

NAUČNI RAD – Original Paper

**UČESTALOST HROMOSOMSKIH ABERACIJA I MIKRONUKLEUSA
U LIMFOCITIMA KONJA NAKON *IN VITRO* OZRAČENJA NISKIM
DOZAMA JONIZIRAJUĆEG ZRAČENJA**

**FREQUENCY OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS AND
MICRONUCLEI IN HORSE LYMPHOCYTES FOLLOWING *IN VITRO*
EXPOSURE TO LOW DOSE IONISING RADIATION**

**Rukavina Dunja, Hasanbašić Danica, Sofradžija A., Haverić Anja, Haverić
S., Ajanović Atifa, Gilić Zehra**

Abstract – Ionising radiation is known to cause chromosomal instability, which is observed as increased frequency of chromosomal aberration and micronuclei. These are listed as reliable criteria in biological dosimetry. Numerous experiments conducted on

Dr. sc. Dunja Rukavina, dipl. biolog, docent, Katedra za biologiju, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Sarajevu, (dunja.rukavina@vfs.unsa.ba); dr. sc. Danica Hasanbašić, prof. biologije, redovni profesor Katedra za biologiju, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Sarajevu; dr. sc. Avdo Sofradžija, dipl. biolog, redovni profesor u mirovini, Odsjek za biologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu; mr. sc. Anja Haverić, dipl. biolog, viši stručni saradnik, Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Univerzitet u Sarajevu; dr. sc. Sanin Haverić, dipl. biolog, naučni saradnik, Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Univerzitet u Sarajevu; dr. sc. Atifa Ajanović, dipl. ing. hemije, docent, Katedra za hemiju, veterinarsku biohemiju i fiziologiju, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Sarajevu; mr. sc. Zehra Gilić, DVM, viši stručni saradnik za vođenje registra, Agencija za sigurnost hrane, Mostar, Bosna i Hercegovina

Rad prezentiran na I Simpoziju genetičara u Bosni i Hercegovini, Sarajevo 17-18. februar 2011.

Dunja Rukavina, Biologist, PhD, Assistant Professor, Department for Biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Sarajevo, B&H, dunja.rukavina@vfs.unsa.ba; Danica Hasanbašić, Biologist, PhD, Professor, Department for Biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Sarajevo; Avdo Sofradžija, Biologist, PhD, Retired Professor, Department for Biology, Faculty of Science, University of Sarajevo; Anja Haverić, Biologist, MSc, Senior Research Associate, Institute for Genetics Engineering and Biotechnology, University of Sarajevo; Sanin Haverić, Biologist, PhD, Research Scientist, Institute for Genetics Engineering and Biotechnology, University of Sarajevo; Atifa Ajanović, Chemist, PhD, Assistant Professor, Department of Chemistry, Veterinary Biochemistry and Fiziology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Sarajevo; Zehra Gilić, DVM, MSc, Senior Expert Associate for Registrar, A Food Safety Agency of Bosnia and Hercegovina, Mostar, B&H

This report was presented at the I Symposium of Geneticists in B&H, Sarajevo, February, 17-18. 2011.

both animal and plant models demonstrated that increase in radiation dosage is followed by increased mutation frequency, and that mutations occur even at the lowest exposure.

We used horse blood *in vitro* irradiated by low doses of ionizing radiation. Cultivation of peripheral blood lymphocytes and micronucleus test were used as biomarkers of genetic damage. The observed aberrations were recorded and classified in accordance with the International System of Cytogenetic Nomenclature. Micronuclei were identified on the basis of criteria proposed by Fenech *et al.* (8).

Analysis of chromosomal aberration showed increased frequency of aberrations in blood cultures exposed to 0,1 Gy and 0,2 Gy compared to the controls. Microscopic analysis of chromosomal damage in *in vitro* micronucleus test revealed that the applied radiation dose induced micronuclei while no binucleated cells with micronuclei were found in lymphocytes that were not irradiated.

In this paper we analysed the influence of low dose ionising radiation on frequency of chromosomal aberration and micronuclei in horse lymphocytes following *in vitro* exposure to X-rays (0,1 Gy and 0,2 Gy).

Key words: chromosomal aberrations, micronuclei, ionising radiation, horse lymphocytes

Kratak sadržaj – Poznato je da jonizirajuće zračenje uzrokuje hromosomsku nestabilnost koja se manifestira kao povećana frekvencija hromosomskih aberacija i mikronukleusa, koje se javljaju kao pouzdan kriterij u biološkoj dozimetriji. Mnogi eksperimenti rađeni na životinjama i biljkama su pokazali da se porastom doze zračenja povećava i broj mutacija, te da su i najmanje doze zračenja u stanju izazvati mutacije. U radu je korištena krv konja *in vitro*, ozračena niskim dozama jonizirajućeg zračenja. Kao biomarker genetičkih oštećenja korištene su metode kultivacije limfocita periferne krvi i mikronukleus test. Uočene aberacije su registrovane i klasificirane u skladu sa Međunarodnim sistemom citogenetičke nomenklature (ISCN), a identifikacija mikronukleusa je vršena na osnovu karakteristika koje su dali Fenech i sar. (8).

Rezultati analize hromosomskih aberacija su pokazali da je procent hromosomskih aberacija veći u kulturama krvi zračenih dozama od 0,1 Gy i 0,2 Gy u odnosu na kontrolne uzorke. Mikroskopskom analizom oštećenja hromosomskog materijala u *in vitro* mikronukleus testu, uočeno je da ispitivane doze zračenja induciraju pojavu mikronukleusa, dok u neozračenim limfocitima periferne krvi nije evidentirano prisustvo binuklearnih ćelija sa mikronukleusima.

Za cilj rada postavljena je analiza utjecaja niskih doza jonizirajućeg zračenja na pojavu hromosomskih aberacija i učestalost pojave mikronukleusa (MN) u limfocitima periferne krvi konja nakon *in vitro* ozračenja X zrakama od 0,1 Gy i 0,2 Gy.

Ključne riječi: hromosomske aberacije, mikronukleusi, jonizirajuće zračenje, limfociti konja

Uvod

Efekti jonizirajućeg zračenja na genetički materijal su odavno poznati. Jonizirajuće zračenje je jedan od najopasnijih fizičkih mutagena. Uzrokuje hromosomsku nestabilnost, koja se manifestira kao povećana frekvencija hromosomskih aberacija, a javlja se nakon izlaganja kako niskim tako i visokim dozama zračenja (14). Djelovanjem jonizirajućeg zračenja, sve vrste molekula unutar ćelije mogu biti oštećene, a za ćeliju su najvažnija oštećenja molekule DNK. Dvostruki lomovi lanaca DNK pojavljuju se kao primarne lezije u formiranju hromosomskih aberacija koje su lako vidljive na metafaznim hromosomima (22). S citogenetičkog stanovišta, posebno su interesantni hromosomski mutageni efekti pošto se mogu citološki posmatrati. Brojni eksperimenti su pokazali da je broj mutacija dobiven zračenjem proporcionalan upotrebljenoj dozi, te da i najmanje doze zračenja mogu izazvati mutacije (5).

Hromosomske aberacije su prihvaćene kao pouzdani parametri u procjeni oštećenja induciranih jonizirajućim zračenjem. Biološka dozimetrija se najvećim dijelom bazira na citogenetičkoj analizi acentričnih fragmenata, dicentričnih hromosoma i prstenastih hromosoma, te mnogo rjeđe na procjeni hromosomskih translokacija (22). Međutim, biomonitoring većih grupa ispitivanih jedinki je dosta težak i zahtjevan, posebno kada se primjenjuje test u kulturi limfocita. Iz tog razloga, u studijama s većim brojem uzoraka, kao validna i manje komplicirana alternativa u analizi hromosomskih oštećenja, predložena je analiza mikro nukleusa (MN) u limfocitima periferne krvi, primjenom mikronukleus (MN) testa (17). MN su pouzdani biomarkeri kod izlaganja klastogenim i aneugenim hazardima (7). Dokazano je da su MN pouzdani biomarkeri u biološkoj dozimetriji u humano postakutnim radijacionim izlaganjima (17). Osim toga, MN test je korišten i za procjenu citogenetičkih oštećenja u populacijama koje su živjele na područjima s visokim nivoom radioaktivnosti (2, 3, 24), te grupama profesionalno izloženim jonizirajućem zračenju (19). MN testom hromosomske aberacije se detektuju indirektno preko hromatinskih gubitaka nukleusa koji dovode do stvaranja MN u citoplazmi ćelije. MN se definiraju kao mala, okrugla citoplazmatska tijela, koja sadrže DNK i formiraju se za vrijeme ćelijske diobe, od ostataka acentričnih hromosomskih fragmenata ili cijelih hromosoma zaostalih u anafazi ćelijskog ciklusa. *In vitro* MN test je brz i pouzdan test u detekciji mutagenih činilaca (14). Dobar je indikator genotoksičnosti, relevantan je u procjeni rizika od nastanka tumora. MN test identificira hromosomske i genomske mutacije te je aplikativan na mnogo ćelijskih tipova (8).

Za cilj rada postavljena je analiza utjecaja niskih doza jonizirajućeg zračenja na pojavu hromosomskih aberacija i učestalost pojave mikronukleusa (MN) u limfocitima periferne krvi konja, nakon *in vitro* ozračenja X zrakama od 0,1 Gy i 0,2 Gy.

Materijal i metode

U radu je korištena krv 12 konja, različitih pasmina, starosne dobi od 18 mjeseci do 20 godina, oba spola, težine od 200 do 650 kilograma.

Krv konja je vađena venepunkcijom iz *vene jugularis* u sterilne heparinizirane epruvete. Zračenje je vršeno na terapijskom aparatu linearni akcelerator Primus, firme Siemens. Uzorci su ozračeni pojedinačnim dozama od 0,1 Gy i 0,2 Gy.

Kultivacija limfocita periferne krvi konja rađena je prema metodi koju je opisao Moorhead i sar. (18), nešto modificiranoj i prilagođenoj našim laboratorijskim uvjetima, a koja je preporučena od strane IAEA (25).

U sterilne flakone stavlja se 7 ml hranjive podloge (RPMI 1640 ili MEM), 2 ml fetalnog telećeg seruma, 0,2 ml fitohemaglutinina (PHA) i 0,5 ml krvi. Za svaku životinju i svaku dozu, kultivacija je rađena u dva paralelna uzorka. Kultivacija limfocita je obavljena na 38 °C (što odgovara tjelesnoj temperaturi konja), tokom 48 sati. Nakon 45 sati kultivacije, svim uzorcima je dodano 0,2 ml 0,05%-tnog kolhicina. U toku sljedeća tri sata, sve ćelije koje uđu u diobum su zaustavljene u metafazi. Tri sata nakon dodavanja kolhicina, odnosno 48 sati nakon kultivacije limfocita, sve kulture su prebačene iz flakona u kivete za centrifugiranje i centrifugirane 10 minuta na 1.000 obrtaja. Zatim je odvojen supernatant od taloga i na talog je dodan svjež hipotonični rastvor 0,075 M KCl. Hipotonični tretman je trajao 20 minuta, na temperaturi od 38 °C. U hipotoničnom rastvoru se povećava volumen ćelija i hromosomi se bolje rasporede. Zagrijavanje hipotoničnog rastvora na 38 °C povećava efikasnost, ubrzavajući transport vode kroz ćelijsku membranu, smekšavajući citoplazmatsku membranu, što joj povećava sposobnost rastezanja. Nakon hipotoničnog tretmana, suspenzija je ponovo centrifugirana, a bjeličastom talogu je dodan ranije pripremljen fiksativ, koji je mješavina etilnog alkohola i ledene sirćetne kiseline u omjeru 3:1, napravljen sat ranije i ohlađen na 4 °C. Tokom fiksacije, uklanja se višak vode iz ćelija i one se fiksiraju. Hladan fiksativ poboljšava vidljivost kontura hromosoma. Višekratnim uzastopnim ispiranjem u fiksativu uz centrifugiranje (10 minuta na 1.000 obrtaja) dobijen je bijeli talog (suspenzija ćelija). Bijelom talogu je dodano 0,5 ml fiksativa, koji je promiješan i pipetom nakapavan s određene visine, na koso postavljena predmetna stakla, prethodno ohlađena na -20 °C. Nakon sušenja pri sobnoj temperaturi, preparati su bojeni 5 %-tnim rastvorom Gimze u trajaju od 10 minuta. Potom su preparati ispirani, prvo tekućom, a zatim destilovanom vodom, osušeni i numerisani.

Za analizu mikronukleusa primijenjena je metoda MN testa koju su predložili Fenech i Morley (6). Kultivacija limfocita rađena je identično kao u opisanom postupku, s tom razlikom što je u kulture za analizu MN u 44. satu inkubacije dodano po 6 µg/ml citohalazina B, blokatora citokineze u drugoj diobi, prethodno rastvorenog u dimetil sulfoksidu (DMSO) u koncentraciji od 0,5 mg/ml i razblaženog u destilovanoj vodi. Na taj način, ćelije postaju binuklearne unutar „roditeljske“ ćelijske membrane. Nakon isteka vremena inkubacije (72 sata), na 38 °C, kulture su prebačene u epruvete i centrifugirane 10 minuta na 1.000 obrtaja. Supernatant je otpipetiran i na talog je dodano po 5 ml

hipotoničnog rastvora (0,075 MKCl), te je sadržaj odmah centrifugiran. Fiksiranje ćelija, pravljenje i bojenje preparata rađeni su na ranije opisani način.

Mikroskopska citogenetička analiza preparata obavljena je na Olympus BX 41 svjetlosnom istraživačkom mikroskopu, koji sadržava digitalnu kameru, kojom su, pod imerzionim uvećanjem (x1000) snimljene sve uočene promjene. Uočene aberacije su klasificirane prema Međunarodnom sistemu citogenetičke nomenklature (ISCN) (12), a identifikacija mikronukleusa je vršena na osnovu karakteristika koje su definirali Fenech i sar. (8).

Rezultati

Na temelju provedenih istraživanja efekata niskih doza zračenja na ćelije limfocita periferne krvi ispitivanih konja, dobiveni su različiti podaci o strukturnim hromosomskim aberacijama. Radi preglednosti, efekti zračenja su prikazani prema korištenim dozama, a podaci o efektima zračenja dati su u tabeli 1.

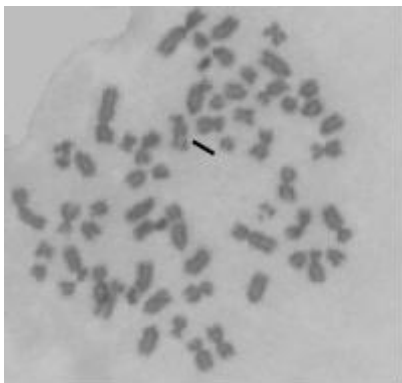
Tabela 1. Zbirne vrijednosti hromosomskih aberacija nakon *in vitro* ozračenja limfocita konja
Table 1. Summarized data on chromosomal aberrations in horse lymphocytes following *in vitro* irradiation

Doza (Gy)	Broj metafaznih figura	Hromatidne aberacije		Hromosomske aberacije			(%)
		Gap*	Lom	Ac. fragmenti**	Dicentrici	Ring***	
Kontrola	2.400	8	6	4	1	0	0,79
0,1	2.400	11	8	6	6	0	1,29
0,2	2.400	15	8	16	12	1	2,17

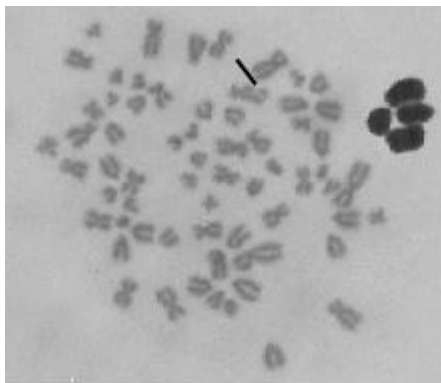
*Pukotina, **Acentrični fragment, ***Prstenasti hromosom

Procent spontano nastalih hromosomskih aberacija u ovim istraživanjima iznosio je 0,79. S porastom doze zračenja, rastao je i procenat hromosomskih aberacija. Tako je pri dozi od 0,1 Gy procenat uočenih aberacija iznosio 1,29, a pri dozi od 0,2 Gy 2,17%.

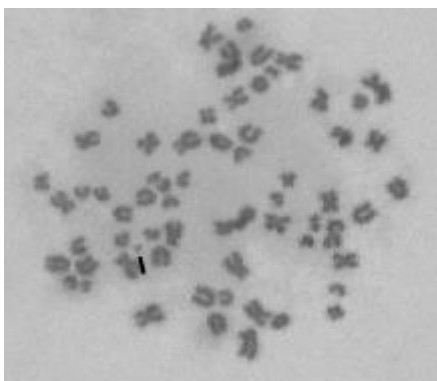
Nakon *in vitro* ozračenja krvi konja, dozama od 0,1 i 0,2 Gy, evidentan je porast aberacija hromosomskog tipa (dicentrični hromosomi i acentrični fragmenti), što je i razumljivo, kada se zna da su limfociti ćelije koje se nalaze u G-0 fazi ćelijskog ciklusa. Aberacije hromatidnog tipa (*gap* ili lom) nisu se značajno mijenjale u odnosu na neozračene limfocite (sl. 1 i 2). Broj acentričnih fragmenata (sl. 3) uvijek je bio nešto viši od broja dicentričnih hromosoma (sl. 4). Pojava prstenastih hromosoma (sl. 5) zabilježena je već pri dozi od 0,2 Gy.



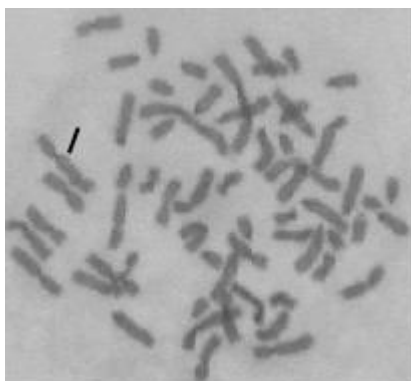
Slika 1. *Gap*
Figure 1. *Gap*



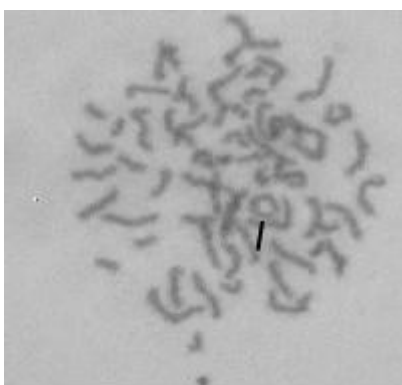
Slika 2. *Lom*
Figure 2. *Break*



Slika 3. *Acentrični fragment*
Figure 3. *Acentric fragment*



Slika 4. *Dicentrični hromosom*
Figure 4. *Dicentric chromosome*



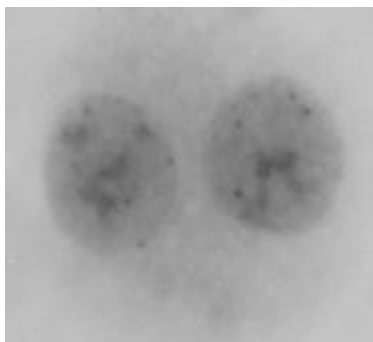
Slika 5. *Prstenasti hromosom*
Figure 5. *Ring chromosome*

Mikroskopskom analizom oštećenja hromosomskog materijala u *in vitro* MN testu, uočeno je da ispitivane doze zračenja induciraju pojavu MN i da je kod viših apsorbovanih doza i broj MN veći. Analizom neozračenih limfocita periferne krvi konja nije evidentirano prisustvo binuklearnih ćelija sa MN (sl. 6). S dozama zračenja od 0,1 i 0,2 Gy rastao je i broj binuklearnih ćelija, koje sadržavaju više MN. Najčešće su binuklearne ćelije sa jednim MN (sl. 7), a evidentirane su i ćelije sa dva MN (sl. 8). Kod doze od 0,2 Gy rastao je i broj polinuklearnih ćelija u kojima su, također, evidentirani MN (sl. 9), ali njihovo prisustvo, kao ni prisustvo mononuklearnih ćelija sa MN (sl. 10), nije posebno istraživano. Zbirne vrijednosti prinosa MN date su u tabeli 2.

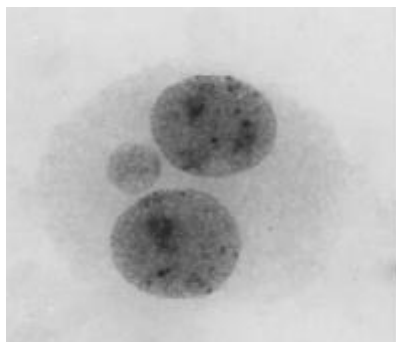
Tabela 2. Učestalost pojave binuklearnih (BN) limfocita konja sa mikronukleusima (MN) u 72-satnim kulturama nakon *in vitro* ozračenja (zbirni prikaz)

Table 2. Frequency of binuclear (BN) horse lymphocytes with micronuclei (MN) in 72-hour culture after *in vitro* irradiation (cumulative overview)

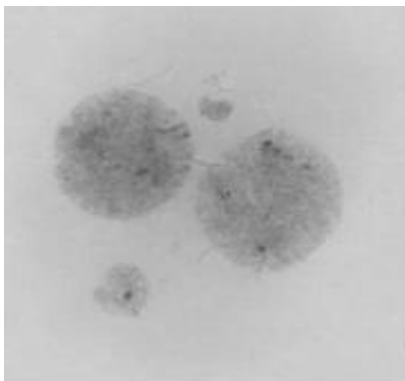
Doza (Gy)	Broj BN ćelija	BN ćelije s		Ukupno BN ćelija s MN	Mikronukleus po ćeliji (%)
		1 MN	2MN		
Kontrola	22	0	0	0	0
0,1	4.482	54	1	55	1,23
0,2	4.178	76	1	77	1,84



Slika 6. Binuklearna ćelija
Figure 6. Binuclear cell



Slika 7. Binuklearna ćelija sa mikronukleusom
Figure 7. Binuclear cell with micronuclei



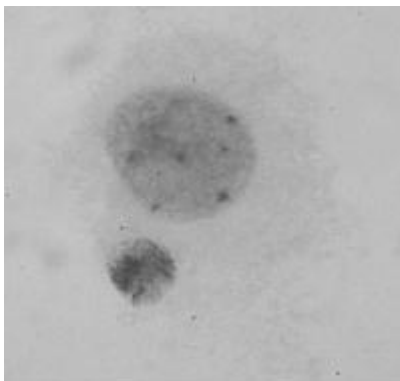
Slika 8. Binuklearna ćelija sa dva mikro-nukleusa

Figure 8. Binuclear cell with two micronuclei



Slika 9. Polinuklearna ćelija sa mikro-nukleusima

Figure 9. Polinuclear cell with micronuclei



Slika 10. Mononuklearna ćelija sa mikronukleusom

Figure 10. Mononuclear cell with micronuclei

Diskusija

Naša ispitivanja neozračenih uzoraka obavljena na 2.400 metafaznih figura, dobivenih iz limfocita periferne krvi konja, potvrdila su mišljenje velikog broja autora o postojanju izvjesnog procenta spontano nastalih hromosomskih aberacija (4, 15, 16, 20).

U kulturama limfocita *in vitro* ozračene periferne krvi konja, potvrdili smo da jonizirajuće zračenje povećava broj aberantnih metafaza, tj. broj hromosomskih oštećenja po metafazi, te da hromosomske aberacije pokazuju jasnu ovisnost o primljenoj dozi. Aberacije hromatidnog tipa (*gap* i lom) se u ozračenim limfocitima konja nisu značajnije mijenjale u odnosu na neozračene limfocite. Do istih rezultata su u svojim istraživanjima došli i drugi autori (1, 9, 23). Veći broj acentričnih fragmenata u odnosu na dicentrične hromosome uočen u ovim istraživanjima u skladu je s rezultatima rađenim na svinjama, kozama, govedima (9, 10, 23) te ljudima (13).

U dostupnoj literaturi nismo našli pojavu prstenastih hromosoma, već pri dozi od 0,2 Gy. Naše rezultate možemo tumačiti činjenicom da je pomenuta hromosomska aberacija nađena kod konja starog 20 godina, a poznato je da starost može utjecati na nivo hromosomskih aberacija, budući da je metaboličko stanje životinje, a samim tim i stanje enzimatskih reparacionih procesa diktirano starošću.

In vitro mikronukleus testom potvrdili smo naša očekivanja da frekvencija pojave MN pokazuje jasnu zavisnost od doze zračenja. U neozračenim limfocitima periferne krvi konja nismo evidentirali prisustvo binuklearnih ćelija sa MN. Mikroskopskom analizom je zapažen porast broja MN na ispitivanim dozama. Sa povećanjem doze povećavao se i broj binuklearnih ćelija sa mikronukleusom, što je u skladu sa podacima Slijepčevića (23) dobivenim na svinjama. Uočeno je i prisustvo većeg broja mononuklearnih ćelija sa MN, te polinuklearnih ćelija sa ili bez prisustva MN. Mnogobrojni eksperimenti ukazuju da MN uglavnom potječu od acentričnih fragmenata, iako je generalno prihvaćeno da se u formiranju MN uključuju i aberacije nastale genozom asimetričnih izmjenjivačkih aberacija, hromosomskog ili hromatidnog tipa (11, 21). Kada uporedimo naše rezultate sa rezultatima rađenim na svinjama (23) možemo zaključiti da je procent binuklearnih ćelija s MN nešto viši u našim istraživanjima, ali se mora uzeti u obzir manji broj pregledanih binuklearnih ćelija, te dozna heterogenost naše skupine ispitivanih konja (od 18 mjeseci do 20 godina).

Dobiveni rezultati jasno govore da su analiza limfocita periferne krvi i MN test veoma pogodne metode u proučavanju oštećenja genetičkog materijala u dozimetrijskoj kontroli stepena ozračenja domaćih životinja. U situacijama kada nakon ozračenja nedostaju izraženi klinički simptomi ili su hematološki parametri uglavnom u normalnim granicama, jedino metodom analize hromosomskih oštećenja u kultiviranim limfocitima periferne krvi može se sa sigurnošću utvrditi da li je jedinka ozračena.

Sve izraženija upotreba nuklearne energije, brzi tehnološki razvoj, te ponekad nekontrolirana upotreba X zraka u medicinskoj dijagnostici i terapiji, dovode do stvarne opasnosti da ljudi i životinje budu izloženi jonizirajućem zračenju, te globalnog trenda zagađenja životne sredine. Ove činjenice potenciraju značaj izučavanja oštećenja hromosomskog materijala te neophodnost praćenja genotoksičnih oštećenja kod ljudi i životinja.

Zaključci

S obzirom na dobivene rezultate provedenih istraživanja oštećenja hromosomskog materijala konja nakon *in vitro* ozračenja X zrakama, dozama od 0,1 i 0,2 Gy, primjenom testa u kulturi limfocita periferne krvi i MN testa, mogu se izvesti sljedeći opći zaključci.

- U neozračenim limfocitima periferne krvi konja prisutan je izvjestan procent spontano nastalih hromosomskih aberacija.

- Niske doze jonizirajućeg zračenja uzrokuju pojavu hromosomskih aberacija i mikronukleusa u limfocitima periferne krvi konja.
- U *in vitro* ozračenim limfocitima konja niskim dozama jonizirajućeg zračenja javljaju se različiti tipovi strukturnih aberacija hromosoma, a učestalost tih aberacija zavisi od primljene doze zračenja. S povećanjem doze zračenja, raste broj acentričnih fragmenata, dicentričnih hromosoma, te broj prstenastih hromosoma.
- Pojava dicentričnih hromosoma i acentričnih fragmenata registriranih u ovom istraživanju je bitan pokazatelj u procjeni veličine primljene doze zračenja i stepena radijacionog oštećenja konja.
- Učestalost pojave MN u limfocitima periferne krvi konja nakon *in vitro* ozračenja krvi konja u zavisnosti je od primljene doze zračenja. X zrake remete kinetiku i separaciju genetičkog materijala, a evidentirano je prisustvo MN različite veličine, broja i organizacije. Broj binuklearnih ćelija sa MN, kao i broj binuklearnih ćelija sa više MN, povećava se s porastom doze zračenja.

LITERATURA

1. Bender MA, Rory JM, Kale RP. G₀ chromosomal radiosensitivity in ataxia telangiectasia lymphocytes. *Mutat Res.* 1985;150:277-282.
2. Chang WP, Hwang B, Wang D, i sar. Cytogenetic effect of chronic low-level, low-dose-rate gama radiation in residents of irradiated buildings. *Lancet*, 1997;350:330-3.
3. Chang WP, Tsai M, Hwang J, i sar. Follow-up in the micronucleus frequencies and its subsets in human population with chronic low-dose gama irradiation exposure. *Mutat Res.* 1999;428:99-105.
4. Dolphin GW. A review of *in vitro* dose-effect relationship. In: Evans HJ, Lloyd DC. Eds. *Mutagen induced chromosome damage in man*. Edinburgh University Press 1978.
5. Emery AEH. *Osnovi medicinske genetike*. Šesto englesko izdanje Savremena administracija, Beograd 1986.
6. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 1985;147(1-2):29-36.
7. Fenech M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis – blocked lymphocytes as biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat Res.* 1998;404:155-165.
8. Fenech M, Cgang WP, Kirsch-Volders M, i sar. Human Micronucleus project, “HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures”. *Mutat Res.* 2003;534:65-75.

9. Hasanbašić D. Citogenetska dozimetrija na modelu domaće koze nakon *in vitro* i *in vivo* ozračivanja visokoenergetskim X zračenjem [disertacija]. Veterinarski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Zavod za radiologiju; 1991.
10. Hasanbašić D, Milošević H, Čustović H, Čutuk R. Frekvencija hromosomskih aberacija nakon X i γ ozračivanja krvi goveda. *Veterinaria* 1998;47(1-2):183-8.
11. Hasanbašić D, Rukavina D, Sofradžija A, Obralić N, Saračević L. Utjecaj ionizirajućeg zračenja na pojavu mikronukleusa u limfocitima konja. Zbornik radova VI Simpozija HDZZ; Zagreb, 2005;227-232.
12. Haverić S. Komparativna genotoksikološka istraživanja bh stanovništva izloženog mutagenima životne sredine u ratnom i poratnom periodu [Magistarski rad]. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu; 2005.
13. Kašuba V. Genotoksični učinak J^{131} na ljudske limfocite. [disertacija]. Sveučilište u Zagrebu, 1995.
14. Krishnaja AP, Sharma NK. Transmission of γ – ray induced unstable chromosomal aberrations through successive mitotic divisions in human lymphocytes *in vitro*. *Mutagenesis* 2004;19(4): 295-305.
15. Kubelka D. Odnos doze zračenja i hromozomskih aberacija u ljudskim limfocitima [Magistarski rad]. Sveučilište u Zagrebu, 1985.
16. Lloyd DC, Edwards AA, Prosser JS, i sar. A collaborative exercise on cytogenetic dosymetry for simulated whole and partial body accidental irradiation. *Mutat Res.* 1987;179:197-208.
17. Maffei F, Angelini S, Cantelli Forti G, i sar. Micronuclei frequencies in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation: influence of smoking status and other factors. *Mutagenesis* 2002;17:405- 9.
18. Moorhead PS, Nawell PC, Mallman WJ, i sar. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research* 1960;20:613-6.
19. Pastor S, Gutierrez S, Creus A, I sar. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 2001;16:539-545.
20. Pertti A, vonKoskull H. Distribution of spontaneous chromosome breaks in human chromosomes. *Hum Genet.* 1976;32:143-148.
21. Rosefort C., Fauth E., Zankl H. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis* 2004;19:277-284.
22. Rozgaj R., Kašuba V., Šimić D. The frequency of dicentrics and acentrics and the incidence of rogue cells in radiation workers. *Mutagenesis* 2002; 17(2):135-9.
23. Slijepčević P. Citogenetska dozimetrija x-zračenja na modelu *Sus scrofa domestica* [disertacija]. Veterinarski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Zavod za radiologiju; 1991.

24. Tsai MH, Hwang JS, Chen KC, i sar. Dynamics of changes in micronucleus frequencies in subjects post cessation of chronic low-dose radiation exposure. *Mutagenesis* 2001;16:251-5.
25. - - - International Atomic Energy Agency (IAEA) - Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual. Technical Reports Series No. 405. Vienna: IAEA; 2001.

Uredništvo primilo rukopis 05.04.2011.