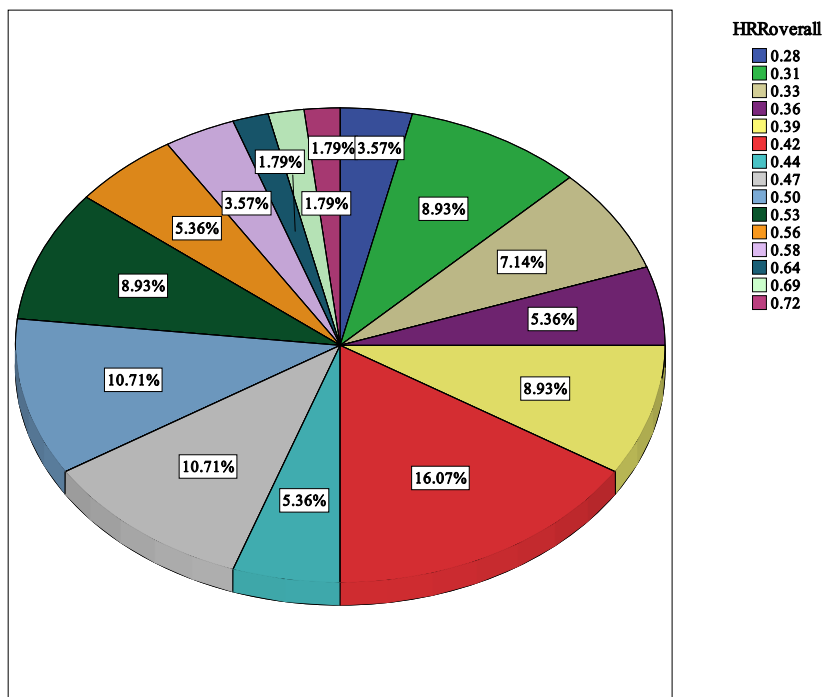
На свакој од апликованих доза зрачења може се уочити позитивна корелација између цитогенетичких параметара и параметара цитостазе. Мало је уочених статистички значајних корелација између цитогенетичких и биохемијских параметара, док корелације биомаркера деловања зрачења (дицентричних и прстенастих хромозома и микронуклеуса) са биохемијским параметрима оксидативног стреса, антиоксидантног одговора и оксидативног/ антиоксидантног статуса, нису уочене.

4.4 Параметар „HRR“. Интер-индивидуална варијабилност у одговору на зрачење

Поређењем резултата свих примењених тестова уочава се да неки донори имају виши одговор у односу на просечне вредности, без обзира на апликовану дозу зрачења и метод којим је одговор изражен. У циљу одређивања разлике у одговору на зрачење међу донорима и у односу на примењену методу, за сваког донора и сваку методу (и у оквиру методе најважније посматране параметре) израчунат је однос између броја „Н“ вредности и укупног броја мерења, означен као „HRR“ параметар (од енг. „*H-response ratio*“).

Вредности „HRR“ параметара свих донора, изражене учесталошћу дицентричних и ринг хромозома, микронуклеуса, концентрацијом малондиалдехида и завршних оксидативних продуката протеина, активношћу каталазе и супероксид-дисмутазе, вредностима тоталног оксидативног и антиоксидантног статуса и индекса оксидативног стреса, као и свеукупни одговор (параметар $HRR_{OVERALL}$, израчунат као аритметичка средина свих осталих HRR параметара) дате су у табели 20 (прилог). Вредности су приказане у опадајућем низу. Вредност која означава највиши могући свеукупни одговор, изражен највећом учесталошћу посматраних параметара, јесте „1“. Табела 20 приказује и основне демографске карактеристике и животне навике испитаника.

Графикон 42 приказује процентуалну заступљеност свеукупног одговора ($HRR_{OVERALL}$) у целом узорку.



Графикон 42. Процентуална заступљеност свеукупног одговора ($HRR_{OVERALL}$)

Анализом резултата које приказују табела 20 и графикон 42 уочава се распон у свеукупном одговору донора од 0.28 до 0.72, који указује на варијабилност у одговору на зрачење. Издваја се неколико група донора, према величини одговора. Највиши одговор (0.72) има један испитаник, а најнижим одговором (0.28) се одликују два донора. Одговор близак просеку за све анализирани параметре (вредност параметра $HRR_{OVERALL}$ 0.5) има око 11%, односно 6 испитаника. Виши одговор од просека има 13 испитаника (23%), а нижи од просека око 66%, односно 37 испитаника. Око 60% донора са одговором вишим од просека (61.5% или 8 од 13) је женског пола; у овој групи је и исти проценат непушача. У групи донора са нижим одговором више је особа мушког пола (57%) и такође више непушача (65%) у поређењу са пушачима (35%).

T-тест за независне узорке показао је постојање статистички значајне разлике у вредностима одређених цитогенетичких и биохемијских параметара који описују одговор. Цитогенетички (HRR_{D+R} , HRR_{MNI}) и параметри који описују оксидативна оштећења (HRR_{MDA} , HRR_{TOS} , HRR_{AOPP}), као и параметар који описује свеукупни одговор - $HRR_{OVERALL}$, имају више средње вредности у групи донора са вишим

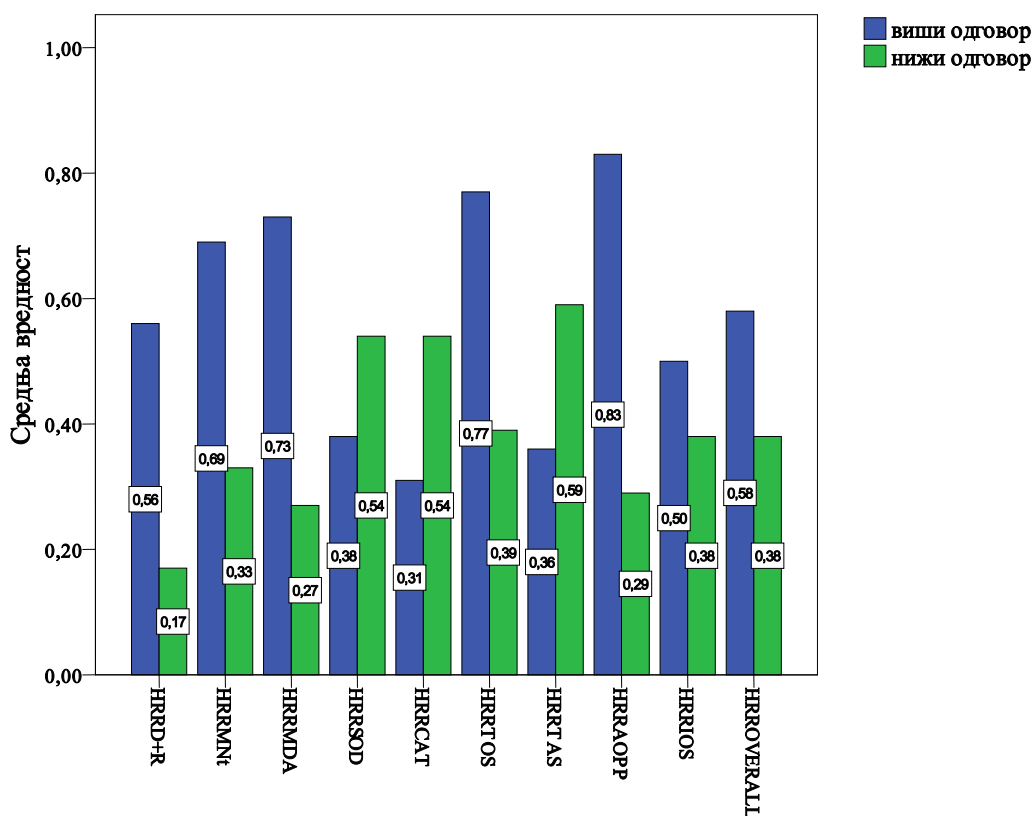
одговором од просека. Параметри антиоксидантне заштите (HRR_{SOD} , HRR_{CAT} , HRR_{TAS}) имали су више просечне вредности у групи особа са одговором нижим од просечног (табела 21).

Табела 21. Поређења просечних вредности HRR параметара у односу на групу, резултати теста и значајност разлике

Параметар	Група	Просек±SD	T	df	p
HRR_{D+R}	Виши одговор	0.56±0.23	5.869	48	0.00**
	Нижи одговор	0.17±0.19			
HRR_{MNI}	Виши одговор	0.69±0.27	4.659	48	0.00**
	Нижи одговор	0.33±0.22			
HRR_{MDA}	Виши одговор	0.73±0.19	6.820	48	0.00**
	Нижи одговор	0.27±0.21			
HRR_{SOD}	Виши одговор	0.38±0.13	-2.167	48	0.03**
	Нижи одговор	0.54±0.25			
HRR_{CAT}	Виши одговор	0.31±0.11	-3.302	48	0.00**
	Нижи одговор	0.54±0.23			
HRR_{TOS}	Виши одговор	0.77±0.12	6.524	48	0.00**
	Нижи одговор	0.39±0.19			
HRR_{TAS}	Виши одговор	0.36±0.13	-4.207	48	0.00**
	Нижи одговор	0.59±0.18			
HRR_{AOPP}	Виши одговор	0.83±0.19	9.875	48	0.00**
	Нижи одговор	0.29±0.16			
HRR_{IOS}	Виши одговор	0.5±0.27	1.306	48	0.19
	Нижи одговор	0.38±0.27			
$HRR_{OVERALL}$	Виши одговор	0.58±0.06	9.795	48	0.00**
	Нижи одговор	0.38±0.06			

* p<0.05; **p<0.01

Графикон 43 приказује разлике у просечним вредностима HRR параметара у групама донора са вишим и нижим одговором од просечног.



Графикон 43. Разлике у просечним вредностима HRR параметара у групама донора са вишим и нижим одговором од просечног

4.4.1 Повезаност HRR параметара

Корелациона статистичка анализа примењена је и у циљу детекције повезаности параметара који описују варијабилност у одговору на зрачење.

Позитивна корелација уочена је између следећих параметара: HRR_{D+R} и HRR_{MNI} ; HRR_{D+R} и $HRR_{OVERALL}$; HRR_{MNI} и $HRR_{OVERALL}$; HRR_{MDA} и $HRR_{OVERALL}$; HRR_{SOD} и $HRR_{OVERALL}$; HRR_{CAT} и HRR_{MDA} ; HRR_{CAT} и $HRR_{OVERALL}$; HRR_{TAS} и $HRR_{OVERALL}$.

Негативно су корелирали HRR_{MDA} и HRR_{TOS} , као и HRR_{TOS} и HRR_{IOS} .

Табела 22 приказује вредности коефицијената корелације за HRR параметре који описују одговор донора на зрачење. Означене су статистички значајне корелације

(ниво значајности 0.01 – две звездице у суперскрипту и 0.05 – једна звездица у суперскрипту).

Табела 22. Резултати непараметарске корелационе анализе за HRR параметре

	HRR _{D+R}	HRR _{MNt}	HRR _{MDA}	HRR _{CAT}	HRR _{TOS}	HRR _{TAS}	HRR _{AOPP}	HRR _{OVERALL}
HRR _{D+R}		0.66**	0.38**	-0.36*	0.37**	-0.41**	0.45**	0.62**
HRR _{MNt}			0.39**	-0.38*	0.44**	-0.35**	0.39**	0.64**
HRR _{MDA}				-0.30*	0.55**	-0.36**	0.58**	0.70**
HRR _{TOS}						-0.61**	0.53**	0.63**
HRR _{TAS}							-0.54**	-0.48**
HRR _{AOPP}								0.78**

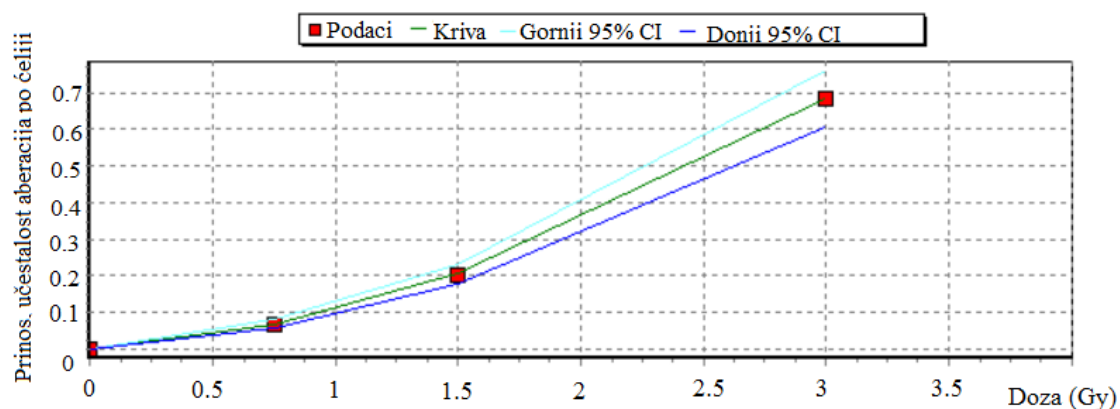
4.5 Дозно-зависне криве – криве које описују одговор на зрачење

Како су, без обзира на разлике у величини одговора, сви донори показали сличан тренд, у смислу статистички значајне промене (повећања/смањења) учесталости праћених параметара са повећањем апликоване дозе зрачења, вредности цитогенетичких (дицентричних и ринг хромозома и микронуклеуса) и биохемијских параметара (концентрација малондиалдехида и завршних оксидативних продуката протеина, активност супероксид-дисмутазе и каталазе, тотални оксидативни, тотални антиоксидантни статус и индекс оксидативног стреса) обједињене су за све доноре на датој дози и поређене међусобно у циљу формирања дозно - зависних крива које описују одговор на зрачење.

4.5.1 Дозно-зависни одговор изражен учесталошћу цитогенетичких параметара

Величина дозно-зависног одговора, изражена учесталошћу цитогенетичких биомаркера, одређена је помоћу софтвера за процену дозе и фитовање коефицијената дозно-зависних крива⁶⁴, нелинеарном регресионом анализом коришћењем квадратне једначине $Y = c + \alpha D + \beta D^2$.

Дозно зависне криве за дицентрике и микронуклеусе приказане су на графиконима 44а и 44б.

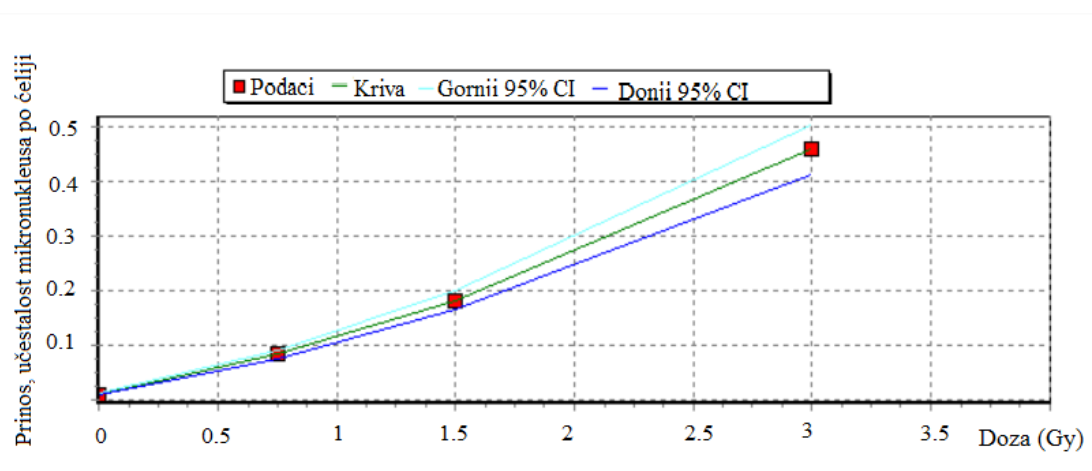


Графикон 44а. Дозно зависна крива за цитогенетичке параметре (D+R)

Параметри криве за дицентрик тест су $\alpha \pm SE$ (0.04 ± 0.005) и $\beta \pm SE$ (0.06 ± 0.002), док једначина калибрационе криве за дицентрик тест гласи

$$Y = 0.001 (+/- 0.0004) + 0.04 (+/- 0.005) * D + 0.06 (+/- 0.0025) * D^2$$

Дозно-зависна крива која описује одговор изражен учесталошћу дицентричних и прстенстих (ринг) хромозома показује повећање учесталости посматраних цитогенетичких промена са повећањем апликоване дозе. Вредности коефицијената говоре о ефикасности зрачења у индукцији цитогенетичких промена.



Графикон 44б. Дозно-зависна крива за цитогенетичке параметре (MNt)

Параметри криве за микроуклеус тест су $\alpha \pm SE$ (0.08 ± 0.003) и $\beta \pm SE$ (0.02 ± 0.001). Једначина калибрационе криве за микроуклеус тест је

$$Y = 0.01 (+/- 0.0008) + 0.08 (+/- 0.0033) * D + 0.02 (+/- 0.0014) * D^2.$$

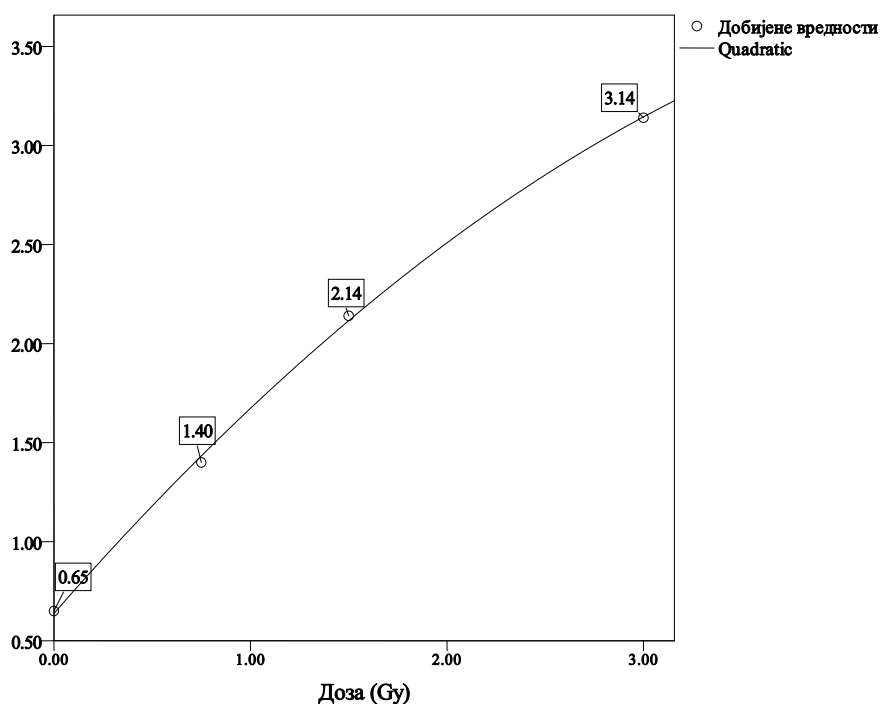
Донори су на повећање дозе зрачења одговорили повећањем учесталости и другог цитогенетичког параметра – укупног броја микроуклеуса.

Поређењем дицентрик и микронуклеус теста, уочава се разлика у вредностима коефицијената калибрационих крива са вишим вредностима коефицијента α (који описује тренд на нижим дозама) за микронуклеус тест, и вишим вредностима коефицијента β , који описује тренд на вишим дозама, за дицентрик тест. Другим речима, X зрачење је на нижим дозама ефикасније у индукцији микронуклеуса него дицентричних/ринг хромозома, док се на вишим дозама овај тренд мења, у корист дицентрика, који боље описују дозно-зависни одговор.

4.5.2 Дозно-зависни одговор изражен концентрацијом/активношћу биохемијских параметара MDA, AOPP, SOD, CAT

Дозно-зависни одговор изражен концентрацијом/активношћу биохемијских параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора одређен је Curve estimation нелинеарном регресионом анализом, која је показала да се тренд повећања концентрације свих анализираних параметара најбоље може описати коришћењем квадратне једначине $Y = c + \alpha D + \beta D^2$.

Графикони 45а-г приказују дозно зависне криве за биохемијске параметре MDA, SOD, CAT и AOPP.



Графикон 45а. Дозно зависна крива за биохемијски параметар MDA

Дозно-зависна крива која описује одговор изражен концентрацијом малондиалдехида показује повећање вредности анализираниог параметра са повећањем апликоване дозе. Табела 23 приказује основне параметре квадратног модела фитовања криве за параметар MDA.

Табела 23. Основни параметри квадратног модела фитовања криве за параметар MDA

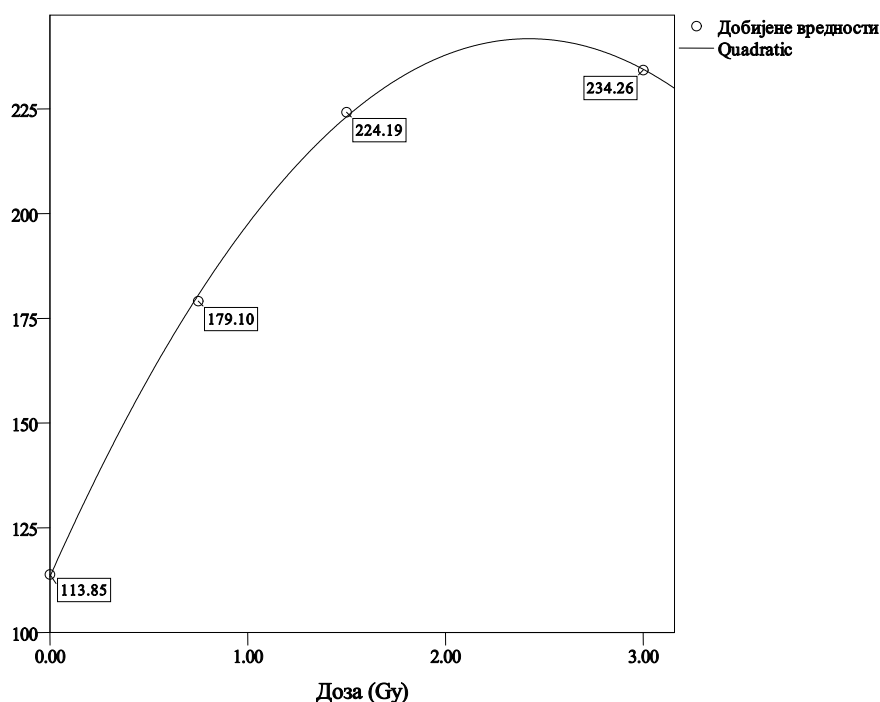
Модел		Анова		Коефицијенти		
R ²	aR ^{2*}	F	p	α ± SE	β ± SE	C
0.99	0.99	920.09	0.02	1.13±0.07	-0.1±0.02	0.64±0.04

*прилагођени коефицијент R² (од енг. adjusted R²)

Одговор је описан следећом једначином:

$$Y = 0.64 (+/- 0.04) + 1.13 (+/- 0.07) * D - 0.1 (+/- 0.002) * D^2$$

Виша вредност коефицијента α (који описује тренд на нижим дозама) указује на ефикаснију индукцију липидне пероксидације на нижим него на вишим дозама X зрачења.



Графикон 45в. Дозно зависна крива за биохемијски параметар активност SOD

Дозно-зависна крива која описује одговор изражен концентрацијом супероксид-дисмутазе показује повећање вредности анализираног параметра са повећањем апликоване дозе. Табела 25 приказује основне параметре квадратног модела фитовања криве за параметар активност SOD.

Табела 25. Основни параметри квадратног модела фитовања криве за параметар активност SOD

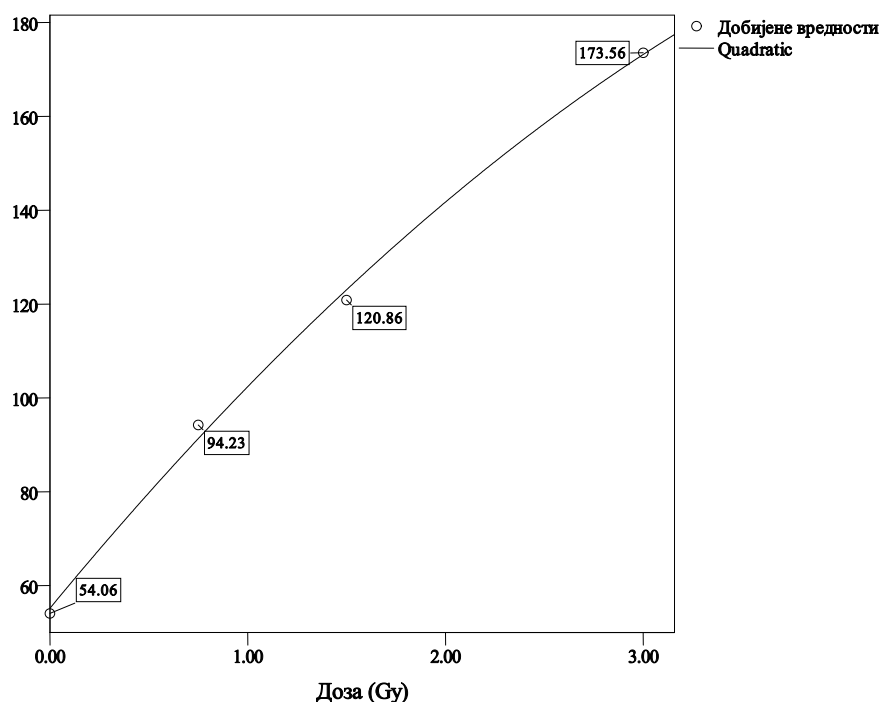
Модел		Анова		Коефицијенти		
R ²	aR ^{2*}	F	p	α ± SE	β ± SE	C
1	0.99	1287.95	0.02	106.03±3.03	-21.88±0.94	113.31±1.79

*прилагођени коефицијент R² (од енгл. adjusted R²)

Одговор је описан следећом једначином:

$$Y = 113.31 (+/- 1.79) + 106.03 (+/- 3.03) * D - 21.88 (+/- 0.94) * D^2$$

Виша вредност коефицијента α (који описује тренд на нижим дозама) указује на ефикаснију активацију супероксид-дисмутазе на нижим него на вишим дозама X зрачења.



Графикон 45г. Дозно зависна крива за биохемијски параметар активност САТ

Дозно-зависна крива која описује одговор изражен активношћу каталазе показује повећање вредности анализираниог параметра са повећањем апликоване дозе. Табела 26 приказује основне параметре квадратног модела фитовања криве за параметар активност САТ.

Табела 26. Основни параметри квадратног модела фитовања криве за параметар активност САТ

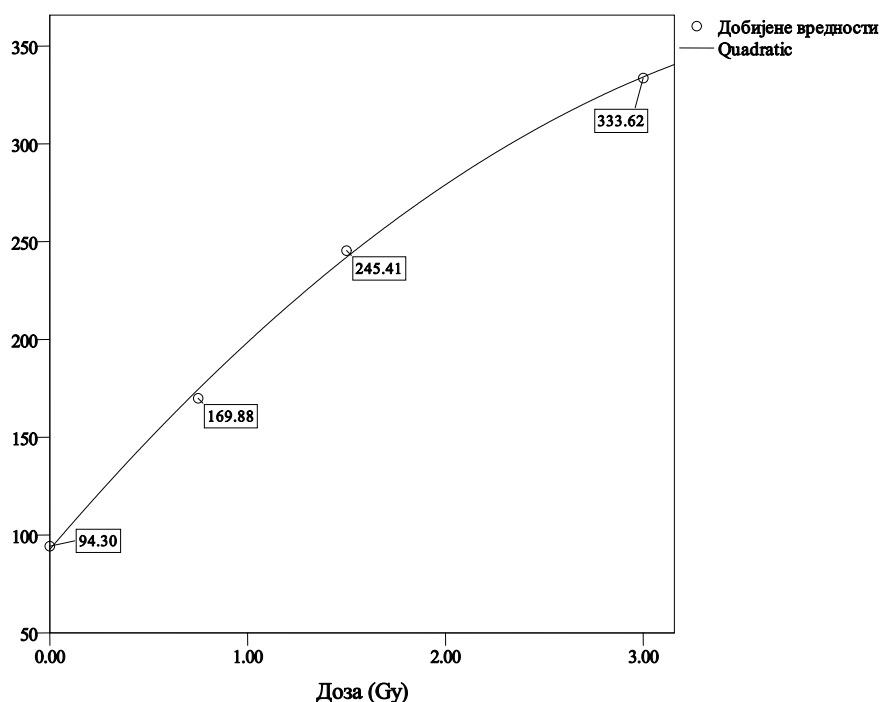
Модел		Анова		Коефицијенти		
R ²	aR ^{2*}	F	p	α ± SE	β ± SE	C
0.99	0.99	257.704	0.04	51.17±6.19	-3.94±1.91	55.15±3.66

*прилагођени коефицијент R² (од енг. adjusted R²)

Одговор је описан следећом једначином:

$$Y = 55.15 (+/- 3.66) + 51.17 (+/- 6.19) * D - 3.94 (+/- 1.91) * D^2$$

Виша вредност коефицијента α (који описује тренд на нижим дозама) указује на ефикаснију индукцију активности каталазе на нижим него на вишим дозама X зрачења.



Графикон 456. Дозно зависна крива за биохемијски параметар концентрација АОРР

Дозно-зависна крива која описује одговор изражен концентрацијом завршних оксидативних продуката протеина показује повећање вредности анализираниог параметра са повећањем апликоване дозе. Табела 24 приказује основне параметре квадратног модела фитовања криве за параметар концентрација АОРР.

Табела 24. Основни параметри квадратног модела фитовања криве за параметар концентрација АОРР

Модел		Анова		Коефицијенти		
R ²	aR ^{2*}	F	p	α ± SE	β ± SE	C
0.99	0.99	440.605	0.03	118.66±9.70	-12.71±2.99	92.59±5.73

*прилагођени коефицијент R² (од енг. adjusted R²)

Одговор је описан следећом једначином:

$$Y = 92.59 (+/- 5.73) + 118.66 (+/- 9.70) * D - 12.71 (+/- 2.99) * D^2$$

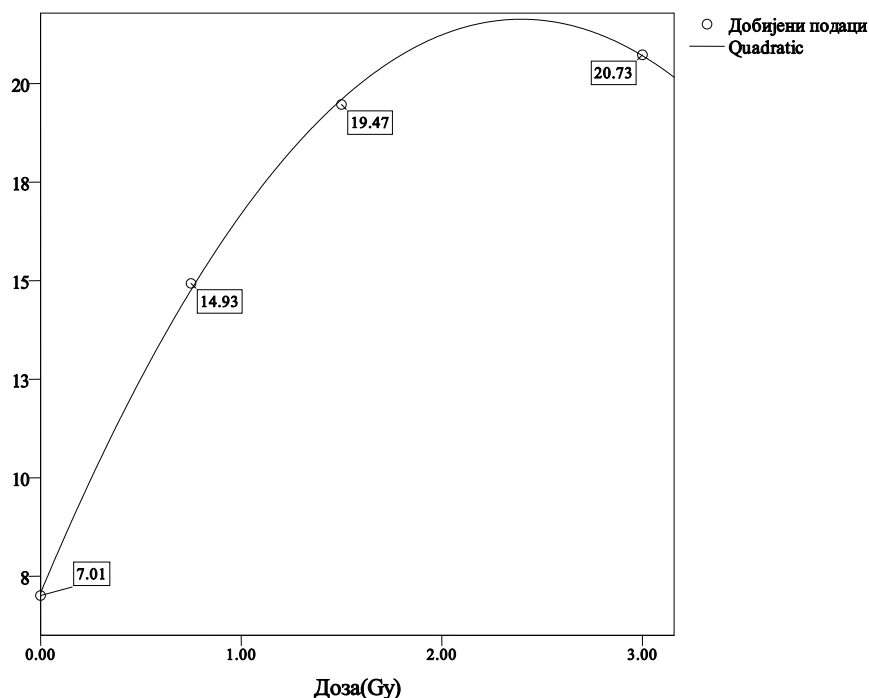
Виша вредност коефицијента α (који описује тренд на нижим дозама) указује на ефикаснију индукцију оксидације протеина на нижим него на вишим дозама X зрачења.

4.5.3 Дозно-зависни одговор изражен вредностима биохемијских параметара TOS, TAS, IOS

Параметри оксидативног статуса такође су показали статистички значајне промене вредности са порастом апликоване дозе: параметри TOS и IOS повећање, а параметар TAS дозно-зависно смањење концентрације.

Дозно-зависни одговор изражен вредностима биохемијских параметара оксидативног статуса одређен је Curve estimation нелинеарном регресионом анализом, која је показала се тренд повећања вредности параметара TOS и IOS и тренд смањења вредности параметра TAS, најбоље могу описати коришћењем квадратне једначине $Y = c + \alpha D + \beta D^2$.

Криве које описују одговор параметара оксидативног статуса TOS, TAS и IOS, приказане су на графиконима 46а-в.



Графикон 46а. Дозно-зависна крива за биохемијски параметар тотални оксидативни статус (TOS)

Дозно-зависна крива која описује одговор изражен вредношћу тоталног оксидативног статуса показује повећање вредности анализираних параметара са повећањем апликоване дозе. Табела 27 приказује основне параметре квадратног модела фитовања криве за параметар TOS.

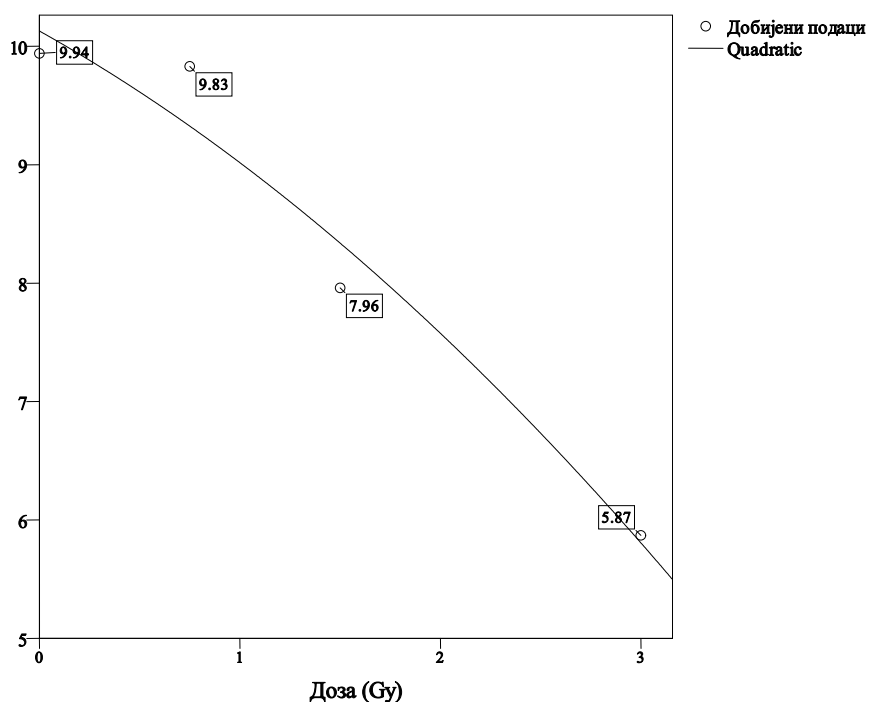
Табела 27. Основни параметри квадратног модела фитовања криве за параметар TOS

Модел		Анова		Коефицијенти		
R ²	aR ^{2*}	F	p	α ± SE	β ± SE	C
1	0.99	1179.87	0.02	12.57±0.36	-2.54±0.11	7.07±0.21

*прилагођени коефицијент R² (од енг. adjusted R²)

Одговор је описан следећом једначином:

$$Y = 7.07 (+/- 0.21) + 12.57 (+/- 0.36) * D - 2.54 (+/- 0.11) * D^2$$



Графикон 46б. Дозно-зависна крива за биохемијски параметар тотални антиоксидантни статус (TAS)

Дозно-зависна крива која описује одговор изражен вредношћу тоталног антиоксидантног статуса показује смањење вредности анализираниог параметра са повећањем апликоване дозе. Табела 28 приказује основне параметре квадратног модела фитовања криве за параметар TAS.

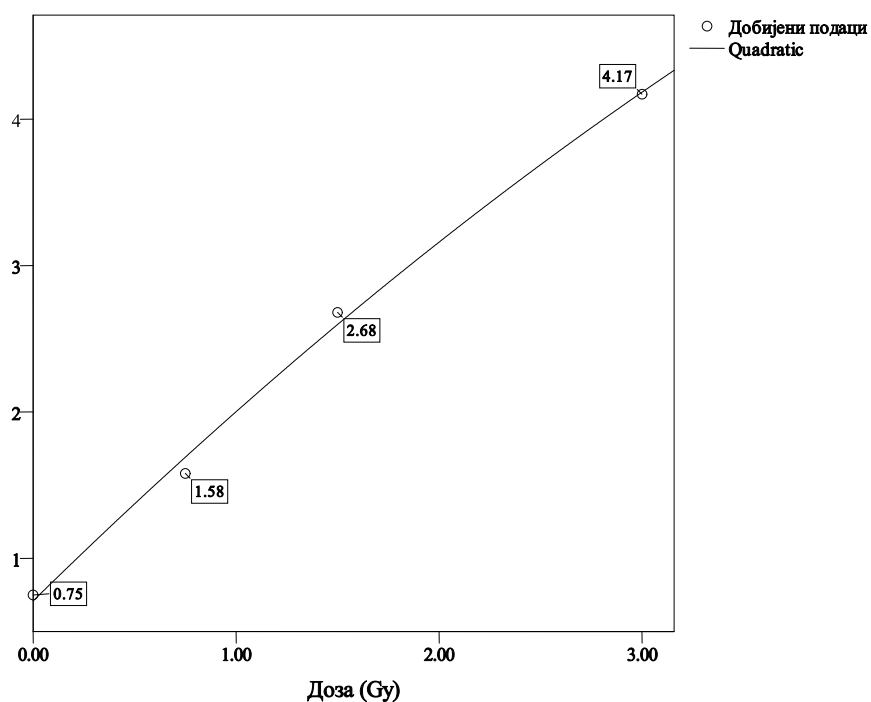
Табела 28. Основни параметри квадратног модела фитовања криве за параметар TAS

Модел		Анова		Коефицијенти		
R ²	aR ^{2*}	F	p	α ± SE	β ± SE	C
0.98	0.89	12.11	0.02	-0.94±0.07	-0.16±0.03	10.13±0.63

*прилагођени коефицијент R² (од енгл. adjusted R²)

Одговор је описан следећом једначином:

$$Y = 10.13 (+/- 0.63) - 0.94 (+/- 0.07) * D - 0.16 (+/- 0.03) * D^2$$



Графикон 46в. Дозно-зависна крива за биохемијски параметар индекс оксидативног стреса (IOS)

Дозно-зависна крива која описује одговор изражен вредношћу индекса оксидативног стреса показује повећање вредности анализираних параметара са повећањем апликоване дозе. Табела 29 приказује основне параметре квадратног модела фитовања криве за параметар IOS.

Табела 29. Основни параметри квадратног модела фитовања криве за параметар IOS

Модел		Анова		Коефицијенти		
R ²	aR ^{2*}	F	p	α ± SE	β ± SE	C
0.99	0.99	115.71	0.05	1.36±0.23	-0.07±0.07	0.71±0.14

*прилагођени коефицијент R² (од енгл. adjusted R²)

Одговор је описан следећом једначином:

$$Y = 0.71 (+/- 0.14) + 1.36 (+/- 0.23) * D - 0.07 (+/- 0.07) * D^2$$

4.6 Коефицијент варијације – групна варијабилност у одговору на зрачење

Групна варијабилност у одговору на зрачење евалуирана је помоћу коефицијента варијације (CV) за сваку групу узорака озрачених истом дозом и за сваки од посматраних цитогенетичких (D+R, MNt) и биохемијских параметара (MDA, SOD, CAT, AOPP, TOS, TAS, IOS).

Коефицијенти варијације израчунати су помоћу формуле:

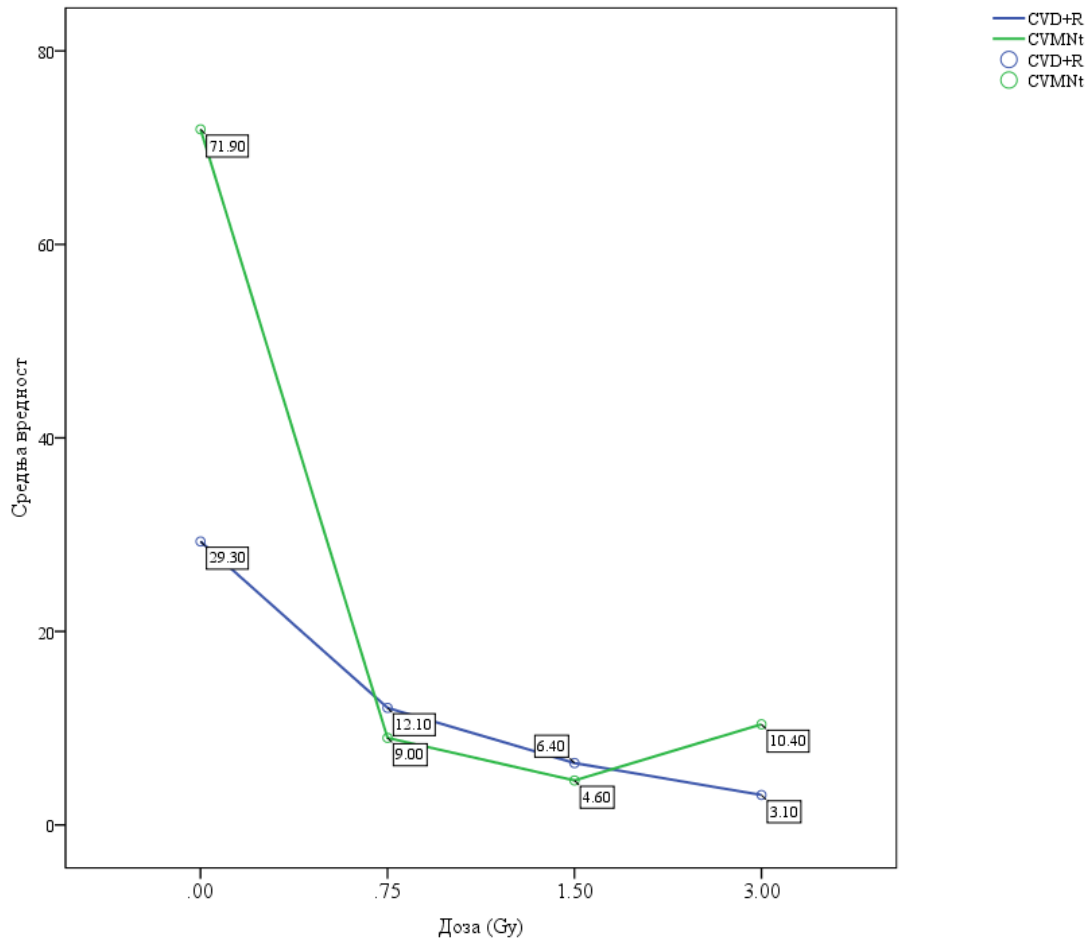
$$CV = \frac{sd}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

у којој *sd* представља стандардну девијацију за посматрани параметар на датој дози, а \bar{x} аритметичку средину посматраног параметра на датој дози.

Табела 30 и графикони 45-51 приказују вредности коефицијената варијације за посматране параметре на свим дозама.

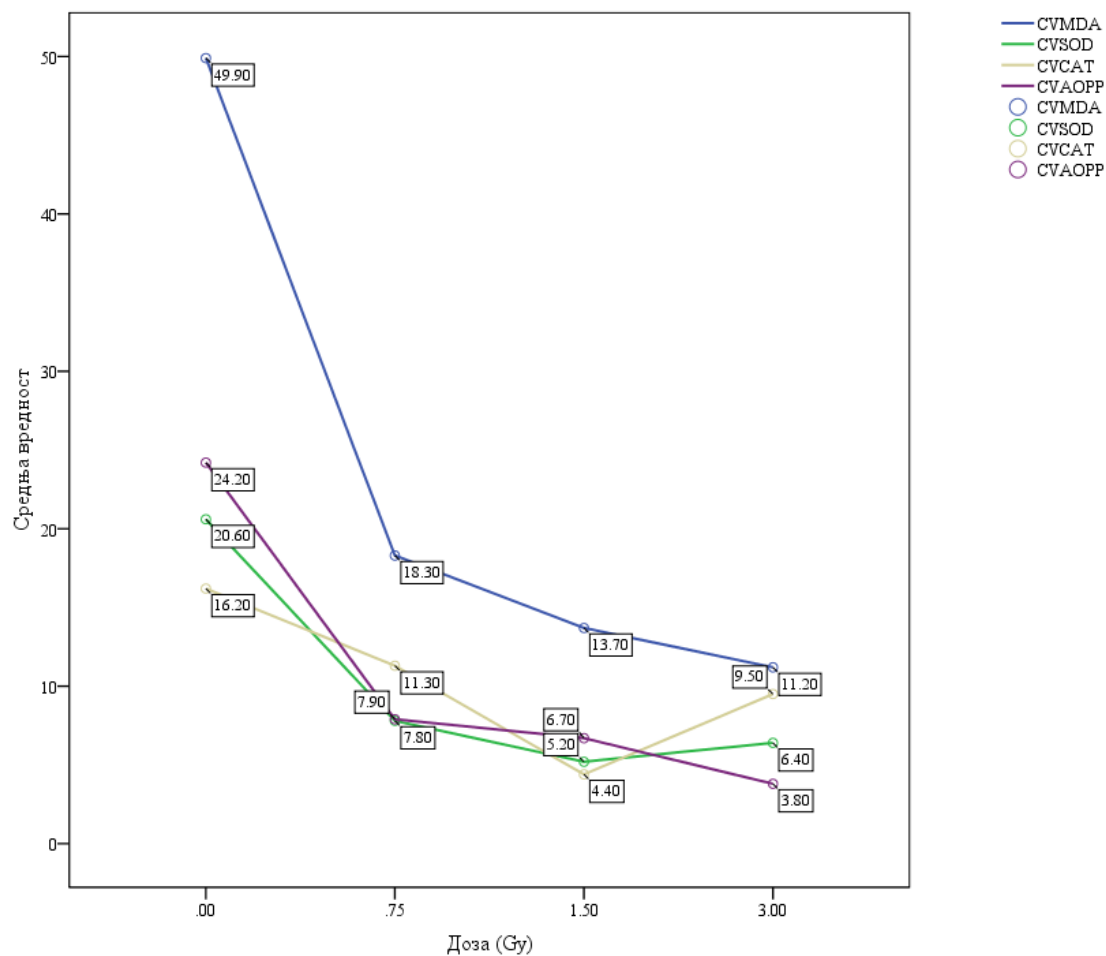
Табела 30. Вредности коефицијента варијације за параметре D+R , MNt , MDA, SOD, CAT, AOPP, TOS, TAS, IOS на свим дозама

Параметар \ Доза	D+R	MNt	MDA	SOD	CAT	AOPP	TOS	TAS	IOS
0	29.31	71.9	49.9	20.6	16.2	24.2	32.7	27.2	41.3
0.75	12.1	9.0	18.3	7.8	11.3	7.9	10.6	19.7	21.5
1.5	6.4	4.6	13.7	5.2	4.4	6.7	7.1	29	32.01
3	3.1	10.4	11.2	6.4	9.5	3.8	5.7	35.2	49.16



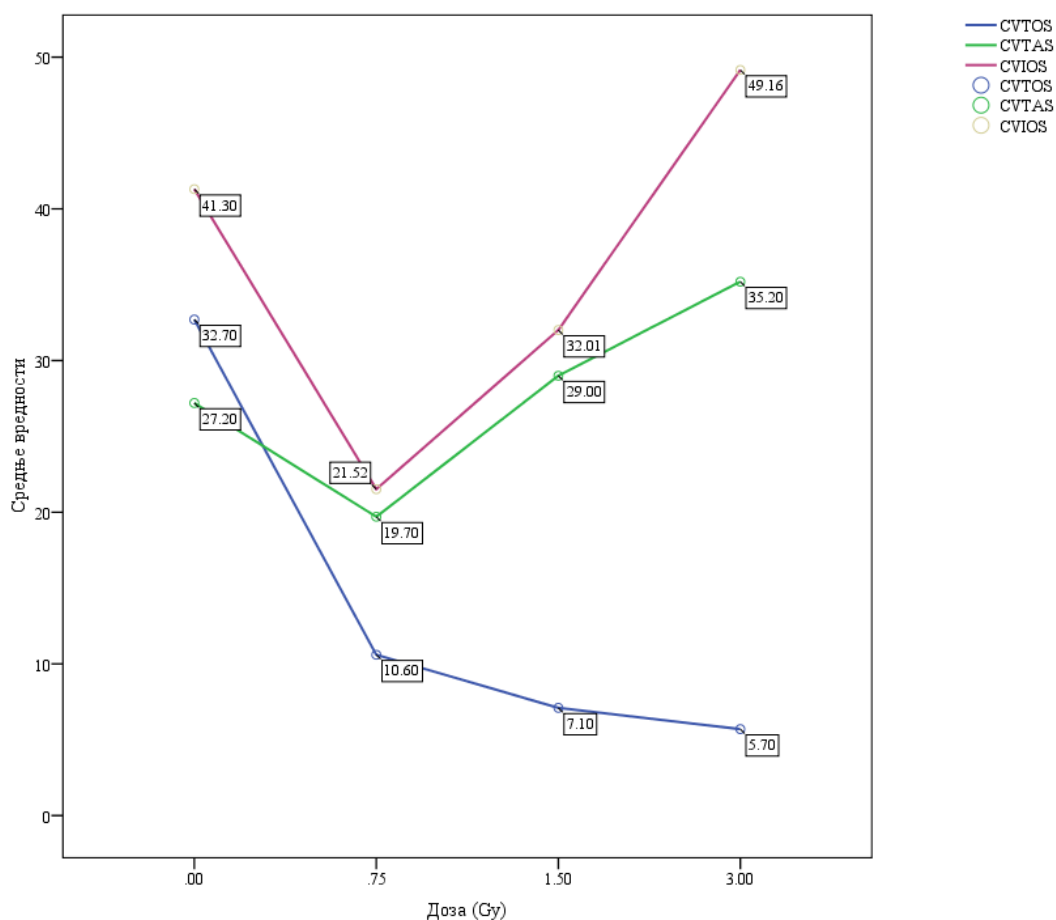
Графикон 47. Групна варијабилност у одговору на зрачење за цитогенетичке параметре ($D+R$ и MN_t)

Анализом резултата табеле 30 и графикана 47 може се, за оба посматрана цитогенетичка параметра, уочити смањење групне варијабилности са повећањем дозе зрачења. Вредности коефицијената варијације за параметар $D+R$ на свим дозама су испод 30%, што говори хомогеним узорцима. За параметар MN_t , коефицијент варијације на дози од 0 Gy износи 71.9%, што указује на нехомоген узорак, док су узорци на вишим дозама хомогени, судећи по вредностима њихових коефицијената варијације.



Графикон 48. Групна варијабилност за биохемијске параметре (MDA, SOD, CAT и AOPP)

За биохемијске параметре који описују оксидативни стрес (MDA, AOPP) и антиоксидантни одговор (SOD, CAT) коефицијенти варијације мањи су од 30%, осим за MDA на 0 Gy, што указује на хомогеност узорака.



Графикон 49. Коефицијенти варијације за параметре оксидативног статуса (TOS, TAS и IOS)

Коефицијенти варијације за параметре оксидативног статуса (TOS, TAS и IOS) карактеришу се различитим вредностима и трендовима у односу на апликоване дозе зрачења. За параметар TOS групна варијабилност опада са порастом дозе, док је ситуација са остала два параметра другачија-прво се уочава опадање (на дозама 0 и 0.75 Gy), а затим пораст вредности коефицијената варијације и (у неким ситуацијама) повећање групне хетерогености на дозама вишим од 0.75 Gy.

За све анализиране параметре групна варијабилност у одговору на деловање јонизујућих зрачења мења се са порастом апликоване дозе. У складу са коефицијентима варијације, приказаним у табели 30, јасно се уочава да је групна варијабилност, представљена учесталашћу дицентричних и ринг хромозома (параметар D+R), мања, а узорци хомогенији у односу на варијабилност изражену кроз вредност осталих анализираних параметара.

Даље се, анализом групне варијабилности у одговору на зрачење, издвајају две групе параметара: прва, која укључује дицентричне и ринг хромозоме и параметре MDA, AOPP и TOS, који се одликују смањењем групне варијабилности са повећањем дозе и друга група, коју чине параметри MN_t, SOD, CAT и TAS, која такође показује смањење групне варијабилности са повећањем дозе, до дозе од 3 Gy, на којој се варијабилност повећава.

5. ДИСКУСИЈА

Пут од апсорбоване дозе јонизујућег зрачења до индукције хромозомских и геномских промена и крајњих биолошких последица представља серију блиско повезаних процеса. Иако је след догађаја по озрачивању биолошких система универзалан, појединачни кораци се могу разликовати, како међу различитим врстама, тако и између припадника исте врсте⁶⁸.

Главни циљ бројних радиобиолошких истраживања⁶⁸⁻⁷³, спроведених због оптимизације радиотерапијских излагања зрачењу, био је успостављање предиктивних тестова који би омогућили процену радиосензитивности нормалних и туморских ткива сваке индивидуе пре излагања зрачењу, како би учинак радиотерапије био максималан, уз најмање могуће штетне ефекте зрачења по здрава ткива. Најважније откриће ових истраживања је да биолошки измерена доза или ефекти зрачења варирају, некад веома много, између јединки, односно, да одговор на зрачење карактерише интер-индивидуална варијабилност.

Досадашње студије^{28,36,40,41,74} бавиле су се утицајем репаративних капацитета на формирање биолошких маркера експозиције и ефекта озрачивања (хромозомских и генских мутација) у циљу евалуације индивидуалне радиосензитивности *in vitro*. Ово истраживање имало је за циљ да евалуира утицај оксидативног статуса донора на разлике у одговору на деловање зрачења, кроз испитивање корелације параметара оксидативног статуса и учесталости биомаркера деловања зрачења – дицентричних и ринг хромозома и микронуклеуса и утврди постоји ли могућност увођења новина у рутинску праксу биомониторинга зрачењу изложених популација.

Популација обухваћена истраживањем састављена је од 56 здравих донора подвргнутих цитогенетичким и биохемијским испитивањима у циљу утврђивања разлика у биолошком одговору на зрачење.

Цитогенетички параметри анализирани у овој студији обухватају: број дицентричних и прстенастих хромозома (D+R), укупан број микронуклеуса (MN_t) и параметре дистрибуције микронуклеуса у бинуклеарним лимфоцитима (MN₁-MN₆), специфичне параметре микронуклеус теста (NB, NPB), параметре цитостазе (NDI, M₁-M₄) и цитотоксичности (NC, AC).

Анализом вредности цитогенетичких параметара за цео узорак, приказаних у табели 4а, и њиховим поређењем са референтним вредностима, утврђеним за здраве, неизложене припаднике опште популације^{39,65,66}, може се уочити постојање статистички значајне разлике у средњим вредностима параметара MN_1 , MN_2 и MN_3 . Ови параметри описују дистрибуцију микронуклеуса у бинуклеарним лимфоцитима и не могу се тумачити засебно, већ искључиво као параметри који ближе одређују распоред укупног броја микронуклеуса (параметар MN_t) у бинуклеарним лимфоцитима једне особе³⁹. Како просечне добијене и референтне вредности параметра MN_t (укупан број микронуклеуса на 1000 анализираних бинуклеарних лимфоцита) нису статистички значајно различите, виша средња вредност параметра MN_1 и ниже средње вредности параметара MN_2 и MN_3 у односу на референтне вредности датих параметара, могу се објаснити разликама у дистрибуцији микронуклеуса (припадници истраживане популације имали су више бинуклеарних лимфоцита са једним, а сразмерно мање бинуклеарних лимфоцита са 2, односно 3 микронуклеуса), при чему се разлика у дистрибуцији није одразила на укупан број микронуклеуса у испитиваним у односу на референтне узорке.

Статистички значајна разлика између добијених и референтних вредности утврђена је и за параметар NDI – индекс деобе једра. Без обзира на одступања, средња и граничне вредности параметра NDI у сагласности су и са вредностима добијеним за припаднике опште популације Србије⁶⁶ и са подацима које је, у оквиру валидације методе за CBMN тест, објавио Fenech³⁹.

Није утврђена статистички значајна разлика у средњим, минималним и максималним вредностима осталих цитогенетичких и биохемијских параметара у односу на референтне вредности, што је потврдило да испитивану групу чини репрезентативан узорак здравих, неизложених припадника опште популације, оба пола.

Параметри који описују цитогенетичка оштећења анализирани су у односу на пол, старост и навику конзумирања цигарета, као факторе који, у складу са литературним подацима^{54-57,75-79}, могу утицати на њихову базалну инциденцу.

Анализа у односу на пол показала је статистички значајне разлике у просечним вредностима параметара M_1 (0 Gy), M_4 (0.75 Gy), NDI (0.75 Gy) и M_3 (3 Gy) (веће

просечне вредности у мушком полу), M₁ (0.75 Gy), NB (0.75 Gy), NPВ (0.75 Gy), NC (0.75 Gy) и NC (1.5 Gy) (више просечне вредности код донора женског пола).

Параметри M₁, M₃, M₄ и NDI, као параметри цитостазе, описују митотички статус^{39,80}. Учесталост вијабилних моно-, би- и мултинуклеираних ћелија мери се у генотоксиколошким истраживањима у циљу одређивања цитостатичког ефекта и степена митотичке активности лимфоцита, која се може израчунати помоћу индекса деобе једра (параметар NDI)³⁹.

Једина до сада спроведена истраживања, која су укључила и испитивање разлика у поменутих параметрима између здравих женских и мушких припадника опште популације^{55,65,80}, нису показала постојање статистички значајних разлика.

Нуклеусни пупови (параметар NB) и нуклеоплазматични мостићи (NPВ) су параметри који, заједно са микронуклеусима, описују статус хромозомске нестабилности^{39,81}.

Нуклеусни пупови се карактеришу истом морфологијом као микронуклеуси, али су, за разлику од њих, везани за главни нуклеус широм или ужом ручицом, у зависности од стадијума пупљења⁸². Представљају процес елиминације амплификоване ДНК, комплекса репарације ДНК и вероватно прекобројних хромозома из анеуплоидних ћелија⁸². Процес пупљења одиграва се у току S-фазе ћелијског циклуса, али је судбина амплификоване ДНК и микронуклеуса који настају у крајњој фази овог процеса, непозната^{39,81}. Студије повезују њихов настанак са деловањем кластогених агенаса (γ-зрачења)⁸³.

Резултати овог истраживања конзистентни су са другим^{52,54,80,82}, која такође нису пронашла статистички значајан утицај пола испитаника на учесталост нуклеусних пупова у неозраченим узорцима, укључујући и два спроведена у Лабораторији за биодозиметрију и цитогенетику, на припадницима опште популације Србије^{65,66}.

Не постоје, међутим, литературни подаци о разликама у учесталости овог параметра међу половима на различитим дозама зрачења, те се статистички значајна разлика на дози од 0.75 Gy најпре може објаснити интер-индивидуалним разликама, дефицијенцијом фолне киселине и нешто израженијим репаративним одговором код донора женског пола^{33,36,51,78}. Доста је, наиме, убедљивих доказа из литературе да је дефицијенција фолата и кобаламина (витамина B₁₂) повезана са повећаним оштећењима хромозома и повећањем броја микронуклеуса у

лимфоцитима периферне крви⁸⁴⁻⁸⁶. Улога оба микронутријента повезана је са поправкама молекула ДНК и верношћу ДНК синтезе. Фолат је донор метил групе у синтези тимидилата, неопходног за поправку оштећења ДНК и ДНК синтезу. Витамин Б₁₂ је неопходан за конверзију хомоцистеина у метионин, који ствара S-аденозил метионин, неопходан за метилацију ДНК⁸⁵. Fenech је показао постојање позитивне корелације између нивоа хомоцистеина у плазми и микронуклеуса, и обрнуту корелацију између Б₁₂ витамина, фолатног статуса и броја микронуклеуса^{85,87}.

Нуклеоплазматични мостићи представљају биомаркер хромозомских реаранжмана и обезбеђују директне доказе геномских оштећења насталих од непоправљених прекида ланаца ДНК^{39,82,83}. Шта више, по озрачивању и индукцији оксидативних оштећења, анализирање нуклеоплазматичних мостића може се користити за идентификацију грешака у рекомбинационим репаративним путевима и карактеризацију различитих генотоксичних механизма^{83,88}.

Неке од до сада спроведених студија које су укључивале анализу овог параметра, показале су одсуство разлике међу половима на неозраченим узорцима^{54,64,65,80,81,83}, док су неке друге установиле постојање разлике, са нижим вредностима NPВ параметра код женских испитаника⁸³. Резултати овог истраживања у сагласности су са првом групом истраживача. Према литературним подацима, овај параметар није праћен на узорцима озраченим различитим дозама зрачења. Виша вредност код донора женског пола на дози од 0.75 Gy, може бити показатељ израженијег одговора на озрачивање, који се, због природе настанка овог феномена и чињенице да је анализиран у лимфоцитима, као зрелим хематопоезним ћелијама, објашњава комплексним међусобним интеракцијама различитих фактора, укључујући и животне навике, изложеност генотоксинима из природних извора или генетичке предиспозиције донора^{54,55,89}.

Некротичне (NC) и апоптотичне ћелије (AC) су параметри цитотоксичности^{39,82}. Апоптотични лимфоцити пролазе програмирану ћелијску смрт, а некроза представља алтернативну форму ћелијске смрти, за коју се сматра да је узрокована оштећењем ћелијских мембрана, органела и/или критичним метаболичким путевима неопходним за ћелијско преживљавање^{36,83}.

Слично осталим истраживањима^{54,64,65,80,82,88}, ни ова студија није показала присуство статистички значајне разлике у некротичним и апоптотичним ћелијама међу половима на неозраченим узорцима. Ипак, ово истраживање указало је да постоје разлике у броју некротичних ћелија у односу на пол, при дозама од 0.75 и 1.5 Gy. Како о томе не постоје одговарајући литературни подаци, овакви резултати могли би се приписати израженијем оксидативном одговору женских донора и, следствено, већом вероватноћом активације/инактивације неког од метаболичких путева укљученог у процес некрозе, на вишим дозама зрачења.

Одсуство очекиване, и бројним студијама потврђене^{54,82,84,89}, разлике у учесталостима укупног броја микронуклеуса у односу на пол, старост и навик у конзумирања цигарета, може се објаснити саставом испитиване групе, чија је просечна старост 30.45 ± 10.43 година. Просечна старост особа женског пола износила је 30.44 ± 10.41 година, а просечна старост мушких испитаника 30.45 ± 10.64 година. Повећана инциденца микронуклеуса код особа женског пола пре свега се објашњава елиминацијом X хромозома који улази у састав микронуклеуса, а тај се процес у значајнијој мери очекује тек половином пете деценије живота^{54,76-80}.

Литературни подаци који говоре о утицају цигарета на учесталост микронуклеуса/хромозомских аберација су различити и често опречни^{54,55,79-82}, али је коначан закључак да се статистички значајно повећање инциденце оштећења може очекивати код особа које пуше више од 30 цигарета дневно. Као генерални закључак Bonassi и сарадници⁵⁵ препоручују обавезно и детаљно сакупљање података, како о конзумирању, тако и о броју цигарета, у току спровођења биомониторинг студија, јер просто поређење пушача и непушача може водити невалидним резултатима. Анализа анамнестичких упитника, које су попунили сви испитаници узети у обзир за ово истраживање сврстала је, у односу на статус конзумирања цигарета, истраживану популацију у две групе - непушаче (никада нису конзумирали цигарете, нити друге дуванске производе) и пушаче (свакодневно пуше између 10 и 20 цигарета на дан), те су добијени подаци о утицају конзумирања цигарета, у складу са истраживањима обједињеним у мета-анализе⁵⁵.

Скоро сви анализирани цитогенетички параметри показали су дозно зависно повећање учесталости. Уочена је статистички значајна разлика ($p < 0.001$), како у учесталостима цитогенетичких параметара при дози од 0 Gy, у односу на озрачене узорке, тако и између узорака озрачених различитим дозама.

Анализа резултата табеле 6 издваја три групе параметара. Првој групи припадају параметри који показују статистички значајне разлике у средњим вредностима на свим апликованим дозама: D+R, MN_t, MN₁, MN₂, MN₃, MN₄. Добијени подаци у складу су са свим до сада спроведеним истраживањима у области радиобиологије и радиолошке заштите^{2,3,91-107}. Наиме, дицентрични и прстенасти хромозоми (параметар D+R) још се од раних 60-тих година прошлог века користе у биодозиметријске сврхе. Биодозиметрија представља методологију прорачуна апсорбоване дозе јонизујућих зрачења помоћу приноса биомаркера (дицентричних и прстенастих хромозома), добијених из хуманих лимфоцита периферне крви – малих „биолошких дозиметара“^{3,91}. Дицентрични хромозоми, као структурне хромозомске аберације изазване искључиво деловањем зрачења на хумани геном, показују дозно-зависни пораст, нарочито у опсегу доза 0.1 - 5 Gy, те је дицентрик тест познат и као “златни стандард“ у биодозиметрији и радиолошкој заштити^{2,3,92}. Цитокинезис-блок микронуклеус тест се, од стандардизације^{39,83} налази на листи биодозиметријских тестова Међународне агенције за атомску енергију^{3,92}, управо због тога што се и учесталост укупног броја микронуклеуса и параметара дистрибуције микронуклеуса у бинуклеарним лимфоцитима карактерише дозно-зависним порастом, нарочито у опсегу доза од 0.2 – 4 Gy^{3,91,92,105,108}.

У другу групу спадају параметри који показују статистички значајне разлике у средњим вредностима између појединих доза: специфични параметри микронуклеус теста - нуклеусни пупови (NB), без статистички значајне разлике на дозама од 0 и 0.75 Gy, нуклеоплазматични мостићи (NPB), без статистички значајне разлике у просечним вредностима између доза од 0.75 и 1.5 Gy. Како су све студије које су испитивале утицај различитих доза зрачења на формирање микронуклеуса преодоминантно биле фокусиране на учесталост микронуклеираних ћелија и њихову дистрибуцију^{3,65,91,92,94,95,98,105,107}, литературни подаци о дозно-зависном одговору за специфичне параметре микронуклеус теста

(NB и NPВ) не постоје. Као могуће објашњење одсуства статистички значајног пораста у учесталостима ових параметара при нижим и релативно блиским дозама намеће се управо њихова релативна неспецифичност (у односу на микронуклеусе), а која условљава постојање статистички значајне разлике тек између 0 и 3 Gy. Иако нису довољно робустни за директну примену у биодозиметрији, могу послужити као индикатори алтерација у амплификацији ДНК индукованих експозицијом зрачењу³. Шта више, постоје подаци који говоре у прилог томе да се ови параметри могу користити за процену дозе по акутној експозицији вишим дозама (5–7 Gy), у комбинацији са CBMN тестом¹⁰⁸.

Трећој групи припадају параметри који не показују дозно зависне разлике: MN₅ и MN₆ (параметри који описују дистрибуцију микронуклеуса), параметри цитотоксичности – број апоптотичних и број некротичних ћелија и параметри цитостазе (M₁ - M₄, NDI).

Недостатак дозно-зависног одговора за параметре MN₅ и MN₆ очекиван је и у складу са литературним подацима^{2,3}: X-зрачење, као зрачење ниског линеарног-енергетског трансфера, одликује се великом продорношћу и депозицијом мале количине енергије (одговорне за настанак биолошких оштећења) на својој путањи. С тим у вези, при озрачивању овим квалитетом зрачења не очекују се мултипла оштећења ћелија (5 или више микронуклеуса и/или дицентричних хромозома по бинуклеарном лимфоциту/метафазној фигури), чак ни при високим дозама.

Иако се верује да је апоптоза један од механизма деплеције лимфоцита као раног одговора на озрачивање^{2,3,4}, ова студија није показала постојање значајне разлике у учесталости апоптотичних ћелија на различитим дозама зрачења. Постоје и друге студије са сличним резултатима^{39,65,66,98,107}, како за апоптотичне, тако и за некротичне ћелије. Једно од могућих објашњења је и експериментална процедура у овој студији, која је подразумевала извођење анализа на узорцима озраченим истог дана, док литература наводи да се апоптоза прати на ћелијским културама после 24 часа од озрачивања¹⁰⁹.

Одсуство дозног одговора за параметре цитостазе објашњава се чињеницом да учесталост биомаркера анализирана CBMN_{Cyt} тестом може варирати, у зависности од генотоксичних и цитотоксичних карактеристика типа зрачења и

дефицијенције нутријената (пре свега фолне киселине) на различитим дозама зрачења – тако је X-зрачење ефикасно у индукцији биомаркера геномских оштећења, али скоро да нема ефекта на параметре цитостазе и ћелијске смрти (параметре цитотоксичности)³⁹.

Детаљна анализа показала је да извесни доноси имају више или ниже учесталости неких цитогенетичких параметара, у односу на групни просек при одређеној дози зрачења, тачније да одговоре донора карактерише постојање интер-индивидуалне варијабилности.

Посматрањем појединачних учесталости обе врсте биомаркера на свим дозама зрачења (графикони 12 и 13) може се уочити изражена интер-индивидуална варијабилност на највишој апликованој дози (3 Gy). Иако на први поглед овај резултат одступа од очекиваног, може се објаснити исцрпљивањем механизма антиоксидантне заштите већ при дози од 1.5 Gy, при чему на дози од 3 Gy улогу у одговору на зрачење играју репаративни механизми. Њихова функција зависи од полиморфизама гена који учествују у репарацији радијацијом узрокованих оштећења молекула ДНК, тј генетичке предиспозиције, која се и сама одликује варијабилношћу с обзиром на број гена укључених у ове процесе и број могућих генотипова^{2-4,74}.

У случају интер-индивидуалне варијабилности праћене кроз процентуалну заступљеност донора са вишим или нижим одговором од просечног, за учесталост дицентричних и прстенастих хромозома на дози од 0 Gy уочавају се две специфичности: прва је скоро потпуно одсуство ових биомаркера (скоро 90% донора има 0 дицентрика/рингова на 1000 анализираних метафазних фигура), а друга, следствено, одсуство интер-индивидуалне варијабилности за овај параметар при датој дози. Оба резултата могу се објаснити специфичним пореклом ове врсте структурних хромозомских абериација – скоро су искључиво индуковане специфичним интеракцијама јонизујућег зрачења са генетичком материјалом и из тог разлога им је учесталост у општој популацији (тзв. „background value“) једнака нули^{2,3,92}. За све друге апликоване дозе зрачења може се уочити доста висок проценат донора са учесталостима дицентрика и рингова блиским просеку и генерално, мање изражена интер-индивидуална варијабилност него што је то случај са микронуклеусима. И овај резултат налази своје

објашњење у природи настанка и базалним учесталостима обе врсте генетичких биомаркера – за разлику од дицентрика, микронуклеуси могу (иако у мањој мери) бити индуковани и неким хемијским агенсима егзогеног и ендеогеног порекла^{3,39,54,92}; осим тога, базалне учесталости микронуклеуса варирају од 0 - 40 на 1000 анализираних бинуклеарних лимфоцита на нивоу светске популације³ (у Србији од 0-15 на 1000 бинуклеара, са просеком од 8.31 ± 3.88)⁶⁶. Осим наведених литературних података, и неке од скорашњих студија^{65,66,98,107} говоре у прилог резултатима добијеним у овом истраживању - да се интер-индивидуална варијабилност у одговору на зрачење може боље идентификовати микронуклеус тестом него праћењем учесталости дицентрика у лимфоцитима периферне крви.

Ипак, очекивано, са порастом дозе расте и проценат одговора блиских групном просеку за оба параметра и уочава се тренд смањења групне варијабилности, израженији за дицентричне хромозоме него за микронуклеусе^{65,66,98,107}.

У складу са коефицијентима варијације, приказаним у табели 30, јасно се уочава да је групна варијабилност, представљена учесталошћу обе врсте цитогенетичких параметара, мања, а узорци хомогенији у односу на варијабилност изражену кроз вредност осталих анализираних параметара. Једно од могућих објашњења је механизам њиховог настанка – дицентрични хромозоми и микронуклеуси скоро су ексклузивно индуковани сложеним интеракцијама јонизујућих зрачења са молекулом ДНК, док се биохемијски параметри могу активирати и радикалима узрокованим неким другим агенсима¹⁰⁸⁻¹¹⁶, не само зрачењем, због чега су, без обзира на изражен дозно-зависни одговор, релативно неспецифични у односу на цитогенетичке биомаркере – микронуклеусе и дицентрике.

Поређењем дицентрик и микронуклеус теста, уочава се разлика у вредностима коефицијената калибрационих крива са вишим вредностима коефицијента α (који описује тренд на нижим дозама) за микронуклеус тест, и вишим вредностима коефицијента β , који описује тренд на вишим дозама, за дицентрик тест. Другим речима, X зрачење је на нижим дозама ефикасније у индукцији микронуклеуса него дицентричних/ринг хромозома, док се на вишим дозама овај тренд мења, у корист дицентрика, који, као радијациони биомаркери, боље описују дозно-зависни одговор^{2,3,92}.

Биохемијски параметри оксидативног стреса и антиоксидантног одговора, анализирани у овој студији обухватају: концентрацију малондиалдехида (MDA) и завршних оксидативних продуката протеина (AOPP) - показатеље оксидативног стреса и активност ензима супероксид дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT), као параметре антиоксидантне заштите.

У табели 8, датој у прилогу, приказане су просечне, минималне и максималне вредности свих анализираних биохемијских параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора на свим апликованим дозама зрачења, за цео узорак, женски и мушки пол, пушаче и непушаче.

Референтне вредности за анализиране биохемијске параметре разликују се у зависности од примењене методе, јер за већину не постоји стандардни тест. Различите студије употребљавале су различите методологије, анализирајући параметре у серуму и/или плазми, и изражавајући њихове концентрације у различитим јединицама, због чега су вредности за већину параметара неупоредиве са вредностима добијеним у овој студији. Осим тога, доказано је постојање разлика у вредностима већине ових параметара између различитих популационих група¹¹⁷. Разлика између вредности добијених у овој и другим студијама се може објаснити и разликама у дизајну експеримената, броју и животним навикама испитаника и односу полова, као факторима који могу битно утицати на базалну инциденцу параметара оксидативног стреса и антиоксидантне заштите^{110-112, 116,118-120}.

Статистичка анализа по полу показала је више средње вредности параметра активност SOD (0 Gy) и MDA (0.75 Gy) код припадника мушког и параметра активност CAT (0.75 Gy) код особа женског пола. Литературни подаци за дате параметре у неозраченим узорцима су различити и често контрадикторни, што се делом може објаснити разликама у коришћеним методама испитивања ензимске активности и величином узорка¹¹⁰. Неки аутори¹¹⁰ пронашли су више средње вредности параметара активност SOD и CAT код особа женског пола, док неки нису детектовали разлике међу половима у овим параметрима^{112,113}. Ниједна студија, међутим, не наводи могуће узроке разлике у датим параметрима међу половима, нити постојање евентуалног клиничког значаја. Међутим, управо ову разлику истраживачи сматрају једним од узрочника утврђене интер-индивидуалне

варијабилности у посматраним параметрима¹⁰⁸⁻¹¹⁸. За параметар MDA и подаци у овој студији, али и литературни подаци, указују на више вредности код млађих припадника мушког пола, у односу на припаднице женског пола сличних година¹¹⁹, објашњавајући разлику вишеструким изворима малондиалдехида (осим липидне пероксидације): процесом активације томбоцита и синтезом тромбоксана¹¹⁹⁻¹²¹, као и интензивним физичким активностима¹²²⁻¹²⁴. Неки истраживачи наводе и да су разлике у нивоу естрогена узрок виших вредности малондиалдехида код припадника мушког пола^{125,126}.

У односу на категорију конзумирања цигарета, ова студија пронашла је статистички значајно више вредности параметра AOPP (0.75) и MDA (1.5) и (3) код пушача. Ови резултати у сагласности су са недавно спроведеним студијама¹²⁷⁻¹²⁹, док једна студија наводи да конзумирање цигарета не утиче на оксидативни и антиоксидантни баланс код здравих особа¹⁹. Дувански дим садржи велику количину радикала у гасовитој и чврстој фази, али и других оксиданата који могу узроковати оксидативни стрес. Мерења антиоксиданата, као маркера оксидативног стреса, константно потврђују да пушачи пате од повишеног оксидативног стреса у поређењу са непушачима¹³⁰⁻¹³⁵. Како пушачи имају и лошије навике у исхрани у односу на непушаче, детаљније студије које су поредиле унос нутријената, показале су да се бар витамин Ц и β-каротен се уклањају пушењем^{135,136}. Зато се пушачи често узимају за референтну популацију континуирано експоновану егзогеном оксидативном стресу *in vivo*¹³⁰. У закључку, MDA позитивно корелира са пушачким статусом. Варијабилност у литературним подацима вероватно је узрокована великим бројем коришћених аналитичких процедура. Међутим, како је у питању једноставна анализа, препорука је малондиалдехид разматрати у светлу скрининг маркера оксидативних оштећења липида¹³⁰. Одсуство корелације осталих маркера оксидативног стреса код пушача у овој студији може се објаснити релативно малобројном групом особа, које конзумирају највише до 20 цигарета дневно.

У односу на животне навике испитаника, не постоје статистички значајне разлике ни у једном од праћених параметара оксидативног стреса. Објашњење налазимо у саставу испитиване групе у којој доминирају донори са здравим (30 од 56) и умерено здравим (25 од 56) животним навикама, које подразумевају здраву

исхрану, смањено конзумирање алкохола, умерену али константну физичку активност.

Сви анализирани параметри оксидативног стреса показали су статистички значајну дозно-зависну промену концентрације.

Концентрација малондиалдехида, биомаркера липидне оксидације¹⁹, статистички се значајно повећавала са повећањем дозе до 3 Gy. Липиди су, као ћелијски макромолекули који улазе у састав ћелијских мембрана, природне мете оксидације. Депозиција енергије по принципу случајности, карактеристична за деловање јонизујућих зрачења на живе системе, чини да и ћелијска мембрана буде мета радијационих оштећења са сличном вероватноћом као и нуклеус. Реакција мембранских липида у присуству кисеоника резултује у липидној пероксидацији. Један од продуката разградње липидних пероксида, малондиалдехид, мења флуидност мембране индукујући фазну транзицију из кристалног у гел стање¹³⁷. Преласком из кристалног у гел стање повећава се микровискозност мембране, формирањем укрштених веза између липидних радикала смањује се ширина липидног двослоја и мобилност угљоводоничних ланаца, што за последицу има повећање ригидности и промену пермеабилности плазма-мембране^{139,140}. Како је липидна пероксидација ефекат који се појачава са повећањем дозе и смањењем брзине испоручивања дозе⁴, пораст у концентрацији малондиалдехида са повећањем апликоване дозе у експерименталним условима ове студије је очекиван.

Анализа појединачних вредности параметра MDA на свим дозама зрачења показала је изражену интер-индивидуалну варијабилност. Поређењем графикана 21 и вредности коефицијената варијације за параметар MDA (графикон 46), уочава се, међутим, без обзира на изражену интер-индивидуалну варијабилност при свакој дози, тренд смањења групне варијабилности са повећањем дозе. Оба резултата потврђена су другим студијама^{118,119,141}, које су нашле и интра-индивидуалне варијације у концентрацији малондиалдехида, али су због констатоване мале групне варијабилности сугерисале коришћење овог параметра као биомаркера липидне пероксидације на групној основи.

Супероксид-дисмутаза је металопротеин, који код сисара постоји у три изоформе: (SOD₁ [CuZnSOD]; SOD₂ [MnSOD]; SOD₃ [ecSOD]) и свака је продукт

различитих гена и различите је субцелуларне локализације, али катализује исту реакцију дисмутације супероксидног анјона у кисеоник и водоник пероксид¹⁴². У овој студији проучавана је активност изоформе CuZnSOD, која представља главну цитосолну супероксид-дисмутаза. Присутна је у форми хомодимера и углавном локализована у цитосолу и у мањој фракцији у интермембранском простору митохондрије, али су истраживања показала присуство ензима у нуклеусу, лизозомима и пероксизомима^{142,143} и широку дистрибуцију у различитим типовима ћелија^{142,143}. Активност овог ензима зависи од присуства бакра и цинка; цинк је неопходан за одржавање стабилности и заузимање правилне конформације протеина, а бакар за реакцију дисмутације.

Активност цитосолне супероксид-дисмутазе повећавала се са повећањем апликоване дозе зрачења. Овакав резултат донекле је у сагласности са резултатима добијеним у другим студијама¹⁴⁴, у којима је уочено статистички значајно повећање цитосолне супероксид дисмутазе до дозе од 1 Gy, а затим опадање активности овог ензима са даљим повећавањем дозе X зрачења до 4 Gy. Супероксид-дисмутаза имају кључну улогу у спречавању оштећења молекула ДНК узокваних реактивним слободним радикалима и њихова активност зависи од квалитета и јачине апликоване дозе зрачења¹⁴⁴. Све је више података који потврђују да супероксидни анјон представља сигнални молекул који може регулисати експресију ензима антиоксидантне заштите и истовремено модулирати ефикасност антиоксидантне одбране и поправке молекула ДНК^{145,146}. Активност CuZnSOD значајно опада по озрачивању протонима, али не и X-зрацима¹⁴⁴. Зрачења ниског ЛЕТ-а индукују појачану активност CuZnSOD, која штити ДНК од реактивних кисеоничних радикала и у извесној мери редукује степен оштећења молекула ДНК. Овај механизам је дозно-зависан и активан до дозе од око 1 Gy; после те дозе, активност супероксид-дисмутазе у ћелији опада у мањој или већој мери. Линеарно-квадратни модел, коришћен и у овој студији за описивање дозног одговора, показује једнак тренд: за SOD је линеарни коефицијент, који дефинише активност ензима на дозама до 1 Gy, већи од квадратног коефицијента, што указује на ефикаснију индукцију активности ензима на мањим дозама. Ипак, констатовано статистички значајно повећање активности овог ензима са повећањем дозе може се објаснити експерименталним

поступком - у студији је испитивана активност серумске супероксид-дисмутазе. По озрачивању вишим дозама дошло је до оштећења ћелијских мембрана и изливања садржаја, а како овај ензим постоји не само у цитосолу већ и у извесним ћелијским органелама и интермембранском простору¹⁴³, измерене концентрације не корелирају у потпуности са активношћу ензима, односно утврђено повећање концентрације није одраз повећања активности ензима, већ других процеса који су се одвијали симултано, као (за експеримент) нежељени пропратни догађаји озрачивања. Ово објашњење потврђено је и анализом процентуалне заступљености одговора донора на растућим дозама, израженог кроз активност SOD: са повећањем дозе повећава се и број донора са нижим одговором од групног просека.

Иста анализа, али и анализа појединачних одговора, показале су присуство изражене интер-индивидуалне варијабилности. Ови налази у складу су са резултатима других истраживача, који су такође констатовали постојање разлике у вредностима ензима, уз претпоставку да пол и животне навике бар делом представљају узрок нађене варијабилности¹⁰⁸⁻¹¹⁷.

Каталаза је тетрамерни ензим антиоксидантне заштите, чија свака субјединица садржи молекул хема. Основна улога му је разградња водоник пероксида, нарочито у условима у којима концентрација овог слободног радикала расте изнад физиолошких вредности. Иако је механизам разградње непознат, верује се да се одиграва у 2 фазе уз учешће молекула гвожђа из хема. Управо улогом и специфичним узроком активације може се објаснити истовремено повећање активности каталазе и супероксид дисмутазе са порастом апликоване дозе у овој студији. Коефицијенти дозно-зависне криве показују мање смањење активности каталазе у поређењу са супероксид-дисмутазом са порастом дозе, вероватно због већих количина ослобођеног водоник пероксида на вишим дозама, које узрокују активацију овог ензима.

Детаљна анализа појединачног одговора сваког донора показала је, као и у случају свих претходно поменутих параметара, постојање интер-индивидуалне варијабилности. У односу на просечне учесталости, неки донори имали су више, а неки ниже вредности. И овај налаз у сагласности је са резултатима других студија¹⁰⁸⁻¹¹⁶.

Анализа групне варијабилности показала је, слично као за супероксид-дисмутазу, тренд смањења до дозе од 1.5 Gy, а затим повећање варијабилности на дози од 3 Gy. Једно од могућих објашњења овог налаза је да на дози од 3 Gy улогу у одговору на зрачење играју најотпорнији механизми и сигнални путеви, између осталог и сигнални молекули који, на тако високој дози могу са различитом ефикасношћу регулисати експресију ензима антиоксидантне заштите и истовремено модулирати ефикасност антиоксидантне одбране.

За разлику од осталих биомолекула, протеини нису одмах препознати као мете оксидативних оштећења – дуго се сматрало да нису посебно осетљиви. Ове претпоставке су одбачене истраживањима која су доказала да су аминокиселине, пептиди и протеини осетљиви на реактивне радикале једнако колико и остали биомолекули^{147,148}. Оксидативна оштећења протеина могу бити значајна *in vivo* што због њихових директних оштећења, која могу резултовати у поремећају функције рецептора, ензима, транспортних протеина¹⁴⁹⁻¹⁵¹, што због доприноса ових поремећаја секундарним оштећењима других биомолекула – инактивација ензима који учествују у поправци молекула ДНК и губитак прецизности ДНК полимеразе у репликацији¹⁵². Оштећења протеина сложенија су у односу на ДНК: уместо четири базе и једног молекула шећера, у овом случају фигурира двадесет аминокиселина различите хемијске структуре, од којих свака може реаговати са реактивним радикалима на различите начине^{153,154}. Оксидација протеина може резултовати настанком аминокиселинских радикала, који даљим реакцијама могу узроковати настанак и накопљање других облика реактивних радикала¹⁵⁴. Оксидација посебно осетљивих аминокиселинских остатака, накопљање, укрштене везе, фрагментација, губитак ензимских и других функција које протеини обављају убрајају се у неке од документованих доказа^{61,147,148}.

Слично осталим анализираним параметрима и концентрација завршних продуката оксидације протеина показала је дозно-зависно повећање вредности, као и интер-индивидуалну варијабилност на свим дозама зрачења. Виша вредност α коефицијента дозно-зависне криве указује на ефикаснију индукцију оксидације протеина на нижим него на вишим дозама X зрачења. Истраживања вредности серумског АОРР после озрачивања целог тела високим дозама γ – зрачења, такође

су показала да сисари на озрачивање реагују дозно-зависном повећањем концентрације завршних оксидативних протеинских продуката¹⁵⁵.

За разлику од осталих параметара, АОРР показује приближно једнак степен интер-индивидуалне варијабилности на свим дозама и смањење групне варијабилности са повећањем дозе.

Биохемијски параметри оксидативног статуса, анализирани у овој студији обухватају: тотални оксидативни статус (TOS), тотални антиоксидантни статус (TAS) и индекс оксидативног стреса (IOS).

Слично параметрима оксидативног стреса и антиоксидантног одговора, референтне вредности за анализирани биохемијске параметре разликују се у зависности од примењене методе, јер за већину не постоји стандардни тест^{156,157}.

Разлика између вредности добијених у овој и другим студијама објашњава се разликама у дизајну експеримената, различитим методологијама (анализа параметара у серуму и/или плазми, употреба различитих техника којим се доказује присуство и концентрација датог параметра), разликама у броју и животним навикама испитаника и односу полова. Због тога су вредности за већину параметара неупоредиве са вредностима добијеним у овој студији.

Статистичка анализа показала је значајност разлике између испитаника мушког и женског пола у средњим вредностима параметра индекс оксидативног стреса (IOS) на дози од 1.5 Gy, са вишим средњим вредностима датог параметра код испитаника женског пола. Две студије спроведене на здравим припадницима опште популације, показале су такође статистички значајне разлике у маркерима оксидативног стреса између полова, са вишим вредностима анализираних параметара код жена^{158,159}, иако добијени подаци не одражавају оно што би се очекивало, с обзиром на добро познате антиоксидантске особине женских хормона, одговорних такође и за највеће разлике међу половима, када је реч о различитим патолошким стањима^{160,161}. Разлике у резултатима у односу на друге студије^{161,162} могу бити узроковане различитим методама коришћеним за одређивање биомаркера оксидативног стреса у телесним течностима, али и руковањем узорцима, које се показало као изузетно значајан фактор у процени оксидативног стреса *in vivo*¹⁵⁸. Ипак, Vignon-Zellweger сарадници¹⁶⁴ сугеришу да

су код сисара разлике међу половима у експресији протеина укључене у оксидативни стрес и метаболизам енергије.

Није утврђена значајна разлика код осталих параметара у односу на пол, категорију конзумирања цигарета и животне навике испитаника. И ови резултати налазе потпору у литератури^{162,163}, а могу се објаснити сличним и углавном здравим животним навикама, као и релативно хомогеном узорку када је реч о годинама старости испитаника.

Сви анализирани параметри оксидативног статуса показали су статистички значајне разлике у просечним вредностима у односу на апликовану дозу зрачења: TOS и IOS повећање вредности, а TAS смањење вредности са повећањем дозе.

Иако нема литературних података који би подржали налазе ове студије, јер слична истраживања нису до сада рађена, резултати су очекивани. Са порастом дозе, очекује се и повећање свих чинилаца укупног оксидативног статуса, са истовременим смањењем укупног антиоксидантног статуса и исцрпљивањем механизма антиоксидантне заштите (због денатурације протеина на високим дозама), а индекс оксидативног стреса је, као количник ове две величине, пропорционалан укупном оксидативном статусу.

Интер-индивидуална, али и групна варијабилност у параметрима оксидативног статуса показана је и у овој и у другим студијама¹⁵⁶⁻¹⁶³, а објашњава се како различитим животним навикама, тако и разликама у генетичкој предиспозицији и комбинацији полиморфизама гена одговорних за реакцију на оксидативни стрес узрокован високим дозама зрачења.

Непараметарска корелациона анализа показала је, на свакој од апликованих доза зрачења, постојање позитивних корелација између цитогенетичких параметара и параметара цитостазе. Мало је уочених статистички значајних корелација између цитогенетичких и биохемијских параметара, док корелације биомаркера деловања зрачења (дицентричних и прстенастих хромозома и микронуклеуса) са биохемијским параметрима оксидативног стреса, антиоксидантног одговора и оксидативног/ антиоксидантног статуса, нису уочене. Иако су студије сличне овој ретке¹⁴⁴ и не тако обухватне, потврдиле су одсуства корелације у формирању цитогенетичких биомаркера (дицентричних хромозома и микронуклеуса) са активношћу извесних биохемијских параметара (супероксид-дисмутаза).

Зашто овакве корелације одсуствују у здравим ћелијама? Ниво оштећења молекула ДНК је у стању равнотеже између степена оксидативног оштећења и степена уклањања лезија помоћу механизма репарације^{149,165}. Неке од оксидацијом оштећених форми биомолекула (липидни пероксиди) се метаболишу брзо^{149,165}. Оксидовани протеини се деградирају протеазама далеко спорије. Тако, чак и да су сви биомолекули у ћелији оштећени, степен и време појаве биомаркера оваквих оштећења може веома много да варира^{149,165}. Зато је немогуће уочити директне корелације између појаве појединих биомаркера оксидативног оштећења биомолекула и биомаркера оштећења генетичког материјала под утицајем зрачења, нарочито у експерименталним *in vitro* условима, ограниченог трајања.

Осим што су поређењем резултата свих примењених тестова уочене интер-индивидуалне разлике у одговору донора на зрачење, без обзира на апликовану дозу зрачења и метод којим је одговор изражен, Т-тест за независне узорке показао је да цитогенетички (HRR_{D+R} , HRR_{MNI}) и параметри који описују оксидативна оштећења (HRR_{MDA} , HRR_{TOS} , HRR_{AOPP}), као и параметар који описује свеукупни одговор - $HRR_{OVERALL}$, имају више средње вредности у групи донора са вишим одговором од просека, док параметри антиоксидантне заштите (HRR_{SOD} , HRR_{CAT} , HRR_{TAS}) имају више просечне вредности у групи особа са одговором нижим од просечног. Корелациона анализа ових параметара потврдила је налазе Т-теста, а и очекивања када је одговор на зрачење у питању – донори лошијег антиоксидантног статуса, чија је основна улога заштита од реактивних радикала насталих озрачивањем ћелија, показали су већи степен цитогенетичких оштећења и бурније одговорили на озрачивање. Насупрот њима, група донора са бољом антиоксидантном заштитом, показала је нижи одговор на зрачење од очекиваног при датој дози.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Резултати добијени у овој студији показали су:

1. постојање интер-индивидуалне варијабилности у формирању цитогенетичких параметара – дицентричних и прстенастих хромозома и микронуклеуса при истим дозама зрачења, уз констатацију да се далеко мања варијабилност уочава у формирању дицентрика у поређењу са микронуклеусима,
2. истовремено дозно-зависно формирање датих параметара, односно повећање њихове учесталости са повећањем дозе, при чему је X зрачење на нижим дозама ефикасније у индукцији микронуклеуса него дицентричних/ринг хромозома, док се на вишим дозама овај тренд мења, у корист дицентрика, који боље описују дозно-зависни одговор
3. израженију интер-индивидуалну варијабилност показатеља оксидативног статуса него што је то случај са цитогенетичким биомаркерима, али и
4. постојање дозно-зависног тренда у променама концентрација показатеља оксидативног статуса, са констатованим повећањем концентрације параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора и смањењем вредности параметра тотални антиоксидантни статус са повећањем апликоване дозе.

Даље су резултати показали:

5. одсуство корелација биомаркера деловања зрачења (дицентричних и прстенастих хромозома и микронуклеуса) са биохемијским параметрима оксидативног стреса, антиоксидантног одговора и оксидативног/антиоксидантног статуса,
6. постојање корелације између цитогенетичких и биохемијских параметара који описују одговор (HRR параметара),
7. донори лошијег антиоксидантног статуса показују већи степен цитогенетичких оштећења и бурнији одговор на озрачивање и на супрот

њима, група донора са бољом антиоксидантном заштитом, показује нижи одговор на зрачење од очекиваног при датој дози.

8. да одговор на зрачење не можемо посматрати као просту корелацију у вредностима појединачних цитогенетичких и биохемијских параметара, већ кроз сложен систем међусобних интеракција различитих механизма и сигналних путева који се активирају услед деловања генотоксичних агенаса на ћелију, а од којих неки могу следити једни друге, неки бити позитивно, а неки негативно међусобно спрегнути. Када се томе дода чињеница да свака особа носи скоро јединствену комбинацију полиморфизама бројних гена укључених у антиоксидантну заштиту и репарацију оксидативних оштећења молекула ДНК, постаје јасно да је одговор на зрачење комплексан и често непредвидив. Ипак, од свих параметара анализираних у овој студији, поред добро проучених и бројним истраживањима валидованих дицентрика и микронуклеуса, и параметри оксидативног статуса могу, у рутинској пракси радиолошке здравствене заштите, употпунити профил одговора на континуирану експозицију малим дозама, али и реакцију на нежељена, но ипак присутна, инцидентална/акцидентална озрачивања у примени извора јонизујућих зрачења.

7. РЕФЕРЕНЦЕ

- [1] Stanković J, Milošević N: Osnovi radiološke fizike, ISBN 978-86-909707-0-4, Beograd. 2007.
- [2] International Atomic Energy Agency (IAEA). Radiation biology: A handbook for teachers and students. TCS 42. International Atomic Energy Agency, Vienna. 2010.
- [3] International Atomic Energy Agency (IAEA), World Health Organization (WHO). EPR-Biodosimetry Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna: International Atomic Energy Agency. 2011.
- [4] Lehnert S. Biomolecular action of ionizing radiation. In: Series in medical physics and biomedical engineering. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton. 2007.
- [5] Sies H. Oxidative stress. Academic Press, San Diego.1985; 1-8
- [6] Sies H. Biochemistry of oxidative stress. Angewandte Chemie. International Edition in English. 1986; 1058-1071.
- [7] Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: Damage to intact cells and organs. Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Biological Sciences. 1985; 311:617-631.
- [8] Rahman T, Hosen I, Islam T, Shekhar HU. Oxidative stress and human health. Advances in Bioscience and Biotechnology. 2012; 3:997-1019.
- [9] Sharma RK Agarwal A. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. Reproductive medicine and Biology. 2004; 4:177-199.
- [10] Kunwar A, et al. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. Journal of Medical and Allied Sciences. 2011; 1:53-60.
- [11] Oberley LW, Lindgren AL, Baker SA, Stevens RH. Superoxide ion as the cause of the oxygen effect. Radiation Research. 1976; 68: 320–328.
- [12] Petkau A, Chelack WS, Pleskach SD. Protection of postirradiated mice by superoxide dismutase. International Journal of Radiation Biology. 1976; 29:297–299.

- [13] Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D. Metabolic oxidation-reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: A unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Review*. 2004; 23: 311–322.
- [14] Swarts SG, Becker D, Sevilla MD, Wheeler KT. Radiation-induced DNA damage as a function of hydration. II. Oxidative base damage. *Radiation Research*. 1996; 145: 304–314.
- [15] Leach JK, Black SM, Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB. Activation of constitutive nitric-oxide synthase activity is an early signaling event induced by ionizing radiation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 15400–15406.
- [16] Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*. 2003; 22: 5734–5754.
- [17] Stanimirovic DB, Wong J, Ball R, Durkin JP. Free radical-induced endothelial membrane dysfunction at the site of blood-brain barrier: Relationship between lipid peroxidation, Na, K-ATPase activity, and ⁵¹Cr release. *Neurochemistry Research*. 1995; 20: 1417–1427.
- [18] Chandra S, Stefani S. Plasma membrane as a sensitive target in radiation induced cell injury and death: An ultrastructural study. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*. 1981; 40: 305–311.
- [19] Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta*. 2007; 380: 50-58.
- [20] Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sciences*. 1991; 48: 301-309.
- [21] Blair I. Lipid-hydroperoxide mediated DNA damage. *Experimental gerontology*. 2001; 36: 1473-1481.
- [22] Ogawa Y, Kobayashi T, Nishioka A, et al. Radiation-induced reactive oxygen species formation prior to oxidative DNA damage in human peripheral T cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2003; 11: 149–152.
- [23] Chandra K, Salman AS, Mohd A, Sweety R, Ali KN. Protection Against FCA Induced Oxidative Stress Induced DNA Damage as a Model of Arthritis and In

- vitro Anti-arthritic Potential of *Costus speciosus* Rhizome Extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2015; 7: 383-389.
- [24] Ward JF. Biochemistry of DNA Lesions. *Radiation Research*. 1985; 104: S103–S111.
- [25] Ward JF. DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 1988; 35: 95–125.
- [26] Ward JF. Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation produced free radicals. *Radiation Research*. 1981; 86: 185–195.
- [27] Ward JF, Milligan JR, Jones GDD. Biological consequences of non-homogenous energy depositions by ionizing radiation. *Radiation Protection Dosimetry*. 1994; 52: 271–276.
- [28] Kryston TB, Georgieva AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. Review. *Mutation Research*. 2011; 711: 193–201.
- [29] Rodrigues AS, Oliveira NG, Monteiro Gil O, Le´onard A, Rueff J. Use of cytogenetic indicators in radiobiology. *Radiation Protection Dosimetry*. 2005; 115: 455-460.
- [30] Decordier I, Dillen L, Cundari E, Kirsch-Volders M. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. *Mutagenesis*. 2002; 17: 137-148.
- [31] Leach NT, Jackson-Cook C. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei? *Mutation Research*. 2004; 554: 89-94.
- [32] Bonassi S, Fenech M, Lando C et al. Human MicroNucleus Project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental Molecular Mutagenesis*. 2001; 37: 31-45.
- [33] Vral A, Thierens H, De Ridder L. In vitro micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*. 1997; 71: 61-68.

- [34] Touil N, Aka PV, Buchet JP, Thierens H, Kirsch-Volders M. Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionizing radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagenesis*. 2002; 17: 223-232.
- [35] Elhajouji A, Van Hummelen P, Kirsch-Volders M. Indication for thresholds of chemically-induced aneuploidy *in vitro* in human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1995; 26: 292-304.
- [36] Kimura M, Umegaki K, Higuchi M, Thomas P, Fenech M. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphisms, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *Journal of Nutrition*. 2004; 134: 48-56.
- [37] Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*. 2000; 455: 81-95.
- [38] Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Van Hummelen P. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research*. 1997; 392: 19-30.
- [39] Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2007; 2: 1084-1104.
- [40] Di Giorgio M, Sardi M, Busto E, Vallerga M, Taja M, Mairal L. Assessment of individual radiosensitivity in human lymphocytes using micronucleus and microgel electrophoresis “Comet” assays. *Proceedings of Third European IRPA Congress June 14–18, 2010, Helsinki, Finland*.
- [41] Twardella D, Chang-Claude J. Studies on radiosensitivity from an epidemiological point of view – overview of methods and results. *Radiotherapy and Oncology*. 2002; 62: 249-260.
- [42] Popanda O, Ebbeler R, Twardella D et al. Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2003; 55: 1216 – 1225.
- [43] Catena C, Conti D, Parasacchi P et al. Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes may predict patient response to radiotherapy. *International Journal of Radiation Biology*. 1996; 70: 301 – 308.

- [44] Catena C, Parasacchi P, Conti D, Sgura A, Trenta G, Righi E, Trinci MM, Trinci M. Peripheral blood lymphocyte decrease and micronucleus yields during radiotherapy. *International Journal of Radiation Biology*. 1997; 72: 575-585.
- [45] Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988; 175: 184-191.
- [46] Tice RR. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. *Environmental mutagenesis*. 1995; 315-339.
- [47] Końca K, Lankoff A, Lisowska H, Kuszewski T, Gózdź S, Koza Z, Wojcik A. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutation Research*. 2003; 534: 15-20.
- [48] Olive PL, Banáth JB, Durand RE. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiation Research*. 1990; 122: 86-94.
- [49] Ejchart A, Sadlej-Sosnowska N. Statistical evaluation and comparison of comet assay results. *Mutation Research*. 2003; 534: 85–92.
- [50] Albertini RJ, Nicklas JA, O'Neill JP. Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environmental Health Perspectives*. 1996; 104: 503-510.
- [51] Barry H. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*. 1996; 16: 33–50.
- [52] Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*. 2000; 49:27–29.
- [53] Poulson HE, Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention*. 1998; 7: 9–16.
- [54] Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral bloodlymphocytes. *Mutagenesis*. 2011; 26: 43–49.
- [55] Bonassi S, Neri M, Lando C, et al. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutation Research*. 2003; 543: 155–166.

- [56] Fenech M et al. HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*. 2003; 534: 65–75.
- [57] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.
- [58] Syn M, Zigman S. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes using the method of adrenaline autooxidation. *Analytical Biochemistry*. 1978; 90: 81-88.
- [59] Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*. 2005; 38: 1103-1111.
- [60] Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 2004; 37: 277-285.
- [61] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Ngyyen-Khoa T, Ngyyen AT, Zingraff J, Jyngers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*. 1996; 49: 1304-1313.
- [62] Ohkawa, H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*. 1979; 95:351-358.
- [63] Roland FB, Irwin WS. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*. 1952; 195:133-140.
- [64] Ainsbury EA, Lloyd DC. Dose estimation software for radiation biodosimetry. *Health Physics*. 2010; 98: 290–295.
- [65] Pajic J, Rakic B, Jovicic D, Milovanovic A. Construction of dose response calibration curves for dicentrics and micronuclei for X radiation in a Serbian population. *Mutation research/Genetic toxicology and environmental mutagenesis*. 2014; 773 : 23-28.
- [66] Pajic J, Jovicic D, Milovanovic A. Micronuclei as a marker for medical screening of subjects continuously occupationally exposed to low doses of

- ionizing radiation. *Biomarkers*. 2016; 1-7. DOI: 10.1080/1354750X.2016.1217934
- [67] Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, Grune T. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radical Research*. 2006; 40: 495–505.
- [68] Cedervall B, Persson L, Polischouk A, Lange C. Perspective on biological dosimetry from the aspect of individual radiosensitivity: the context of DNA double-strand breaks and chromosomal aberrations. *Applied Radiation and Isotopes*. 2000; 52: 1117-1120.
- [69] Cedervall, B. Analysis of X-ray induced DNA double-strand breaks using pulsed gel electrophoresis: application to the study of radiosensitivity of human cells. Thesis. ISBN 91-628-1688-8, Stockholm, Sweden, 1995.
- [70] McKay MJ, Keord RF. The spectrum of *in vitro* radiosensitivity in four human melanoma cell lines is not accounted for by differential induction or rejoining of DNA double-strand breaks. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 1995; 31: 345-352.
- [71] McMillan TJ, Peacock JH. Molecular determinants of radiosensitivity in mammalian cells. *International Journal of Radiation Biology*. 1994; 65: 49-55.
- [72] McMillan TJ, Cassoni AM, Edwards S, Holmes A, Peacock JH. The relationship of DNA double-strand break induction to radiosensitivity in human tumour cell lines. *International Journal of Radiation Biology*. 1990; 58: 427-438.
- [73] Olive PL, Banath JP, MacPhail HS. Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines. *Cancer Research*. 1994; 54: 3939-3946.
- [74] Roy L, Gruel G, Vaurijoux A. Cell response to ionising radiation analysed by gene expression patterns. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. 2009; 45: 272-277.
- [75] Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, et al. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Research*. 1994; 54: 2919-2922.

- [76] Fenech M, Neville S, Rinaldi J. Sex is important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutation Research*. 1994; 313: 203-207.
- [77] Fenech M. Chromosomal damage rate, aging, and diet. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998; 854: 23-36.
- [78] Jones KH, York TP, Jackson-Cook C. Mechanisms leading to the formation of micronuclei containing sex chromosomes differ with age. *Mutation Research*. 2012; 747: 207–217.
- [79] Hando JC, Nath J, Tucker JD. Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromosoma*. 1994; 103: 186–192.
- [80] Battershill JM, Burnett K, Bull S. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring study. *Commentary. Mutagenesis*. 2008; 23: 423-437.
- [81] Donmez-Altuntas H, Bitgen N. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the general population in Turkey by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutation Research*. 2012; 748: 1-7.
- [82] Garaj-Vrhovac V, Durinec M, Kopjar N, Orescanin V. A survey on the cytogenetic status of the Croatian general population by use of the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research*. 2008; 649: 91–100.
- [83] Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*. 2006; 600: 58-66.
- [84] Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutation Research*. 2001; 475: 57-67.
- [85] Fenech M, Dreosti I, Aitken C. Vitamin E supplements and their effect on vitamin E status in blood and genetic damage rate in peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 359-364.
- [86] Abramson-Zetterberg L, Durling LJ, Yang-Wallentin F, Rytter E, Vessby B. The impact of folate status and folic acid supplementation on micronucleus frequency in human erythrocytes. *Mutation Research*. 2006; 603: 33-40.

- [87] 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.
- [88] Fenech M, Kirsh-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parrz J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. A review. *Mutagenesis*. 2011; 26: 125-132.
- [89] Theml H, Diem H, Haferlach T. *Color Atlas of Hematology*. 2nd edition. Thieme, Stuttgart. 2004.
- [90] Haaf T, et al. Sequestration of mammalian Rad51 - recombination protein into micronuclei. *Journal of Cell Biology*. 1999; 144: 11–20.
- [91] Silva-Barbosa I, Pereira Magnata S, Amaral A. Dose assessment by quantification of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes from patients exposed to gamma radiation. *Genetics and Molecular Biology*. 2005; 28: 452–457.
- [92] International Atomic Energy Agency (IAEA). *Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment*. International Atomic Energy Agency Technical Report Series 405. International Atomic Energy Agency, Vienna, 2001.
- [93] Sentamizhchelvan S, Pant GS, Rath GK, Julka PK, Nair O, Joshi RC, et al. Biodosimetry using chromosome aberrations in human lymphocytes. *Radiation Protection Dosimetry*. 2007; 123: 241–245.
- [94] de Lemons Pinto M, Santos NF, Amaral A. Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2010; 49: 567–581.
- [95] Vral A, Fenech M, Thierens H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of *in vivo* ionizing radiation exposure. Review. *Mutagenesis*. 2011; 26: 11–17.
- [96] Edwards AA, Lloyd DC, Purrot RJ. Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution. *Radiation and Environmental Biophysics*. 1979; 16: 89–100.

- [97] Ainsbury EA, Barquinero JF. Biodosimetric tools for a fast triage of people accidentally exposed to ionising radiation: statistical and computational aspects. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. 2009; 45: 307–312.
- [98] Antunes AC, Martins V, Cardoso J, Santos L, Monteiro Gil O. The cytokinesis-blocked micronucleus assay: dose estimation and inter-individual differences in the response to radiation. *Mutation Research*. 2014; 760: 17–22.
- [99] Barquinero JF, Barrios L, Caballin MR, Miró R, Ribas M, Subias A, et al. Establishment and validation of a dose-effect curve for gamma-rays by cytogenetic analysis *Mutation Research*. 1995; 326: 65–69.
- [100] Beinke C, Braselmann H, Meineke V. Establishment of an X-ray standard calibration curve by conventional dicentric analysis as prerequisite for accurate radiation dose assessment. *Health Physics*. 2010; 98: 261–268.
- [101] Lloyd DC, Purrot RJ, Dolphin GW, Bolton D, Edwards AA. The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*. 1975; 28: 75–90.
- [102] Lloyd DC, Edwards AA, J.S. Prosser JS. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by *in vitro* acute X and gamma radiation. *Radiation Protection Dosimetry*. 1986; 15: 83–88.
- [103] Prasanna PGS, H. Loats H, Gerstenberg HM, Torres BN, Shehata CW, Duffy KL, Floura RS, Khusen AW, Jackson WE, Blakely WF. AFRRI's gamma-ray, X-ray, and fission-neutron calibration curves for the dicentric assay: Application of a metaphase finder system. AFRRI Special Publication 02-1, Defense Technical Information Center, Fort Belvoir, VA, 2002.
- [104] Franco MB, Bolognesi C, de Amicis A, Amati A, di Cristofaro S, Regalbuto E, Ropolo M, Lista F, de Sanctis S. Interlaboratory Comparison on Cytokinesis-Block Micronucleus Assay for X-Ray Calibration Curve and Dose Prediction in Italy, in: *STO MEETING PROCEEDINGS. Biological Effects of Ionizing Radiation Exposure and Countermeasures: Current Status and Future Perspectives*, NATO, Ljubljana, 2012, pp. 221–228.
- [105] Martins V, Antunes AC, Monteiro Gil O. Implementation of a dose–response curve for γ -radiation in the Portuguese population by use of the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*. 2013; 750: 50–54.

- [106] Pajic J, Rakic B, Rovcanin B, et al. Inter-individual variability in the response of human peripheral blood lymphocytes to ionizing radiation: comparison of the dicentric and micronucleus assays. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2015; 54: 317–325.
- [107] Müller WU, Rode A. The micronucleus assay in human lymphocytes after high radiation doses (5–15 Gy). *Mutation Research*. 2002; 502: 47–51.
- [108] Bolzán A, Bianchi M, Bianchi N. Superoxid Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase activities in Human Blood: Influence of sex, age and cigarette smoking. *Clinical Biochemistry*. 1997; 30: 449-454.
- [109] Lee HJ, Kim SY, Kil IS, Park JW. Regulation of Ionizing Radiation-induced Apoptosis by Mitochondrial NADP-dependent Isocitrate Dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282: 13385–13394.
- [110] Lipecka K, Grabowska B, Daniszewska K, Domasi T, Cisowska B. Correlation between the superoxide dismutase (SOD) activity in lymphocytes and the yield of radiation-induced chromosome aberrations. *Studia Biophysica*. 1984; 100: 211–217.
- [111] Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1975; 85: 337–341.
- [112] Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A, Sinet PM, Thevenin M. Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry*. 1992; 38: 66–70.
- [113] Bolza'n AD, Bianchi MS, Bianchi NO. Correlation between antioxidant enzyme activities and the chromosome damage induced by radio- and chemotherapy in breast cancer patients. *Cancer Journal*. 1993; 6: 142–6.
- [114] Larramendy ML, Bianchi MS, Padro'n J. Correlation between the antioxidant enzyme activities of blood fractions and the yield of bleomycin-induced chromosome damage. *Mutation Research*. 1989; 214: 129–36.
- [115] Bolza'n AD, Bianchi NO, Larramendy ML, Bianchi MS. Chromosomal sensitivity of human lymphocytes to bleomycin. Influence of antioxidant enzyme activities in whole blood and different blood fractions. *Cancer Genetic Cytogenetic*. 1992; 64: 133–138.

- [116] Lux O, Naidoo D. Biological variability of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in blood. *Redox Report*. 1995; 1: 331–335.
- [117] Collins AR, Gedik CM, Olmedilla B, Southon S, Bellizzi M. Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. *FASEB Journal*. 1998; 12: 1397-1400.
- [118] Powers R, Majors A, Lykins D, Sims C, Lain K, Roberts J. Plasma homocysteine and malondialdehyde are correlated in an age- and gender-specific manner. *Metabolism*. 2002; 51: 1433-1438.
- [119] Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 1990; 9:515-540.
- [120] Meagher EA, Fitzgerald GA. Indices of lipid peroxidation *in vivo*: strengths and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000; 28:1745-1750.
- [121] Nightingale AK, James PP, Morris-Thurgood J, et al. Evidence against oxidative stress as a mechanism of endothelial dysfunction in methionine loading model. *American Journal of Physiology*. 2001; 280: 1334-1339.
- [122] Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1993; 25:218-224.
- [123] Sanchez-Quessada JL, Homs-Serradesanferm R, et al. Increase of LDL susceptibility to oxidation occurring after intense, long duration exercise. *Atherosclerosis*. 1995; 118:297-305.
- [124] Vargas H, Vargas S, Pizzo de Castro MR, Vargas MM, Barbosa DS, Bortolasci CC, Venugopal K, Dodd S, Berk M. Oxidative stress and inflammatory markers are associated with depression and nicotine dependence. *Neuroscience Letters*. 2013; 544: 136–140.
- [125] Borrás C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardo FV, Mann GE, Vina J. 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging Cell*. 2005; 4: 113–118.

- [126] Vina J, Borras C, Gambini J, Sastre J, Pallardo FV. Why females live longer than males? Importance of upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Letters*. 2005; 579: 2541–2545.
- [127] Altuntaş I, Dane S, Gümüştekin K. Effects of cigarette smoking on lipid peroxidation. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2002;13: 69-72.
- [128] Isik B, Ceylan A, Isik R. Oxidative stress in smokers and non-smokers. *Inhalation Toxicology*. 2007; 19: 767-769.
- [129] Chávez J, Cano C, Souki A, Bermúdez V, et al. Effect of cigarette smoking on the oxidant/antioxidant balance in healthy subjects. *American Journal of Therapeutics*. 2007;14: 189-193.
- [130] Lykkesfeldt J, Viscovich M, Poulsen HE. Ascorbic acid recycling in human erythrocytes is induced by smoking in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003;35: 1439–1447.
- [131] Lykkesfeldt J, Prieme H, Loft S, Poulsen HE. Effect of smoking cessation on plasma ascorbic acid concentration. *British Medical Journal*. 1996; 313:391.
- [132] Lykkesfeldt J. Smoking depletes vitamin C: should smokers be recommended to take supplements? In: Halliwell B, Poulsen HE, editors. *Cigarette smoke and oxidative stress*. Springer Verlag; 2006. p. 237–260.
- [133] Lykkesfeldt J. Vitamin C as biomarker and treatment of oxidative stress caused by smoking: methodological and clinical studies. University of Copenhagen; 2005. p. 1–59.
- [134] Poulsen HE, Loft S, Prieme H, et al. Oxidative DNA damage in vivo: relationship to age, plasma antioxidants, drug metabolism, glutathione S transferase activity and urinary creatinine excretion. *Free Radical Research* 1998;29: 565–571.
- [135] Lykkesfeldt J, Christen S, Wallock LM, Chang HH, Jacob RA, Ames BN. Ascorbate is depleted by smoking and repleted by moderate supplementation: a study in male smokers and nonsmokers with matched dietary antioxidant intakes. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000; 71:530–536.
- [136] Dietrich M, Block G, Norkus EP, et al. Smoking and exposure to environmental tobacco smoke decrease some plasma antioxidants and increase gamma

- tocopherol *in vivo* after adjustment for dietary antioxidant intakes. The American Journal of Clinical Nutrition. 2003;77:160–166.
- [137] Ianzini F, Guidoni L, Indovina PL, Viti V, Erriu G, Onnis S, Randaccio P. Gamma-irradiation effects on phosphatidylcholine multilayer liposomes: Calorimetric, NMR, and spectrofluorimetric studies. Radiation Research. 1984; 98: 154–166.
- [138] Stark G. The effect of ionizing radiation on lipid membranes. Biochimica et Biophysica Acta. 1991; 1071: 103–122.
- [139] Chatterjee SN, Agarwal S. Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation. Free Radicals in Biology and Medicine. 1988; 4: 51–72.
- [140] Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. Clinical chemistry. 1997; 43: 1209-1214.
- [141] Fukai T, Fukai MU. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. Antioxidants and redox signaling. 2011; 15: 1583-1606.
- [142] Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, and Crapo JD. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. Journal of Cell Biology. 1988; 107: 2169–2179.
- [143] Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. Proceedings of National Academy of Sciences U S A 89. 1992; 10405–10409.
- [144] Joksić G, Pajović SB, Stanković M, Pejić S, et al. Chromosome aberrations, micronuclei, and activity of superoxide dismutases in human lymphocytes after irradiation *in vitro*. Cellular and molecular life sciences. 2000; 57: 842-850.
- [145] Mohan N, Meltz LM. Induction of nuclear factor kB after low-dose ionizing radiation involves a reactive oxygen intermediate signaling pathway. Radiation Research. 1994. 14: 97–104.
- [146] Pennisi E. Superoxides relay ras protein's oncogenic message. Science. 1997; 275: 1567–1568.
- [147] Wolff SP, Garner A, Dean RT. Free radicals, lipids and protein degradation. Trends in Biochemical Sciences. 1986; 11: 27-31.

- [148] Davies U. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *Journal of Biological Chemistry*. 1987; 262: 9895-9901.
- [149] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 2004; 142: 231–255.
- [150] Halliwell B. Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase. *Cell Biology International Reports*. 1978; 2: 113–128.
- [151] Casciola-Rosen L, Wigley F, Rosen A. Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis. *Journal of Experimental Medicine*. 1997; 185: 71–79.
- [152] Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemistry Journal*. 1996; 313: 17–29.
- [153] Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1999; 27: 1151–1163.
- [154] Headlam HA, Davies MJ. Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2003. 34: 44–55.
- [155] Güney Y, Türkçü ÜÖ, Mertoğlu Ö, Bilgihan A, Hiçsönmez A, Andrieu MN, Kurtman C. Serum AOPP, selenium and vitamin E levels after irradiation. *Turkish Journal of Cancer*. 2006; 36: 019-022.
- [156] Jansen E, Ruskovska T. Comparative Analysis of Serum (Anti) oxidative Status Parameters in Healthy Persons. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14: 6106-6115.
- [157] Motor S, Ozturk S, Ozcan O, Gurpinar AB, Can Y, Yuksel R, Yenin JZ, Seraslan G, Ozturk OH. Evaluation of total antioxidant status, total oxidant status and oxidative stress index in patients with alopecia areata. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2014;7: 1089-1093.
- [158] Brunelli E, Domanico F, La Russa D, Pellegrino D. Sex Differences in Oxidative Stress Biomarkers. *Current Drug Targets*. 2014; 15: 000-000.

- [159] Vassalle C, Novembrino C, Maffei S, et al. Determinants of oxidative stress related to gender: relevance of age and smoking habit. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2011; 49: 1509-13.
- [160] Miller AA, De Silva TM, Jackman KA, Sobey CG. Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007; 34: 1037-1043.
- [161] Pajovic SB, Saicic ZS. Modulation of antioxidant enzyme activities by sexual steroid hormones. *Physiology Research*. 2008; 57: 801-811.
- [162] van Kesteren PJ, Kooistra T, Lansink M, et al. The effects of sex steroids on plasma levels of marker proteins of endothelial cell functioning. *Thrombosis and Haemostasis*. 1998; 79: 1029-1033.
- [163] Ide T, Tsutsui H, Ohashi N, et al. Greater oxidative stress in healthy young men compared with pre-menopausal women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002; 22: 1239-1242.
- [164] Vignon-Zellweger N, Relle K, Rahnenführer J, Schwab K, Hocher B, Theuring F. Endothelin-1 overexpression and endothelial nitric oxide synthase knock-out induce different pathological responses in the heart of male and female mice. *Life Sciences*. 2013; S0024-3205: 750-759.
- [165] England T, Beatty E, Rehman A, Nourooz-Zadeh J, Pereira P, O'Reilly J, Wiseman H, Geissler C, Halliwell B. The steady-state levels of oxidative DNA damage and of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) are not correlated in healthy human subjects. *Free Radical Research*. 2000; 32: 355-362.

ПРИЛОЗИ

Табела 4а. Просечне, минималне и максималне вредности свих анализираних цитогенетичких параметара на дози од 0 Gy

Параметар	Цео узорак		Женски пол		Мушки пол		Пушачи		Непушачи	
	Опсег (min-max)	Просек ± SD	Опсег (min-max)	Просек ± SD	Опсег (min-max)	Просек ± SD	Опсег (min-max)	Просек ± SD	Опсег (min-max)	Просек ± SD
D+R	0 - 1	0.11±0.31	0-1	0.07±0.27	0-1	0.14±0.35	0-1	0.05±0.22	0-1	0.14±0.35
MN _t	2 - 46	9.86±7.1	2-46	10.85±9.46	2-17	8.93±3.69	3-16	9.05±3.6	2-46	10.31±8.44
MN ₁	2-32	8.75±5.35	2-32	9.41±7.03	2-17	8.14±3.09	3-14	8.2±2.91	2-32	9.06±6.34
MN ₂	0-7	0.50±1.13	0-7	0.67±1.44	0-3	0.34±0.72	0-3	0.35±0.74	0-7	0.58±1.3
MN ₃	0-1	0.04±0.19	0-1	0.04±0.19	0-1	0.03±0.18	0-1	0.05±0.22	0-1	0.03±0.17
MN ₄	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MN ₅	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MN ₆	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M ₁	148-400	270.12±58.91	199-400	282.04±66.48	148-340	259.03±49.49	202-390	275.45±55.07	148-400	267.17±61.5
M ₂	39-285	148.87±53.03	39-245	142.07±55.88	83-285	155.21±50.39	63-245	149.8±46.41	39-285	148.36±57.01
M ₃	7-45	21.52±8.62	7-42	18.96±8.33	7-45	23.9±8.32	942	21±9.04	7-45	21.81±8.5
M ₄	17-88	59.48±18.10	17-88	56.93±22.15	37-85	61.86±13.26	17-86	53.75±21.13	21-88	62.67±15,6
NB	0-8	2.93±1.84	0-6	3.04±1.58	0-8	2.83±2.07	0-6	3±1.65	0-8	2.89±1.95
NPB	0-2	0.30±0.50	0-2	0.37±0.56	0-1	0.24±0.43	0-1	0.3±0.47	0-2	0.31±0.52
NC	0-5	2.13±1.49	0-5	2.30±1.44	0-5	1.97±1.55	0-5	1.85±1.66	0-5	2.28±1.39
AC	0-5	2.07±1.52	0-5	2±1.47	0-5	2.14±1.56	0-4	1.85±1.39	0-5	2.19±1.6
NDI	1.35-1.98	1.74±0.17	1.34-1.96	1.7±0.21	1.53-1.98	1.77±0.12	1.38±1.96	1.71±0.18	1.35-1.98	1.76±0.16

Табела 46. Просечне, минималне и максималне вредности свих анализираних цитогенетичких параметара на дози од 0.75 Gy

Параметар	Цео узорак		Женски пол		Мушки пол		Пушачи		Непушачи	
	Опсег (min-max)	Просек ± SD	Опсег (min-max)	Просек ± SD	Опсег (min-max)	Просек ± SD	Опсег (min-max)	Просек ± SD	Опсег (min-max)	Просек ± SD
D+R	5-9	6.87±0.83	6-9	7.04±0.89	5-9	6.72±0.75	6-9	6.9±0.79	5-9	6.86±0.87
MNt	72-108	84.43±7.1	73-108	85.93±8.45	72-103	83.03±6.47	73-103	85.35±7.03	72-108	83.92±7.9
MN ₁	2-32	8.75±5.35	53-95	69.97±7.62	42-78	65.76±7.02	59-75	67.40±5.09	42-95	67.78±8.63
MN ₂	0-7	0.50±1.13	3-14	6.78±2.88	4-14	6.83±2.3	3-14	7±3.01	3-13	6.69±2.34
MN ₃	0-1	0.04±0.19	0-2	0.7±0.72	0-2	0.97±0.73	0-2	0.9±0.79	0-2	0.81±0.71
MN ₄	0	0.00±0.00	0-1	0.15±0.36	0-1	0.03±0.18	0-1	0.1±0.31	0-1	0.08±0.28
MN ₅	0	0.00±0.00	0	0	0-1	0.03±0.18	0-1	0.05±0.22	0	0
MN ₆	0	0.00±0.00	0	0	0-1	0.07±0.26	0-1	0.1±0.31	0	0
M ₁	148-400	270.12±58.91	198-415	283.70±56.27	115-352	250.10±59.94	117-385	266.60±60.41	115-415	266.14±60.8
M ₂	39-285	148.87±53.03	61-244	161.81±51.38	99-336	181.79±63.71	76-336	175.65±66.32	61-326	170.22±54.5
M ₃	7-45	21.52±8.62	2-35	17.48±8.85	9-39	21.48±7.87	3-38	18.10±9.49	2-39	20.36±7.96
M ₄	17-88	59.48±18.10	9-65	37±16.47	20-89	46.62±19.25	9-89	39.65±20.25	10-89	43.28±17.54
NB	0-8	2.93±1.84	0-15	3.67±3.48	0-6	1.83±1.89	0-12	2.75±3.21	0-15	2.69±2.76
NPB	0-2	0.30±0.50	0-9	4.74±2.94	0-14	2.97±3.14	0-9	3.20±3.00	0-14	4.17±3.22
NC	0-5	2.13±1.49	0-14	3.7±3.23	0-3	0.76±0.95	0-7	1.75±2.05	0-14	2.42±3.08
AC	0-5	2.07±1.52	0-5	2.7±1.46	0-5	2.34±1.61	0-5	2.55±1.6	0-5	2.50±1.52
NDI	1.35-1.98	1.74±0.17	1.25-1.87	1.61±0.16	1.44-2.06	1.73±0.15	1.36-1.98	1.66±0.15	1.25-2.06	1.68±0.17

Табела 4в. Просечне, минималне и максималне вредности свих анализираних цитогенетичких параметара на дози од 1.5 Gy

Параметар	Цео узорак		Женски пол		Мушки пол		Пушачи		Непушачи	
	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD
D+R	19-25	20.41 \pm 1.3	19-25	20.67 \pm 1.41	19-24	20.17 \pm 1.17	19-21	19.95 \pm 0.69	19-25	20.67 \pm 1.49
MN _t	162-206	179.77 \pm 8.28	167-206	181.07 \pm 8.90	162-197	178.55 \pm 7.6	167-197	178.5 \pm 7.97	162-206	180.47 \pm 8.47
MN ₁	109-166	136.16 \pm 12.37	119-150	134.74 \pm 8.8	109-166	137.48 \pm 14.99	115-155	134.10 \pm 12.3	109-166	137.31 \pm 12.43
MN ₂	9-26	15.95 \pm 3.82	11-22	16.56 \pm 2.79	9-26	15.38 \pm 4.55	10-25	15.9 \pm 4.05	9-26	15.97 \pm 3.74
MN ₃	0-6	2.70 \pm 1.44	0-6	2.85 \pm 1.43	0-6	2.55 \pm 1.45	0-6	3 \pm 1.72	0-5	2.53 \pm 1.25
MN ₄	0-2	0.68 \pm 0.66	0-2	0.70 \pm 0.54	0-2	0.66 \pm 0.77	0-2	0.55 \pm 0.69	0-2	0.75 \pm 0.65
MN ₅	0-1	0.16 \pm 0.37	0-1	0.22 \pm 0.42	0-1	0.10 \pm 0.31	0-1	0.05 \pm 0.22	0-1	0.22 \pm 0.42
MN ₆	0-1	0.04 \pm 0.18	0-1	0.07 \pm 0.27	0	0	0-1	0.05 \pm 0.22	0-1	0.03 \pm 0.17
M ₁	181-333	261.82 \pm 37.73	181-333	270.11 \pm 37.48	195-320	254.10 \pm 36.93	195-312	257.30 \pm 38.97	181-333	264.33 \pm 37.34
M ₂	91-272	178.52 \pm 43.11	91-272	172.26 \pm 46.12	99-241	184.34 \pm 40.03	108-240	186.15 \pm 40.24	91-272	174.28 \pm 44.61
M ₃	6-37	20.32 \pm 6.91	6-37	20.67 \pm 8	11-32	20.00 \pm 5.85	12-33	20.40 \pm 5.82	6-37	20.28 \pm 7.35
M ₄	14-85	39.34 \pm 17.53	15-82	36.96 \pm 17.79	14-85	41.55 \pm 17.31	15-64	36.15 \pm 13	14-85	41.11 \pm 19.56
NB	0-16	3.93 \pm 2.56	1-8	3.89 \pm 1.98	0-16	3.97 \pm 3.04	0-7	3.35 \pm 1.93	1-16	4.25 \pm 2.83
NPB	0-14	4.27 \pm 2.79	0-9	4.04 \pm 2.78	1-14	4.48 \pm 2.83	0-14	4.75 \pm 3.21	0-10	4 \pm 2.54
NC	0-9	1.88 \pm 2.45	0-9	3.15 \pm 2.73	0-6	0.69 \pm 1.36	0-9	1.85 \pm 2.52	0-8	1.89 \pm 2.45
AC	0-12	3.07 \pm 2.11	0-12	3.26 \pm 2.7	0-5	2.90 \pm 1.4	0-8	3.05 \pm 2.01	0-12	3.08 \pm 2.2
NDI	1.47-1.85	1.67 \pm 0.10	1.48-1.84	1.65 \pm 0.1	1.47-1.85	1.70 \pm 0.09	1.51-1.85	1.68 \pm 0.1	1.47-1.84	1.67 \pm 0.1

Табела 4г. Просечне, минималне и максималне вредности свих анализираних цитогенетичких параметара на дози од 3 Gy

Параметар	Цео узорак		Женски пол		Мушки пол		Пушачи		Непушачи	
	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD
D+R	63-73	68.38 \pm 2.14	66-73	68.89 \pm 2.01	63-72	67.90 \pm 2.19	60-73	68.65 \pm 2.41	63-72	68.22 \pm 2
MN _t	405 –707	459.32 \pm 47.78	412-558	463.96 \pm 39.16	405-707	455.00 \pm 54.96	409-707	472.8 \pm 64.7	405-537	451.83 \pm 33.97
MN ₁	190-289	224.64 \pm 18.99	199-289	227.59 \pm 20.43	190-258	221.90 \pm 17.45	199-270	224.35 \pm 18.6	190-289	224.81 \pm 19.46
MN ₂	52-150	78.25 \pm 14.96	52-104	77.00 \pm 11.84	60-150	79.41 \pm 17.52	60-150	84.3 \pm 19.77	52-104	74.89 \pm 10.35
MN ₃	9-40	19.75 \pm 6.01	12-37	20.93 \pm 5.37	9-40	18.66 \pm 6.24	9-40	19.95 \pm 7.65	11-32	19.64 \pm 4.99
MN ₄	0-8	3.66 \pm 2.13	0-8	3.63 \pm 2.4	1-8	3.69 \pm 1.91	1-8	3.90 \pm 7.65	0-8	3.53 \pm 2.17
MN ₅	0-3	0.75 \pm 0.74	0-3	0.93 \pm 0.73	0-3	0.59 \pm 0.73	0-3	0.7 \pm 0.8	0-3	0.78 \pm 0.72
MN ₆	0-1	0.09 \pm 0.29	0-1	0.07 \pm 0.27	0-1	0.10 \pm 0.31	0-1	0.15 \pm 0.37	0-1	0.06 \pm 0.23
M ₁	108-358	256.09 \pm 38.95	108-358	3253.26 \pm 46.48	198-332	258.72 \pm 30.97	108-300	248.55 \pm 42.1	198-358	260.28 \pm 37.04
M ₂	106-352	181.55 \pm 42.22	113-352	191.11 \pm 47.71	106-248	172.66 \pm 34.89	119-352	188.05 \pm 48.87	106-255	177.94 \pm 38.31
M ₃	5-41	20.20 \pm 6.75	5-30	17.96 \pm 6.28	11-41	22.28 \pm 6.59	12-41	21.75 \pm 7.41	5-29	19.33 \pm 6.29
M ₄	5-88	42.16 \pm 18.33	5-72	37.67 \pm 17.57	15-88	46.34 \pm 18.33	16-74	41.65 \pm 15.54	5-88	42.44 \pm 19.92
NB	1-13	5.05 \pm 2.94	1-13	4.70 \pm 2.83	2-13	5.38 \pm 3.06	1-9	4.05 \pm 1.9	1-13	5.61 \pm 3.28
NPB	2-31	13.16 \pm 7.23	2-28	12.44 \pm 6.87	3-31	13.83 \pm 7.6	4-31	14.95 \pm 6.82	2-31	12.17 \pm 7.35
NC	0-7	2.39 \pm 1.99	0-7	2.22 \pm 2.04	0-7	2.55 \pm 1.97	0-7	2.4 \pm 1.98	0-7	2.39 \pm 2.03
AC	0-15	3.13 \pm 2.83	0-15	3.44 \pm 3.48	0-6	2.83 \pm 2.09	0-15	3.15 \pm 3.6	0-10	3.11 \pm 2.37
NDI	1.39-1.94	1.7 \pm 0.12	1.39-1.91	1.68 \pm 0.13	1.53-1.94	1.71 \pm 0.1	1.56-1.91	1.71 \pm 0.97	1.39-1.94	1.68 \pm 0.13

Табела 6. Средње вредности свих анализираних цитогенетичких параметара у односу на апликовану дозу зрачења, резултат теста и значајност разлике

Параметар	Просек±СД	t	df	P
D+R (0Gy) - D+R (0.75Gy)	0.11±0.31 – 6.88±0.83	-54.22	55	0.00**
D+R (0.75Gy)- D+R (1,5Gy)	6.88±0.83 – 20.41±1.30	-84.02	55	0.00**
D+R (1.5Gy)- D+R (3Gy)	20.41±1.30 – 68.38±2.14	-185.49	55	0.00**
MNt (0Gy) - MNt (0.75Gy)	9.86±7.08 – 84.43±7.57	-83.34	55	0.00**
MNt (0.75Gy) - MNt (1.5Gy)	84.43±7.57 – 179.77±8.28	-84.27	55	0.00**
MNt (1.5Gy) - MNt (3Gy)	179.77±8.28 – 459.32±47.78	-44.71	55	0.00**
MN ₁ (0Gy) - MN ₁ (0.75Gy)	8.75±5.35 – 67.64±7.51	-62.75	55	0.00**
MN ₁ (0.75Gy) - MN ₁ (1.5Gy)	67.64±7.51 – 136.16±12.37	-39.65	55	0.00**
MN ₁ (1.5Gy) - MN ₁ (3Gy)	136.16±12.37 – 224.64±18.99	-29.13	55	0.00**
MN ₂ (0Gy) – MN ₂ (0.75Gy)	0.50±1.13 – 6.80±2.57	-17.24	55	0.00**
MN ₂ (0.75Gy) – MN ₂ (1.5Gy)	6.80±2.57 – 15.95±3.82	-16.28	55	0.00**
MN ₂ (1.5Gy) – MN ₂ (3Gy)	15.95±3.82 – 78.25±14.96	-32.14	55	0.00**
MN ₃ (0Gy) – MN ₃ (0.75Gy)	0.04±1.87 – 0.84±0.73	-8.03	550	0.00**
MN ₃ (0.75Gy) – MN ₃ (1.5Gy)	0.84±0.73 – 2.70±1.44	-8.62	55	0.00**
MN ₃ (1.5Gy) – MN ₃ (3Gy)	2.70±1.44 – 19.75±6.01	-20.93	55	0.00**
MN ₄ (0Gy) – MN ₄ (0.75Gy)	0.00±0.00 – 0.09±2.89	-2.32	55	0.02*
MN ₄ (0.75Gy) – M4 ₁ (1.5Gy)	0.09±2.89 – 0.68±0.66	-6.47	55	0.00**

MN ₄ (1.5Gy) – MN ₄ (3Gy)	0.68±0.66 – 3.66±2.13	-9.84	55	0.00**
MN ₅ (0Gy) – MN ₅ (0.75Gy)	0.00±0.00 – 0.02±0.13	-1.00	55	0.32
MN ₅ (0.75Gy) – MN ₅ (1.5Gy)	0.02±0.13 – 0.16±0.37	-2.66	55	0.01**
MN ₅ (1.5Gy) – MN ₅ (3Gy)	0.16±0.37 – 0.75±0.74	-5.34	55	0.00**
MN ₆ (0Gy) – MN ₆ (0.75Gy)	0.00±0.00 – 0.04±0.18	-1.43	55	0.16
MN ₆ (0.75Gy) – MN ₆ (1.5Gy)	0.04±0.18 – 0.04±0.18	0.00	55	1.00
MN ₆ (1.5Gy) – MN ₆ (3Gy)	0.04±0.18 – 0.09±0.29	-1.35	55	0.18
M ₁ (0Gy) – M ₁ (0.75Gy)	270.13±58.91 – 266.30±60.11	0.40	55	0.69
M ₁ (0.75Gy) – M ₁ (1.5Gy)	266.30±60.11 – 261.82±37.73	0.51	55	0.61
M ₁ (1.5Gy) – M ₁ (3Gy)	261.82±37.73 – 256.09±38.95	0.79	55	0.43
M ₂ (0Gy) – M ₂ (0.75Gy)	148.88±53.03 – 172.16±58.45	-2.59	55	0.01**
M ₂ (0.75Gy) – M ₂ (1.5Gy)	172.16±58.45 – 178.52±43.11	-0.70	55	0.51
M ₂ (1.5Gy) – M ₂ (3Gy)	178.52±43.11 – 181.55±42.22	-0.37	55	0.71
M ₃ (0Gy) – M ₃ (0.75Gy)	21.52±8.62 – 19.55±8.52	1.59	55	0.12
M ₃ (0.75Gy) – M ₃ (1.5Gy)	19.55±8.52 – 20.32±6.91	-0.72	55	0.47
M ₃ (1.5Gy) – M ₃ (3Gy)	20.32±6.91 – 20.20±8.75	0.10	55	0.92
M ₄ (0Gy) – M ₄ (0.75Gy)	59.48±18.1 – 41.98±18.45	5.85	55	0.00**
M ₄ (0.75 Gy) – M ₄ (1.5Gy)	41.98±18.45 – 39.34±17.54	0.80	55	0.43
M ₄ (1.5Gy) – M ₄ (3Gy)	39.34±17.54 – 42.16±18.33	-0.93	55	0.35
NB (0Gy) – NB (0.75Gy)	2.93±1.84 – 2.71±2.90	0.54	55	0.59

NB (0.75Gy) - NB (1.5Gy)	2.71±2.90 – 3.93±2.56	-2.38	55	0.02*
NB (1.5Gy) - NB (3Gy)	3.93±2.56 – 5.05±2.94	-2.58	55	0.01**
NPB (0Gy) - NPB (0.75Gy)	0.30±0.50 – 3.82±3.15	-8.40	55	0.00**
NPB (0.75Gy) - NPB (1.5Gy)	3.82±3.15 – 4.27±2.79	-0.71	55	0.48
NPB (1.5Gy) - NPB (3Gy)	4.27±2.79 – 13.16±7.23	-0.25	55	0.00**
NC (0Gy) - NC (0.75Gy)	2.13±1.49 – 2.18±2.76	-0.14	55	0.88
NC (0.75Gy) - NC (1.5Gy)	2.18±2.76 – 1.88±2.45	0.86	55	0.39
NC (1.5Gy) - NC (3Gy)	1.88±2.45 – 2.39±1.99	-1.14	55	0.26
AC (0Gy) – AC (0.75Gy)	2.07±1.52 – 2.52±1.54	-1.7	55	0.09
AC (0.75Gy) - AC (1.5Gy)	2.52±1.54 – 3.07±2.11	-1.62	55	0.11
AC (1.5Gy) – AC (3Gy)	3.07±2.11 – 3.13±2.83	-0.11	55	0.92
NDI (0Gy) - NDI (0.75Gy)	1.74±0.17 – 1.67±0.16	2.51	55	0.11
NDI (0.75Gy) – NDI (1.5Gy)	1.67±0.16 – 1.67±0.10	0.00	55	0.99
NDI (1.5Gy) - NDI (3Gy)	1.67±0.10 – 1.70±0.11	-1.24	55	0.22

Табела 7. Одговор донора на озрачивање изражен кроз учесталост цитогенетичких параметара D+R и MNt

Доза/Параметар Донор	0Gy		0.75Gy		1.5Gy		3Gy	
	D+R	MN	D+R	MN	D+R	MN	D+R	MN
1	L	H	E	H	H	H	H	L
2	L	H	E	H	H	H	H	L
3	L	L	L	L	E	L	L	L
4	L	L	L	L	L	L	L	L
5	L	L	L	L	E	L	L	L
6	H	E	E	E	E	L	L	L
7	L	H	E	H	E	E	H	L
8	L	L	L	L	L	L	H	H
9	L	E	E	L	E	L	L	L
10	L	L	L	L	L	L	L	L
11	H	H	E	L	E	L	L	L
12	L	E	E	L	E	L	L	L
13	L	E	L	L	L	L	L	L
14	L	H	H	H	H	H	H	L
15	L	H	H	H	H	H	H	H
16	L	L	E	H	E	L	H	H
17	L	H	H	H	H	H	H	H
18	L	H	E	H	E	E	H	H
19	L	H	H	H	E	E	H	H
20	L	L	L	L	E	L	L	L

21	L	L	L	L	E	H	H	H
22	L	E	H	H	H	H	H	H
23	L	H	E	H	H	H	H	H
24	L	L	L	L	E	L	L	L
25	L	H	L	L	L	L	L	L
26	L	H	E	H	E	L	H	E
27	L	L	L	L	L	L	L	L
28	L	H	L	L	L	L	L	L
29	L	E	E	L	L	L	E	L
30	H	L	L	L	H	H	E	H
31	H	L	L	L	H	H	L	H
32	L	L	L	L	H	H	H	H
33	L	L	L	L	H	H	H	H
34	L	L	H	H	E	E	H	L
35	L	L	E	H	H	H	L	H
36	L	H	E	L	E	L	L	L
37	L	H	E	H	H	H	H	L
38	H	E	H	H	E	L	E	H
39	L	L	E	E	H	H	L	H
40	L	L	E	H	H	H	L	L
41	L	L	H	L	E	H	H	H
42	L	L	L	H	H	L	H	H
43	L	L	L	E	E	H	H	H

44	L	L	E	L	H	L	E	H
45	L	L	E	L	E	L	H	L
46	H	L	E	H	E	H	L	L
47	L	L	E	H	E	H	E	L
48	L	L	E	H	E	H	E	L
49	L	L	E	H	H	H	E	H
50	L	L	E	H	H	L	L	L
51	L	E	H	H	E	L	H	H
52	L	H	E	E	L	L	E	H
53	L	H	E	L	E	H	E	L
54	L	H	E	L	L	E	L	L
55	L	L	E	H	L	H	L	L
56	L	L	E	L	L	L	L	L

Табела 8. Просечне, минималне и максималне вредности анализираних биохемијских параметара оксидативног стреса и антиоксидантног одговора на свим апликованим дозама

Параметар	Цео узорак		Женски пол		Мушки пол		Пушачи		Непушачи	
	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD
MDA (0)	0.09-1.19	0.65 \pm 0.32	0.09-1.19	0.68 \pm 0.29	0.11-1.19	0.62 \pm 0.35	0.13-1.19	0.73 \pm 0.33	0.09-1.19	0.6 \pm 0.32
SOD (0)	79.5-161.74	113.85 \pm 23.5	80.87-146.35	105.25 \pm 19.27	79.5-161.74	121.85 \pm 24.55	79.9-161.66	115.25 \pm 21.78	79.50-161.74	113.07 \pm 24.67
CAT (0)	40.36-69.58	54.07 \pm 8.75	40.36-69.34	52.64 \pm 9.39	41.77-69.58	55.4 \pm 8.03	40.36-68.35	51.8 \pm 8.99	40.39-69.58	55.33 \pm 8.47
AOPP (0)	58.09-128.16	94.3 \pm 22.85	58.09-128.16	95.57 \pm 25.88	58.37-123.08	93.2 \pm 21.14	58.37-121.16	95.64 \pm 23.73	58.09-126.49	93.56 \pm 22.64
MDA (0.75)	0.80-1.84	1.41 \pm 0.26	0.93-1.84	1.48 \pm 0.23	0.8-1.75	1.34 \pm 0.26	0.94-1.84	1.37 \pm 0.29	155.13-198.53	180.81 \pm 13.52
SOD (0.75)	155.13-200.01	179.10 \pm 14.03	155.45-198.53	178.04 \pm 13.89	155.13-200.01	180.09 \pm 14.32	155.45-200.01	176.02 \pm 14.75	74.9-111.78	92.48 \pm 10.60
CAT (0.75)	74.90-111.78	94.23 \pm 10.65	74.9-111.78	97.15 \pm 9.85	75.30-110.92	91.51 \pm 10.80	77.42-111.50	97.37 \pm 10.24	144.46-189.36	166.65 \pm 13.78
AOPP (0.75)	144.46-190.93	169.88 \pm 13.49	144.99-189.36	171.63 \pm 12.56	144.46-190.93	168.25 \pm 14.33	150.29-190.93	175.70 \pm 11.04	1.73-2.68	2.07 \pm 0.27
MDA (1.5)	1.73-2.69	2.14 \pm 0.29	1.74-2.69	2.18 \pm 0.32	1.73-2.69	2.09 \pm 0.26	1.76-2.69	2.26 \pm 0.29	204.44-241.74	222.49 \pm 12.06
SOD (1.5)	204.44-241.74	224.19 \pm 11.55	204.44-241.74	224.39 \pm 13.89	208.59-239.03	224 \pm 9.1	204.53-241.58	227.27 \pm 10.15	110.78-130.64	120.19 \pm 4.99
CAT (1.5)	110.78-130.64	120.86 \pm 5.27	110.78-130.64	121.18 \pm 5.24	110.82-130-61	120.56 \pm 5.37	112.61-130.61	122.06 \pm 5.68	211.19-271.81	243.96 \pm 17.08
AOPP (1.5)	211.19-271.81	245.42 \pm 16.49	211.44-271.81	244.72 \pm 17.50	211.19-271.73	246.07 \pm 15.77	215.59-271.46	248.04 \pm 15.45	2.01-3.65	3.05 \pm 0.39
MDA (3)	2.01-3.65	3.14 \pm 0.35	2.01-3.58	3.07 \pm 0.39	2.44-3.65	3.2 \pm 0.29	3.02-3.58	3.3 \pm 0.16	214.61-261.93	237.07 \pm 14.54
SOD (3)	212.41-261.93	234.26 \pm 14.96	212.67-261.93	235.91 \pm 15.25	212.41-259	232.73 \pm 14.8	212.41-259	229.21 \pm 14.72	150.74-200.24	172.53 \pm 15.36
CAT (3)	146.54-200.62	173.56 \pm 16.45	150.74-200.62	177.43 \pm 16.82	146.54-198.16	169.96 \pm 15.52	146.54-200.62	175.52 \pm 18.52	312.23-358.98	335.05 \pm 13.55
AOPP (3)	312-358.98	333.63 \pm 12.81	312.23-258.98	335.48 \pm 13.6	312-358.45	331.9 \pm 11.99	312-352.76	331.06 \pm 11.21	0-3	1.31 \pm 1.28

Табела 12. Одговор донора на озрачивање мерен параметрима оксидативног стреса и антиоксидантног одговора (MDA, SOD, CAT и AOPP)

Доза	0Gy				0.75 Gy				1.5 Gy				3 Gy			
	MDA	SOD	CAT	AOPP	MDA	SOD	CAT	AOPP	MDA	SOD	CAT	AOPP	MDA	SOD	CAT	AOPP
1	H	L	L	L	L	H	L	H	E	H	L	H	H	H	L	L
2	L	L	L	L	L	H	L	L	L	L	H	H	L	H	L	L
3	H	L	H	H	L	L	H	L	L	H	H	H	L	H	H	H
4	L	H	L	L	L	H	L	L	L	H	L	L	H	H	L	L
5	L	H	L	L	L	L	H	H	H	H	L	H	H	L	H	H
6	H	L	L	L	L	L	H	H	H	H	L	L	L	L	H	L
7	H	L	L	L	E	H	H	H	H	H	H	L	H	L	H	L
8	H	L	H	H	H	L	L	H	E	H	L	H	H	H	H	L
9	L	L	L	H	L	L	L	H	H	H	E	L	E	L	H	H
10	L	L	H	L	L	H	H	H	H	L	L	H	L	L	L	H
11	H	L	L	L	L	H	H	H	E	H	H	L	L	L	L	H
12	L	L	H	H	H	L	H	L	H	H	H	L	E	H	H	L
13	H	L	L	H	L	L	H	H	H	L	H	H	H	L	H	L
14	L	L	L	H	H	H	H	H	L	H	L	H	L	H	L	H
15	H	L	H	L	L	L	H	H	H	H	H	L	H	H	H	H
16	H	L	L	L	H	L	H	H	H	L	L	L	H	L	L	L
17	L	L	L	L	H	H	H	E	L	H	H	H	L	L	L	H
18	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	E	H	L	H
19	H	L	L	H	L	H	H	H	L	H	L	H	E	H	L	H

20	H	L	H	H	H	H	L	H	L	L	L	L	L	H	H	L
21	L	H	H	L	H	H	H	H	H	L	L	H	H	L	H	L
22	H	L	L	L	H	L	H	H	L	H	H	H	H	L	L	L
23	H	H	L	H	L	L	L	H	L	H	L	L	L	L	H	H
24	L	L	H	L	E	L	L	L	L	H	L	H	L	L	L	H
25	H	H	H	L	L	H	L	L	L	L	L	H	H	H	E	H
26	L	L	L	H	L	L	H	H	H	L	L	H	H	L	L	L
27	L	H	H	L	L	H	L	L	H	H	H	H	L	L	H	L
28	H	H	L	L	L	L	L	L	H	L	H	H	E	H	H	L
29	H	L	H	L	H	H	H	H	H	H	H	L	H	L	H	H
30	L	H	H	H	E	H	L	L	E	L	L	L	E	L	H	L
31	H	H	L	H	H	H	L	H	E	L	H	H	L	L	L	H
32	L	L	L	L	H	H	H	H	L	L	L	L	E	L	H	H
33	L	H	H	L	H	H	H	L	L	H	H	H	E	H	L	H
34	H	L	H	L	H	L	L	H	E	H	H	H	E	H	L	H
35	L	L	H	H	H	H	H	H	L	H	H	H	H	L	H	H
36	L	L	L	H	H	L	H	L	L	L	L	H	L	H	H	L
37	H	H	H	L	H	H	L	H	H	L	L	L	H	H	L	H
38	H	H	H	L	H	L	L	E	H	H	H	L	E	E	H	L
39	L	L	L	H	H	L	L	L	L	H	H	E	L	L	L	H
40	L	L	L	H	H	H	H	L	H	L	E	H	H	H	L	L
41	H	H	H	H	H	H	L	H	H	L	H	L	E	L	H	H
42	H	H	L	H	H	L	L	H	L	H	L	L	L	L	L	H

43	H	L	L	L	H	L	H	H	H	H	H	H	E	H	H	L
44	L	L	L	H	L	L	H	H	H	L	H	H	L	L	H	L
45	L	L	H	H	L	L	H	L	L	L	H	L	H	L	L	H
46	H	H	H	L	H	H	H	L	H	H	H	L	H	H	H	L
47	L	L	L	H	L	L	L	H	H	H	H	H	H	L	L	H
48	H	H	L	L	H	H	H	L	L	L	L	L	L	H	L	L
49	H	H	H	H	L	H	H	L	L	L	H	H	H	L	L	L
50	L	L	L	L	L	H	L	H	L	L	L	H	E	H	H	L
51	H	H	H	H	L	L	L	L	L	H	L	L	H	H	L	L
52	L	L	L	L	L	H	L	H	L	H	H	H	H	L	L	H
53	H	H	H	L	H	H	E	H	E	H	H	L	L	H	L	L
54	L	H	L	H	H	H	E	H	L	L	H	H	H	H	H	H
55	L	H	H	H	H	L	L	H	L	H	L	H	E	L	L	H
56	L	L	H	H	E	L	H	L	L	H	H	L	E	H	L	L

Табела 13. Просечне, минималне и максималне вредности свих анализираних параметара оксидативног статуса на свим апликованим дозама

Параметар	Цео узорак		Женски пол		Мушки пол		Пушачи		Непушачи	
	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD	Опсег (min-max)	Просек \pm SD
TOS (0)	3.22-10.04	7.01 \pm 2.29	3.22-10.04	6.7 \pm 2.31	3.43-9.85	7.29 \pm 2.28	3.43-10.04	6.8 \pm 2.05	3.22-9.85	7.12 \pm 2.44
TAS(0)	5.91-14.55	9.94 \pm 2.70	5.91-14.46	9.62 \pm 2.69	6.04-14.55	10.25 \pm 2.73	5.97-14.55	9.95 \pm 2.77	5.91-14.14	9.93 \pm 2.71
IOS(0)	0.3-1.51	0.75 \pm 0.31	0.3-1.43	0.73 \pm 0.26	0.3-1.51	0.77 \pm 0.35	0.30-1.15	0.72 \pm 0.25	0.30-1.51	0.77 \pm 0.34
TOS (0.75)	12.41-17.55	14.94 \pm 1.58	12.41-17.55	14.89 \pm 1.60	12.44-17.52	14.98 \pm 1.58	12.41-17.55	14.73 \pm 1.63	12.44-17.47	15.05 \pm 1.56
TAS (0.75)	6.43-12.97	9.83 \pm 1.94	6.94-12.97	9.89 \pm 1.91	6.43-12.81	9.77 \pm 1.99	7.19-12.76	9.71 \pm 1.75	6.43-12.97	9.9 \pm 2.05
IOS (0.75)	1.01-2.2	1.58 \pm 0.34	1.11-2.13	1.55 \pm 0.28	1.01-2.2	1.60 \pm 0.39	1.07-2.15	1.57 \pm 0.34	1.01-2.20	1.58 \pm 0.34
TOS (1.5)	17.08-21.08	19.47 \pm 1.37	17.50-21.08	19.76 \pm 1.27	17.08-20.96	19.20 \pm 1.42	17.2-21.08	19.37 \pm 1.36	17.08-21.08	19.52 \pm 1.39
TAS (1.5)	4.52-11.20	7.96 \pm 2.31	4.52-11.20	7.40 \pm 2.42	4.52-11.19	8.48 \pm 2.11	4.52-11.16	7.91 \pm 2.51	4.52-11.20	7.98 \pm 2.23
IOS (1.5)	1.57-4.49	2.68 \pm 0.86	1.66-4.16	2.93 \pm 0.87	1.57-4.49	2.44 \pm 0.78	1.64-4.49	2.71 \pm 0.93	1.57-4.16	2.66 \pm 0.83
TOS (3)	18.71-22.37	20.73 \pm 1.17	18.71-22.37	20.79 \pm 1.32	18.93-22.31	20.67 \pm 1.37	18.82-22.34	20.69 \pm 1.25	18.71-22.37	20.75 \pm 1.15
TAS (3)	2.18-9.21	5.88 \pm 2.07	2.18-8.85	6.07 \pm 2.01	2.27-9.21	5.69 \pm 2.13	2.23-9.21	5.81 \pm 2.17	2.18-9.07	5.88 \pm 2.04
IOS (3)	2.19-10.08	4.17-2.05	2.24-10.08	4.07 \pm 2.25	2.19-9.51	4.26 \pm 1.89	2.19-9.79	4.24 \pm 2.27	0-3	1.31 \pm 1.28

Табела 15. Одговор донора на озрачивање мерен параметрима оксидативног статуса (TOS, TAS и IOS)

Доза	0Gy			0.75Gy			1.5Gy			3Gy		
Параметар Донор	TOS	TAS	IOS	TOS	TAS	IOS	TOS	TAS	IOS	TOS	TAS	IOS
1	H	L	H	L	H	L	L	H	L	E	L	H
2	H	L	H	H	L	H	H	L	H	H	L	H
3	H	H	E	H	H	L	H	E	L	H	L	H
4	L	H	L	L	L	H	E	H	L	H	H	L
5	L	H	L	H	L	H	H	H	L	H	L	H
6	H	L	H	E	L	H	H	H	H	H	L	H
7	L	L	L	L	H	L	H	L	L	H	H	L
8	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	H	L
9	L	H	L	H	L	E	H	E	H	L	H	H
10	L	H	L	E	L	H	H	H	L	L	H	E
11	H	H	H	L	E	H	L	H	L	H	H	H
12	H	L	L	H	H	H	H	H	L	H	L	L
13	E	L	L	E	H	L	E	L	H	L	L	L
14	L	H	L	L	L	L	H	H	L	L	L	L
15	H	H	H	H	H	L	H	L	H	H	L	L
16	H	H	H	E	L	L	H	H	H	L	E	L
17	L	H	L	L	H	H	L	L	L	H	H	H
18	L	L	H	H	H	H	H	H	L	L	H	H
19	E	H	L	H	H	L	L	L	L	H	H	H

20	H	H	L	E	L	H	H	L	H	H	H	L
21	H	L	H	H	L	H	H	L	L	H	L	L
22	L	H	L	E	H	L	H	H	L	H	E	L
23	L	L	H	E	H	L	L	H	L	H	H	H
24	H	H	H	E	E	L	L	L	L	L	L	L
25	L	L	L	H	E	L	E	H	L	H	E	L
26	L	L	L	H	L	H	H	H	H	L	L	H
27	H	H	H	H	L	E	H	L	H	E	H	L
28	H	H	L	L	H	H	H	L	L	H	H	L
29	L	E	L	L	H	H	L	H	L	H	H	L
30	H	L	H	E	H	H	E	H	L	L	H	H
31	H	H	E	H	H	L	L	L	H	L	H	L
32	L	L	L	E	H	H	H	E	H	L	H	L
33	L	H	L	L	L	H	H	H	H	H	H	L
34	L	H	L	L	H	H	H	H	L	H	E	L
35	H	H	L	E	L	L	H	L	L	L	E	L
36	H	H	H	L	L	L	L	L	L	H	H	H
37	H	H	H	H	L	L	H	L	H	H	H	H
38	L	L	L	L	E	H	H	L	L	H	H	H
39	L	L	E	H	E	E	L	L	H	H	L	H
40	L	L	H	H	H	H	L	E	L	H	L	L
41	L	L	L	H	H	L	H	L	H	E	H	L
42	L	H	L	H	H	L	H	L	L	L	L	L

43	H	H	H	H	E	H	L	L	H	H	E	L
44	L	H	H	E	L	H	L	H	H	L	L	L
45	H	L	E	E	L	L	H	H	E	L	L	L
46	L	L	L	H	H	H	L	L	L	L	L	L
47	L	H	L	L	H	L	E	L	L	E	H	L
48	H	L	H	H	L	H	L	H	H	H	E	L
49	H	H	E	E	H	H	E	H	E	E	H	L
50	H	L	L	E	H	H	L	E	H	H	L	L
51	H	L	H	L	L	L	H	H	H	E	H	L
52	L	L	H	L	L	H	L	H	H	L	L	H
53	H	H	L	E	L	L	H	L	L	H	L	H
54	H	H	H	H	E	L	H	L	H	L	E	L
55	H	H	L	H	L	E	L	H	H	L	H	L
56	L	H	H	E	L	H	H	H	H	E	H	L

Табела 20. Вредности *H-response ratio* („HRR“) параметара свих донора

Донор	Демографске карактеристике и животне навике донора (пол, навика конзумирања цигарета, хроничне болести, животне навике) ^а	HRR _{D+R}	HRR _{MNI}	HRR _{MDA}	HRR _{SOD}	HRR _{CAT}	HRR _{TOS}	HRR _{TAS}	HRR _{AOPP}	HRR _{IOS}	HRR _{OVERALL}
15	Ж / 0 / 0 / 2	0.75	1	0.75	0.5	1	1	0.5	0.5	0.5	0.72
37	Ж / 0 / 0 / 2	0.5	0.75	1	0.75	0.25	1	0.5	0.5	1	0.69
35	Ж / 1 / 0 / 1	0.25	0.75	0.5	0.5	1	0.5	0.25	1	1	0.64
22	М / 1 / 0 / 1	0.75	0.75	0.75	0.25	0.5	0.5	0.75	0.5	0.5	0.58
14	Ж / 0 / 2 / 2	0.75	0.75	0.25	0.75	0.25	0.25	0.5	1	0.75	0.58
41	Ж / 0 / 0 / 2	0.5	0.5	0.75	0.5	0.75	0.5	0.5	0.75	0.25	0.56
19	Ж / 1 / 0 / 1	0.5	0.75	0.25	0.75	0.25	0.5	0.75	1	0.25	0.56
31	М / 0 / 0 / 1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.75	1	0.5	0.56
29	М / 0 / 0 / 2	0	0	1	0.5	1	0.25	0.75	0.5	0.75	0.53
17	Ж / 0 / 0 / 1	0.75	1	0.25	0.5	0.5	0.25	0.75	0.5	0.25	0.53
33	Ж / 0 / 0 / 2	0.5	0.5	0.25	1	0.75	0.5	0.75	0.5	0	0.53
23	М / 1 / 0 / 1	0.5	1	0.25	0.5	0.25	0.25	0.75	0.75	0.5	0.53

46	М/1/0/1	0.25	0.5	1	1	1	0.25	0.25	0	0.5	0.53
42	Ж/0/0/2	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.75	0.75	0.50
49	М/1/0/1	0.25	0.75	0.5	0.5	0.75	0.25	1	0.5	0	0.50
21	М/1/0/1	0.25	0.5	0.75	0.5	0.75	1	0	0.5	0.25	0.50
43	Ж/0/0/2	0.25	0.5	0.75	0.5	0.75	0.75	0.25	0.5	0.25	0.50
7	Ж/0/0/1	0.25	0.5	0.75	0.5	0.75	0.5	0.5	0.25	0.5	0.50
54	М/0/0/2	0	0.25	0.5	0.75	0.5	0.75	0.25	1	0.5	0.50
34	Ж/0/0/2	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.75	0.75	0	0.47
38	Ж/1/0/1	0.5	0.5	0.75	0.5	0.75	0.5	0.25	0	0.5	0.47
40	Ж/0/0/2	0.25	0.5	0.75	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.47
3	М/1/3/1	0	0	0.25	0.5	1	1	0.5	0.75	0.25	0.47
12	Ж/0/0/2	0	0	0.5	0.5	1	1	0.5	0.25	0.5	0.47
5	М/1/0/1	0	0	0.5	0.5	0.5	0.75	0.5	0.75	0.75	0.47
53	М/0/0/2	0	0.5	0.25	1	0.5	0.75	0.5	0.25	0.25	0.44
30	М/0/2/2	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.25	0.75	0.25	0.75	0.44

2	М/0/0/1	0.5	0.75	0	0.5	0.25	1	0	0.25	0.75	0.44
11	Ж/1/0/2	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.75	0.5	0.25	0.42
8	Ж/1/0/1	0.25	0.25	0.75	0.5	0.5	0	0.25	0.75	0.5	0.42
44	М/0/0/1	0.25	0.25	0.5	0	0.75	0	0.5	0.75	0.75	0.42
28	М/1/0/2	0	0.25	0.5	0.5	0.5	0.75	0.75	0.25	0.25	0.42
47	М/1/0/1	0	0.5	0.5	0.25	0.25	0	0.75	1	0.5	0.42
20	Ж/0/0/2	0	0	0.5	0.5	0.5	0.75	0.5	0.5	0.5	0.42
1	М/0/0/2	0.5	0.75	0.5	0.75	0	0.25	0.5	0.5	0	0.42
51	М/0/0/2	0.5	0.25	0.75	0.75	0.25	0.5	0.5	0.25	0	0.42
32	Ж/0/0/2	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.42
26	М/1/0/1	0.25	0.5	0.5	0	0.25	0.5	0.25	0.75	0.5	0.39
55	М/0/0/2	0	0.5	0	0.5	0.75	0.5	0.75	0.25	0.25	0.39
27	М/0/0/1	0	0	0.25	0.75	0.75	0.75	0.5	0.25	0.25	0.39
36	Ж/0/0/2	0	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.75	0.39
52	М/1/0/1	0	0.5	0.25	0.5	0.25	0	0.25	0.75	1	0.39

25	M/0/0/2	0	0.25	0.5	0.75	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.36
39	Ж/0/0/2	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25	0.5	0	0.5	0.75	0.36
16	Ж/1/0/1	0.25	0.5	1	0	0.25	0.5	0.5	0.25	0	0.36
6	Ж/1/0/2	0.25	0	0.5	0.25	0.5	0.75	0.25	0.25	0.25	0.33
50	M/0/0/1	0.25	0.25	0	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	0.33
48	M/0/0/1	0	0.5	0.5	0.75	0.25	0.75	0.25	0	0	0.33
13	Ж/1/0/2	0	0	0.75	0	0.75	0	0.25	0.75	0.5	0.33
45	M/0/0/2	0.25	0	0.25	0	0.75	0.5	0.25	0.25	0.5	0.31
10	Ж/0/0/2	0	0	0.25	0.25	0.5	0.25	0.75	0.75	0	0.31
18	M/0/0/2	0.25	0.75	0	0.25	0	0.5	0.75	0.25	0	0.31
9	Ж/0/0/2	0	0	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.75	0.25	0.31
56	M/1/0/1	0	0	0	0.5	0.75	0.25	0.75	0.25	0.25	0.31
4	M/0/0/2	0	0	0.25	1	0	0.25	0.75	0	0.25	0.28
24	Ж/0/0/2	0	0	0	0.25	0.25	0.25	0.75	0.25	0.75	0.28

^a Пол М-мушки, Ж-женски; навика конзумирања цигарета: 0-непушач; 1 пушач; хроничне болести: 0-без хроничних болести; 1-хроничне болести које могу имати утицаја на цитогенетички статус испитаника; 2-хроничне болести које могу имати утицаја на оксидативни статус испитаника; 3-хроничне болести које могу имати утицаја и на цитогенетички и на оксидативни статус испитаника; животне навике: 0-нездраве, 1-умерено здраве; 2-здраве

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

АС - апопототичне ћелије

АОРР - завршни оксидативни продукти протеина

САТ – каталаза

СВМН тест - цитокинезис-блок микронуклеус тест

СДДР - калкулисана доза на основу приноса дицентрика и рингова

СДМН - калкулисана доза на основу приноса микронуклеуса

СV - коефицијент варијације

D+R - број дицентричних и прстенастих хромозома

HRR - H-response ratio

HUMN пројекат - Human MicroNucleus пројекат

IOS - индекс оксидативног стреса

JЗ – јонизујуће зрачење

LET - линеарни енергетски трансфер

MDA - малондиалдеhid

MN₁ - број бинуклеарних лимфоцита са 1 микронуклеусом

MN₂ - број бинуклеарних лимфоцита са 2 микронуклеуса

MN₃ - број бинуклеарних лимфоцита са 3 микронуклеуса

MN₄ - број бинуклеарних лимфоцита са 4 микронуклеуса

MN₅ - број бинуклеарних лимфоцита са 5 микронуклеуса

MN₆ - број бинуклеарних лимфоцита са 6 микронуклеуса

MN_t - укупан број микронуклеуса

NB – нуклеусни пупови

NC - некротичне ћелије

NDI - индекс деобе једра

NPB - нуклеоплазматични мостови

RBE - релативна биолошка ефикасност

RNS - реактивни азотни радикали

ROS - реактивни кисеонични радикали

SOD - супероксид-дисмутаза

TAS - тотални антиоксидантни статус

TOS - тотални оксидативни статус

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Јелена Пајић је рођена у Шапцу 1977. године, где је завршила основну школу, гимназију и средњу музичку школу.

Биолошки факултет Универзитета у Београду, завршила је 2003. године, са просечном оценом 9,32. Дипломирала је на катедри за Генетику и еволуцију Биолошког факултета са оценом 10.

Од 2008. године запослена је у Лабораторији за биодозиметрију и цитогенетику у Центру за радиолошку заштиту Института за медицину рада Србије “Др Драгомир Карајовић“, где ради на пословима:

- праћења утицаја радиоактивности на здравље људи (процена изложености популације и утицај радиоактивности животне средине) у циљу процене излагања становништва штетном дејству јонизујућих зрачења;
- процене примљене дозе зрачења, као и праћења здравственог стања запослених у зони јонизујућих зрачења
- утврђивања штетног деловања хемијских мутагених агенаса на хумани геном, праћењем здравственог стања запослених у хемијској индустрији, здравству (рад са цитостатицима, анестетицима), пољопривреди.

Специјалистичке студије на Биолошком факултету, из области генетике, завршила 2013. године.

Фебруара 2014. именована је за начелника Центра за радиолошку заштиту.

Одлуком Научног већа Биолошког факултета јануара 2015. године изабрана је у звање истраживач-сарадник.

Децембра 2015. године, на Медицинском факултету Универзитета у Београду, пријављује тему за израду докторске дисертације „Маркери генотоксичности у хуманим лимфоцитима периферне крви као показатељи интер-индивидуалне варијабилности у одговору на деловање јонизујућег зрачења, под менторством проф. др Александра Миловановића и проф. др Иване Новаковић, одобрена од стране Наставно – научног већа марта 2017. године.

Аутор је 12 научних радова из области биолошких, биомедицинских наука, радиолошке заштите и заштите животне средине, публикованих у часописима реферисаним у базама Scopus и Web of science и 22 рада презентована на домаћим

и међународним конгресима. Рецензент је за врхунске међународне часописе у области радијационе биологије.

Члан је Biodosenet групе Светске здравствене организације, Радне групе за ретроспективну дозиметрију у European Radiation Dosimetry Group (EURADOS), Друштва генетичара Србије и Друштва за заштиту од јонизујућих зрачења Србије и Црне Горе.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Јелена Пајић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

МАРКЕРИ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ У ХУМАНИМ ЛИМФОЦИТИМА ПЕРИФЕРНЕ
КРВИ КАО ПОКАЗАТЕЉИ ИНТЕР-ИНДИВИДУАЛНЕ ВАРИЈАБИЛНОСТИ У
ОДГОВОРУ НА ДЕЛОВАЊЕ ЈОНИЗУЈУЋЕГ ЗРАЧЕЊА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 10.04.2017.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Пајић

Број уписа _____

Студијски програм Молекуларна медицина

Наслов рада МАРКЕРИ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ У ХУМАНИМ ЛИМФОЦИТИМА
ПЕРИФЕРНЕ КРВИ КАО ПОКАЗАТЕЉИ ИНТЕР-ИНДИВИДУАЛНЕ
ВАРИЈАБИЛНОСТИ У ОДГОВОРУ НА ДЕЛОВАЊЕ ЈОНИЗУЈУЋЕГ ЗРАЧЕЊА

Ментор проф. др Александар ПС Миловановић

Коментор: проф. др Ивана Новаковић

Потписани Јелена Пајић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 10.04.2017.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

МАРКЕРИ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ У ХУМАНИМ ЛИМФОЦИТИМА ПЕРИФЕРНЕ
КРВИ КАО ПОКАЗАТЕЉИ ИНТЕР-ИНДИВИДУАЛНЕ ВАРИЈАБИЛНОСТИ У
ОДГОВОРУ НА ДЕЛОВАЊЕ ЈОНИЗУЈУЋЕГ ЗРАЧЕЊА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

Потпис докторанда

У Београду, 10.04.2017.