Procjena primarnih oštećenja DNA u krvi i organima miša nakon izloženosti ionizirajućem zračenju

Modrić, Željka

Master's thesis / Diplomski rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:301540

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Željka Modrić

PROCJENA PRIMARNIH OŠTEĆENJA DNA U KRVI I ORGANIMA MIŠA NAKON IZLOŽENOSTI IONIZIRAJUĆEM ZRAČENJU

Diplomski rad

Zagreb, 2012.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, pod voditeljstvom dr.sc. Mirte Milić, dipl. ing. biol., znanstvenog suradnika, i suvoditeljstvom dr. sc. Vesne Benković, docenta, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja diplomirani inženjer biologije, smjer ekologija.

Najljepše zahvaljujem mentorici dr. sc. Mirti Milić, znanstvenoj savjetnici, na predloženoj temi, voditeljstvu, pruženom znanju te iznimnom strpljenju..

Zahvaljujem se i suvoditeljici doc. dr. sc. Vesni Benković na susretljivosti i potpori prilikom izrade ovoga rada .

Naposljetku, zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na pruženoj podršci i strpljenju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

PROCJENA PRIMARNIH OŠTEĆENJA DNA U KRVI I ORGANIMA MIŠA NAKON IZLOŽENOSTI IONIZIRAJUĆEM ZRAČENJU

Željka Modrić

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Primarna oštećenja DNA u perifernoj krvi i organima Swiss albino miša proučavana su tehnikom alkalnog komet testa. Mjerena su oštećenja i popravak neposredno nakon te 2 i 6 sati nakon izlaganja γ-zračenju (^{60}Co), koristeći klinički relevantne doze od 1 i 2 Gy. Većina DNA lezija popravljena je 2 sata nakon zračenja. Stanice mozga obrađene odmah nakon zračenja pokazale su veću količinu oštećenja u usporedbi sa stanicama jetre i bubrega. Dinamika popravka procjenjena je pomoću celularnog DNA indeksa popravka. Stanice mozga i periferni leukociti su pokazali brži i efikasniji popravak, sugerirajući veću radiorezistentnost za primljene doze. Primijećene su značajne razlike u vremenu potrebnom za popravak i dinamici popravka pri korištenim dozama, posebice kod stanica mozga.

(40 stranica, 15 slika, 4 tablice, 109 literaturnih navoda, jezik izvornika-hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: ionizirajuće zračenje, komet test, leukociti, jetra, bubreg, mozak, popravak DNA

Voditelj: Dr. sc. Mirta Milić, zna. sur.
Suvoditelj: Dr. sc. Vesna Benković, doc.
Ocjenitelji: Dr. sc Mirta Milić, zna. sur.
Dr.sc. Vesna Benković, doc.
Dr. sc. Mladen Kerovec, red. prof.

Rad prihvaćen: 2.2.2012

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

ASSESSMENT OF PRIMARY DNA DAMAGE IN BLOOD AND DIFFERENT ORGANS IN SWISS ALBINO MICES AFTER EXPOSURE TO IONISING RADIATION

Željka Modrić

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Primary DNA damage was studied on peripheral blood and different organs in Swiss albino mice using the alkaline comet assay. The damage and repair were measured immediatelly after, 2 and 6 hours after the exposure to γ- radiation (^{60}Co), using clinically relevant doses of 1 and 2 Gy. The majority of DNA lesions had been repaired in first 2 hours after irradiation. Brain cells processed immediately after the exposure showed more damage compared to liver and kidney cells. Dynamics of repair was estimated using cellular DNA repair index. Brain cells and peripheral leucocytes appeared to repair the damage more effectively than liver and kidney cells, suggesting higher radioresistance to administered doses. There was a significant difference in repair time and dynamics comparing the doses, especially in brain cells.

(40 pages, 15 figures, 4 tables, 109 references, original in Croatian)
Thesis deposited in the Central biological library.

Keywords: ionising radiation, comet assay, leucocytes, liver, kidney, brain, cellular DNA repair index

Supervisor: Dr. Mirta Milić, Sci. Assoc.
Cosupervisor: Dr. Vesna Benković, Assst. Prof.
Reviewers: Dr. Mirta Milić, Sci. Assoc.
Dr. Vesna Benković, Asst. Prof.
Dr. Mladen Kerovec, Prof.

Thesis accepted: February 2nd, 2012

KRATICE

IR- ionizirajuće zračenje (od eng. *ionising radiation*)

ROS- reaktivni radikali kisika (od eng. *reactive oxygen species*)

SSB- jednostruki lomovi DNA (od eng. *single strand break*)

DSB- dvostruki lomovi DNA (od eng. *double strand break*)

EDTA- etilen-diamin-tetraoctena kiselina

AP mjesta- apurinska ili apirimidinska mjesta osjetljiva na lužine u molekuli DNA

NMP- agaroza normalnog tališta (od eng. *normal melting point*)

LMP- agaroza niskog tališta (od eng. *low melting point*)

TL- dužina repa kometa (od eng. *tail length*)

TI- postotak DNA u repu (od eng. *tail intensity*)

TM- repni moment (od eng. *tail moment*).

CRI- celularni DNA indeks popravka (od eng. *cellular DNA repair index*)

TBI- ozračivanje cijelog tijela (od eng. *total body irradiation*)

SOD- Cu-, Zn- te Mn-superoksid dismutaze

GPx- glutation-peroksidaza

CAT- katalaza

MDA- malondialdehid, produkt lipidne peroksidacije

DNA- deoksiribonukleinska kiselina

RNA- ribonukleinska kiselina

Gy- mjerna SI jedinica apsorbirane doze zračenja

CT- kompjuterizirana tomografija (od eng. *computed tomography*)

1. UVOD 1

2. LITERATURNI PREGLED 2

2.1. IONIZIRAJUĆE ZRAČENJE (IR) 2

2.2. DNA POPRAVAK 4

2.3. KOMET TEST 5

2.4. CILJ 7

3. MATERIJALI I METODE 8

3.1. POKUSNE ŽIVOTINJE 8

3.2. ZRAČENJE 8

3.3. UZORCI 8

3.4. KOMET TEST 9

3.5. STATISTIČKE METODE 9

4. REZULTATI 10

4.1. PRIMARNA OŠTEĆENJA U KRVI PRIJE I NAKON OZRAČIVANJA 10

4.2. PRIMARNA OŠTEĆENJA U JETRI PRIJE I NAKON OZRAČIVANJA 13

4.3. PRIMARNA OŠTEĆENJA U BUBREGU PRIJE I NAKON OZRAČIVANJA 15

4.4. PRIMARNA OŠTEĆENJA U MOZGU PRIJE I NAKON OZRAČIVANJA 17

4.5. USPOREDBA POPRAVKA PRIMARNIH OŠTEĆENJA U KRVI I RAZLIČITIM ORGANIMA 21

5. RASPRAVA 23

6. ZAKLJUČAK 29

7. POPIS LITERATURE 30

1. UVOD

U današnjem svijetu, izloženost ionizirajućem zračenju (IR-od eng. *ionising radiation*) je u stalnom porastu. Osim izloženosti prirodnom zračenju iz okoliša putem tla, konzumirane hrane te kozmičkog zračenja iz svemira, sve učestalije korištenje umjetnih izvora zračenja povećava mogućnost izloženosti štetnim utjecajima. Osim toga, dio svakodnevnog života postalo je i korištenje nuklearnih reaktora za stvaranje električne energije i korištenje zračenja za steriliziranje hrane.

U današnje vrijeme štetnost izloženosti visokim dozama IR-a je dovoljno istražena (Morgan 2003), ali utjecaj izloženosti niskim (Pierce i Preston 2000) i dijagnostičkim dozama još uvijek je nedovoljno razjašnjen. Također, u porastu je i profesionalna izloženost pojedinaca, bilo tijekom primjene dijagnostičkih i terapijskih postupaka, ili slučajno, prilikom nesreća na radnim mjestima na kojima se rabe izvori zračenja. Zbog mogućnosti stvaranja oštećenja te malignih promjena na stanicama, ovakvo izlaganje, osim razmatranja alternativnih metoda, zahtijeva korištenje osjetljivih tehnika kojima bi se procjenilo nastalo oštećenje te pomnije promišljanje o potencijalnoj zaštiti pojedinaca.

Animalni modeli, koji pokazuju sličnost s imunološkim sustavom i imunološkim odgovorom ljudi mogu poslužiti za procjenu nastalih oštećenja u cijelom organizmu nakon izloženosti IR-u. Osim odgovarajućeg modela, potrebno je imati i odgovarajuću, dovoljno osjetljivu tehniku za procjenu oštećenja u različitim organima animalnog modela.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. *IONIZIRAJUĆE ZRAČENJE (IR)*

IR se definira kao zračenje dovoljne energije za ioniziranje elektrona i stvaranje nabijenih čestica. Izvori IR-a mogu se podijeliti na prirodne (pozadinske) i umjetne, koji su po svojoj prirodi i učinku identični prirodnim izvorima. Prirodno IR dolazi iz tri glavna izvora: kozmičko zračenje, prirodno zračenje radioaktivnih materijala i radon-a. Umjetni izvori su stvoreni radom ljudi i koriste se: tijekom medicinske procedure (dijagnostičke X-zrake, nuklearna medicina, terapija zračenjem), u ciklusu nuklearnog goriva, u detektorima dima, pa čak i u građevinskim materijalima.

Prema emisiji načinjena je podjela na elektromagnetska zračenja vrlo kratke valne duljine, kao što su X-zračenje (rendgensko) i γ-zračenje, i zračenja s emisijom čestica (α-čestice, β-čestice i neutroni) (Hebrang i Lovrenčić 2001).

Govoreći o biološkom utjecaju zračenja, sve interakcije odvijaju se na staničnoj razini, ali se utjecaj može očitovati i na pojedinim organima i/ili na cijelom organizmu. Djelovanje može biti dvojako, somatsko i genetičko. Somatski učinak se očituje na razini cjelokupnog organizma, a uzrokovati ga mogu zračenja iz vanjskih izvora (radioterapija, atomske eksplozije, nuklearne nesreće) ili unos radioaktivnih izotopa u tijelo. Genetički učinak očituje se na razini kromosoma i gena, odnosno u promjeni strukture kromosoma ili mutaciji gena. Nakon izloženosti, energija zračenja vrlo se brzo deponira u stanici (10^{-18} sekundi nakon izlaganja zračenju), a zatim slijedi latentni period u kojem nema mjerljivog oštećenja. Ovisno o primljenoj dozi, latentni period može trajati desetljećima (nakon izlaganja niskim dozama), ili nekoliko minuta ili sati (nakon izlaganja visokim dozama).

Pri visokim dozama, zračenje izaziva staničnu smrt koja može biti mitotička i interfazna. U slučaju interfaze smrti, onemogućena je mitoza (dioba), dok će se u slučaju mitotičke smrti stanica još jedan do dva puta podijeliti te nakon toga izgubiti sposobnost reprodukcije, pri čemu metaboličke funkcije ostaju i dalje aktivne.

Pri izlaganju nižim dozama zračenja, dolazi do promjena u staničnoj proliferaciji (stanični ciklus) i oštećenja DNA (mutacije, strukturne i numeričke promjene kromosoma). Dokazano je također da je osjetljivost stanica na zračenje izravno proporcionalna njihovoj diobenoj aktivnosti, a obrnuto proporcionalna stupnju diferencijacije (Hebrang i Lovrenčić 2001).

Učinak zračenja u tvari ne ovisi samo o predanoj energiji nego i o vrsti zračenja i o tvari. Ista apsorbirana doza različitih energijskih područja i vrsta zračenja može u istoj tvari izazvati različite učinke. Zbog navedenih razloga apsorbirana doza mjeri se u grayima (Gy=J/kg), dok se za biološka tkiva koristi ekvivalentna doza koja se mjeri u sievertima (Sv=J/kg), a odgovara umnošku apsorbirane doze i faktora kvalitete zračenja (Q). Q je faktor modifikacije kojim se opisuje biološka djelotvornost zračenja prema referentnom rendgenskom zračenju proizvedenom uz napon od 200 kV i definiran je za svaku vrstu zračenja.

Izloženost cijelog organizma zračenju stvara različiti stupanj oštećenja u pojedinom tkivu, odnosno organu. Razlog tomu je što različiti organi također apsorbiraju različite doze istog zračenja (IAEA 2001), pa je prema tome svaki organ dobio i svoj indeks osjetljivosti prema zračenju (IAEA 2001). Izlaganjem živog tkiva IR-u nastaju izravna i neizravna oštećenja. Izravna oštećenja od izloženosti IR-u nastaju uslijed djelovanja predane energije na najosjetljivija mjesta na važnim organskim molekulama. Neizravna oštećenja nastaju uslijed radiolize vode i djelomične redukcije kisika koji induciraju stvaranje reaktivnih radikala kisika (ROS-od eng. *reactive oxygen species*) i slobodnih radikala odnosno aktivne vrste kisika tipa OH•, H•, O• , O2•2 (Sandeep i Nair 2010). Smatra se da je 60-70% oštećenja tkiva nakon izloženosti uzrokovano slobodnim radikalima, posebice hidroksilnim radikalom (Vijayalaxmi i sur. 2004). Nastali radikali reagiraju sa staničnim makromolekulama i oštećuju ih stvarajući lomove lanaca DNA i oksidativne promjene na lipidima i proteinima. Takva oštećenja najčešće uzrokuju smrt stanica, no mogu uzrokovati mutacije i druge kromosomske abnormalnosti (Hall i Giaccia 2006, Jeggo i Lavin 2009). Postoji i velika mogućnost da takva oštećenja postanu trajna, a prenošenje na buduće generacije stanica može dovesti do nakupljanja oštećenja i stvaranja genomske nestabilnosti koja često dovodi do razvoja različitih malignih stanja. Prva linija obrane ogranizma protiv povećane koncentracije reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) je povećana aktivnost glavnih antioksidativnih enzima (Fridovich 1995). Pokazano je da u čak 28 proteina postoji kvantitativna promjena ekspresije nakon izlaganja jetre miša ionizirajućem zračenju, te da su najznačajnije promjene u proteinima vezanima za metabolizam reaktivnih kisikovih radikala (An i sur. 2004).

Obzirom na navedene učinke, ionizirajuće zračenje se rabi u nekim medicinskim postupcima kao poželjno djelovanje, npr. prilikom radioterapije onkoloških stanja ali i također u razne dijagnostičke svrhe. Količina zračenja koje se koristi u dijagnostičke medicinske svrhe spada u područje miligraya. Za terapeutske svrhe koriste se frakcijske količine do 2 Gy, s obzirom da je zračenjem obuhvaćeno samo područje koje se tretira. Prosječna doza radijacije abdominalnih rentgenskih zraka iznosi 1.4 mGy, abdominalnog CT pregleda 8.0

mGy, CT pregleda zdjelice 25 mGy, a selektivnog CT pregleda abdomena i zdjelice 30 mGy (Baden i Brodsky 1985).

Najnovija istraživanja pokazuju da se rizik od malignih oboljenja može povezati s izloženošću rentgenskom zračenju (terapijskom i dijagnostičkom) (Gonzalez i Darby 2004), te CT pregledima (Brenner i Elliston 2004). Iako se još uvijek za rizik obolijevanja od raka nakon izloženosti niskim dozama zračenja (kakve se koriste u dijagnostičke i terapeutske svrhe) koristi ekstrapolacija iz područja visokih doza, pokazano je da kod prolongirane izloženosti postoji i adaptivni efekt koji pomiče vrijednost najmanje doze za koju postoji povećani rizik obolijevanja u odnosu na akutnu dozu koju bi pojedinac kratkotrajno primio (Brenner 2003).

2.2. *DNA POPRAVAK*

Većina gena koja utječe na životni vijek stanica je direktno ili indirektno povezana s popravkom DNA oštećenja i njenom zaštitom (Browner i sur. 2004). Oštećenja DNA u organizmu mogu nastati spontano ili inducirano, utjecajem endogenih i egzogenih pojava. Stanica s akumuliranim oštećenjima može ući u proces apoptoze, dormancije (senescencije) ili se i dalje mitotski dijeliti, čime dolazi do prijenosa oštećenja na buduće generacije, obzirom da su ista uklopljena u genom (Prise i sur. 2005). Također, potrebno je razlikovati posljedice oštećenja u stanicama koje imaju niski mitotski indeks u usporedbi sa stanicama koje imaju viši mitotski indeks. U slučaju niskog mitotskog indeksa, oštećenja će se akumulirati u stanicama uzrokujući njihovo starenje (Best 2009), dok u stanica s visokim indeksom oštećenja mogu uzrokovati mutacije koje, ako opstanu u genomu, mogu uzrokovati maligne promjene u tkivima (Acharya 1976).

Oštećenja DNA mogu biti promjene samih nukleotida (kao npr. stvaranje pirimidinskih dimera utjecajem UV zračenja), lomovi jednog lanca DNA (jednostruki lomovi, SSB od eng. *single strand break*) ili lomovi oba lanca DNA (dvostruki lomovi, DSB od eng. *double strand break*). Organizam raspolaže s više vrsta mehanizama za popravak oštećenja DNA čime se čuva integritet genoma. Mehanizmi popravka DNA uključuju izravni popravak oštećenja, popravak izrezivanjem oštećenog fragmenta (te ponovno sintetiziranje fragmenta koji nedostaje pomoću komplementarnog lanca) u slučaju SSB, te više različitih puteva popravka u slučaju dvostrukih lomova (Friedberg 2003). Dvostruki lomovi DNA smatraju se jednim od najvažnijih i najopasnijih oštećenja jer je često potpuno ili djelomično oštećen komplementarni fragment i na sestrinskoj kromatidi ali i na homolognom kromosomu. Ako

istovremeno postoji i dvolančani lom i ukriženje lanaca, to su nepropravljiva oštećenja, jer niti jedan lanac ne može služiti kao kalup za popravak. Takva će stanica biti uništena u slijedećoj mitozi ili će mutirati (Acharya 1971, Bjorksten i sur. 1971).

2.3. *KOMET TEST*

Genotoksičnost u stanicama s mitotskom aktivnošću (dakle, kod stanica koje se dijele) može se pratiti standardnim citogenetskim metodama, kao što su mikronukleus test, kromosomske aberacije ili izmjena sestrinskih kromatida (Patel i sur. 2006). No, genotoksičnost u organima ne može se mjeriti ovakvim metodama, pogotovo kod organa koji nemaju mitotski aktivne stanice, pa su Tsuda i sur. (1998) predložili korištenje alkalne verzije komet testa za procjenu genotoksičnosti različitih organa na modelu miša.

Tehnika komet testa, poznata još i pod imenom mikrogel elektroforeza, dobila je naziv prema obliku koji pri elektroforezi poprima oštećena fluorescirajuća DNA, a podsjeća na oblik kometa (Singh i sur. 1988). Takav oblik posljedica je polomljenih fragmenata DNA koji, razvučeni u električnom polju, oblikuju "rep" kometa. Ovakva metoda je brza i dovoljno osjetljiva za procjenu DNA lezija u bilo kojem organu, bez obzira na njegovu mitotsku aktivnost (Slika 1.).

Prvu mikrogel elektroforezu u svrhu procjene oštećenja DNA u stanicama uklopljenima u agarozni gel proveli su još 1984. godine Östling i Johanson. U ovoj se tehnici pojedinačne stanice najprije uklapaju u agarozni "sendvič". Nakon liziranja citoplazme i membranskih struktura pomoću otopine visoke koncentracije etilen-diamin-tetraoctene kiseline (EDTA) i detergenata oslobađa se ukupna stanična DNA. Ona se zatim denaturira u lužnatom ili neutralnom puferu, ovisno o vrsti oštećenja koje se prati. Denaturacijom u neutralnim uvjetima omogućuje se specifična detekcija dvolančanih lomova u molekuli DNA (Olive, 1990). Denaturacija u alkalnim uvjetima (pH=13) omogućuje specifičnu detekciju jednolančanih lomova, mjesta osjetljivih na lužine (alkalno-labilna mjesta) te ukriženog povezivanja između molekula DNA-DNA i DNA-proteina. Mjesta osjetljiva na lužine nastaju u dijelovima molekule DNA gdje postoje apurinska ili apirimidinska, tzv. AP mjesta. Ta su mjesta podložnija oštećenjima pa se u lužnatim uvjetima pretvaraju u lomove zbog čega se alkalni komet test smatra optimalnim za otkrivanje učinaka različitih genotoksičnih agenasa (Singh i sur. 1988).

Denaturacijom u lužnatom ili neutralnom puferu ujedno se i neutraliziraju nastale soli koje bi mogle neutralizirati negativne naboje fosfatnih skupina DNA i time omesti putovanje fragmenata prilikom elektroforeze, koja je sljedeći korak ove tehnike. Molekula DNA je

molekula velike molekularne mase i kao takva ne može putovati kroz pore gela, dok fragmenti nastali lomovima DNA putuju u procesu elektroforeze prema anodi. Brzina kretanja fragmenata nastalih jednolančanim ili dvolančanim lomovima DNA kroz gel ovisi o njihovoj veličini: što su fragmenti kraći, brže se kreću (Plappert i sur. 1995). Komet testom moguće je detektirati i stanice u apoptozi te nekrotične stanice. Kometi stanica u apoptozi imaju male „glave“, a većina DNA raspršena im je u oblaku „repa” (Fairbairn i sur. 1995, Olive 1999).

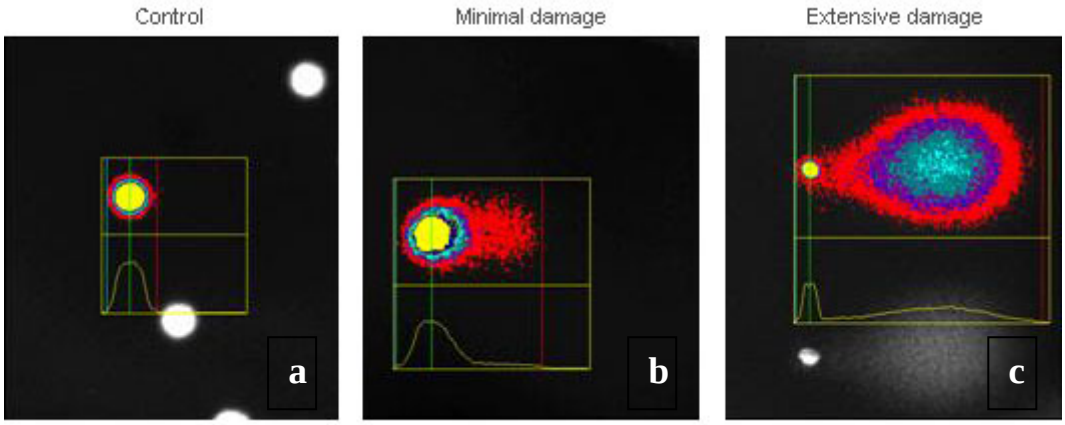
Osnovne prednosti koje čine komet test vrlo prikladnom tehnikom za procjenu oštećenja i popravka molekule DNA na razini pojedinačnih stanica su: osjetljivost testa bez obzira o kojemu se organu radi i bez obzira na mitotsku aktivnost samih stanica, ponovljivost rezultata, jednostavnost primjene, niski troškovi, brzina izvođenja (rezultate je moguće dobiti u roku od nekoliko sati) te mala količina uzorka potrebnog za analizu. Komet testom moguće je analizirati bilo koju vrstu stanica biljnog, životinjskog ili ljudskog podrijetla, neovisno o tome jesu li stanice izolirane iz različitih tkiva ili staničnih kultura (Kassie i sur. 2000, Kruszewski i sur. 1998, Wojewodzka i sur. 1998, Betti i sur. 1994, McKelvey-Martin i sur. 1993).

Za analizu preparata i mjerenje koristi se epifluorescencijski mikroskop. Nakon elektroforeze i bojanja fluorescencijskom bojom (obično etidij-bromidom), pregledavaju se pojedinačne stanice na preparatu. Obris potpuno neoštećene DNA okruglog je oblika, dok obrisi oštećenih DNA nalikuju kometima. Svakom pojedinačnom kometu mjere se parametri oštećenja. Dužina repa najčešće se mjeri od središta jezgre do kraja kometa (udaljenost koju su prešli fragmenti oštećene DNA u gelu za vrijeme elektroforeze) i izražava se u mikrometrima. Proporcionalna je oštećenju DNA i dužini odlomljenih fragmenata (Tice i sur. 1990, Singh i sur. 1988). Postotak DNA u repu kometa i postotak DNA u glavi kometa DNA, mjere se pomoću posebnog računalnog programa za analizu slike. Na temelju tih podataka izračunava se i repni moment, parametar koji ujedinjuje podatke i o dužini i o postotku DNA u repu. Neki istraživači smatraju da je repni moment kometa bolji pokazatelj stupnja oštećenja (Mc Kelvey-Martin 1998, Hellman i sur. 1997, Ashby i sur. 1995, Hellman i sur. 1995), a neki da je postotak DNA u repu kometa najbolji pokazatelj jer pokazuje koliko je zapravo DNA u samom repu, bez obzira koliko on bio dugačak (Collins 2004).

Komet test je tehnika koja je postala općeprihvaćena u istraživanjima učinaka različitih genotoksičnih agensa u uvjetima *in vitro* i *in vivo*.

Bitno je naglasiti da se osim oštećenja DNA, komet testom može pratiti i popravak (Müller i sur. 1994). Za praćenje popravka DNA pojedinačnih stanica, stanice se nakon izlaganja određenoj dozi ionizirajućeg zračenja uranjaju u topli medij (37 ºC) za stanične kulture koji ima sve potrebno za održavanje stanica, osim seruma. Nakon različitih

vremenskih perioda inkubacije, mjeri se preostalo oštećenje te prati brzina i razina popravka oštećenja. Što se tiče ionizirajućeg zračenja, pokazano je da se većina lomova popravlja unutar 30 minuta od izlaganja ionizirajućem zračenju (Frankenberg-Schwager 1989), a 2 sata nakon izlaganja dozi od 2 Gy gotovo sva oštećenja su popravljena (Plappert i sur.1997).



Slika 1. Prikaz različitih stupnjeva oštećenja DNA detektiranih komet testom.
a- prikaz neoštećene DNA, **b**- prikaz oštećene DNA, dužina repa se mjeri od zelene do crvene linije, **c**- prikaz jako oštećene, apoptotične stanice kojoj je veći dio DNA u repu kometa. Slika je preuzeta s internet stranice:
http://www.bat-science.com/groupms/sites/bat_7awfh3.nsf/vwPagesWebLive/DO88UETB?opendocument&SKN=1

2.4. *CILJ*

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti vrijednosti i brzinu popravka primarnih oštećenja DNA u stanicama mozga, jetre i bubrega te leukocitima, kod Swiss albino soja miševa metodom komet testa i utvrditi postoje li razlike u osjetljivosti na samu izloženost odmah nakon ozračivanja, 2 sata nakon i 6 sati nakon ozračivanja dozama od 1 i 2 Gy.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. *POKUSNE ŽIVOTINJE*

U istraživanju smo koristili miševe soja Swiss albino, starosti 55-65 dana, uzgojene na uzgajalištu Zavoda za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu. Pokus je proveden u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/2006.) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23.). Životinje su okoćene i uzgojene u standardnim uvjetima propisanim za uzgoj laboratorijskih životinja (temperatura od 25 ˚C, dnevni ritam svjetla i tame 12/12 sati, ponuđena formulirana hrana i voda *ad libitum*).

Nasumičnim odabirom životinje su raspodijeljene u tri skupine:

1. kontrolna skupina,
2. skupina koja će primiti dozu ionizirajućeg zračenja od 1 Gy,
3. skupina koja će primiti dozu ionizirajućeg zračenja od 2 Gy.

3.2. *ZRAČENJE*

Ozračili smo miševe u KB Sveti Duh u Zagrebu primjenom X-zračenja u dijagnostički relevantnim dozama od 1 i 2 Gy. Izvor zračenja je bio kobalt (^{60}Co-Theratron Phoenix teletherapy unit, Atomic Energy Ltd.), s brzinom doze od 1.88 Gy/minuti.

3.3. *UZORCI*

Miševi smo žrtvovali neposredno nakon, dva sata te 6 sati nakon ozračivanja cervikalnom dislokacijom. Za analizu smo skupili uzroke tkiva i krvi. Uzorke krvi skupili smo iz repne vene. Tkiva mozga, jetre i bubrega u omjeru 1g tkiva na 1 ml pufera mehanički smo usitnili. u puferu za homogenizaciju (0,075 M NaCl (Kemika), 0,024 M Na_2EDTA (Sigma), pH 7,5) ohlađenom na +4 do jednostanične suspenzije.

3.4. *KOMET TEST*

U istraživanju smo koristili standardnu izvedbu komet testa u alkalnim uvjetima (Singh i sur. 1988.) na leukocitima, stanicama jetre, bubrega i mozga miševa. Priredilii smo mikrogelove agaroze u koje smo ukloplili uzorke krvi te stanice jetre, bubrega i mozga. Na brušena stakalca nanijeli smo sloj 1 %-tne NMP (od eng. *normal melting point*) agaroze. Nakon hlađenja, višak agaroze je pažljivo smo ostrugali, a stakalca su osušena na sobnoj temperaturi. Na tako pripremljena stakalca dodali smo 300 µL 0,6 % NMP agaroze. Nakon 10 minuta na 0 ºC, dodali smo sloj od 5 µL uzorka pomiješanog s 100 µL 0,5 % LMP (od eng. *low melting point*) agaroze. Potom smo preparat prekrili novim slojem 0,5% LMP agaroze (100 µL). Tako priređene mikrogelove uronili smo u hladnu otopinu za liziranje staničnih membrana (pH 10; 2,5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1 % Na-sarkozinata, 1% Triton X-100 i 10 % DMSO), 24 sata na 4ºC. Nakon liziranja, slijedila je denaturacija u puferu pH 13 (20 minuta) te 20-minutna elektroforeza u istom puferu na 25 V (300 mA). Nakon elektroforeze preparati smo neutralizirali Tris-puferom (pH 7,5), obojali etidij-bromidom te analizirali pod mikroskopom. Pomoću posebnog računalnog sustava za analizu slike, analizirani su i izmjereni obrisi jezgara stanica u gelu, koji po obliku nalikuju na komete. Svakom kometu mjerio se niz parametara, dužina repa kometa (izražava se u mikrometrima, TL- od eng. *tail length*), postotak DNA u repu (TI- od eng. *tail intensity*), te repni moment (TM- od eng. *tail moment*).

3.5. *STATISTIČKE METODE*

Radi normalizacije rezultata, vrijednosti komet testa su logaritmirane prije daljnje obrade. Statistička značajnost rezultata dobivenih u istraživanju komet testom ispitana je računalnim programom STATISTICA 9.0 (StatSoft, Tulsa. SAD) primjenom testa Break down Anova analiza sa post hoc Scheffeovom modifikacijom.

4. REZULTATI

Cilj ovog pokusa bila je procjena oštećenja i popravka stanične DNA nastale u krvi i u različitim organima Swiss albino miševa neposredno, nakon dva sata, te nakon 6 sati od jednokratnog izlaganja dijagnostičkim dozama ionizirajućeg zračenja od 1 i 2 Gy. U tu svrhu određivane su vrijednosti tri parametra koji pokazuju razinu oštećenja DNA- dužina repa kometa, postotak DNA u repu kometa, te repni moment kometa. Rezultati su raspoređeni u tablice prema pripadnosti pojedinom organu.

4.1. *PRIMARNA OŠTEĆENJA U KRVI PRIJE I NAKON OZRAČIVANJA*

Srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom, medijanom i rasponom vrijednosti triju promatranih parametara komet testa u uzorcima krvi Swiss albino soja miševa prikazane su u Tablici 1. Srednje vrijednosti kontrolnih uzoraka prije ozračivanja bile su TL=17,96±3,18μm; TI=2,70±4,02; te TM=0,20±0,30. Rezultati pokazuju da je najveće oštećenje nakon ozračivanja dozom od 1 Gy bilo neposredno nakon ozračivanja, dok je kod ozračivanja dozom od 2 Gy oštećenje bilo najveće dva sata nakon ozračivanja. U uzorcima su uočene stanice s različitim stupnjevima oštećenja DNA, što je vidljivo i iz grafičkog prikaza raspodjele svih izmjerenih parametara komet testa (Slika 2., 3., 4.)

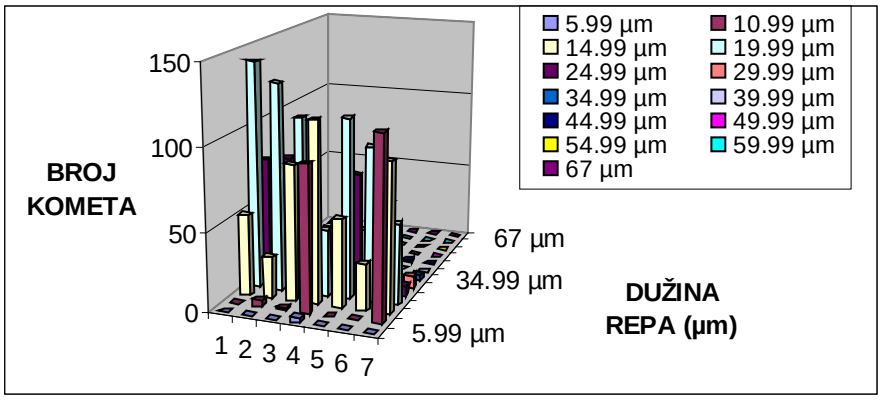
Distribucija oštećenih stanica (Slika 2., 3., 4.) pokazuje obrazac smanjenja broja stanica s dugim repovima i jako oštećenom DNA (1 Gy-0´ i 2 Gy-0´) prema povećanju boja stanica s kraćim repovima i manjim oštećenjem DNA (1 Gy-6h i 2 Gy-6h).

Utvrđena razina primarnih oštećenja DNA statistički je značajno odstupala od kontrolnih vrijednosti neposredno nakon ($p=0,02$) i 6 sati nakon ozračivanja dozom od 1 Gy ($p=0,00$), te dva ($p=0,00$) i šest sati nakon ozračivanja dozom od 2 Gy ($p=0,00$).

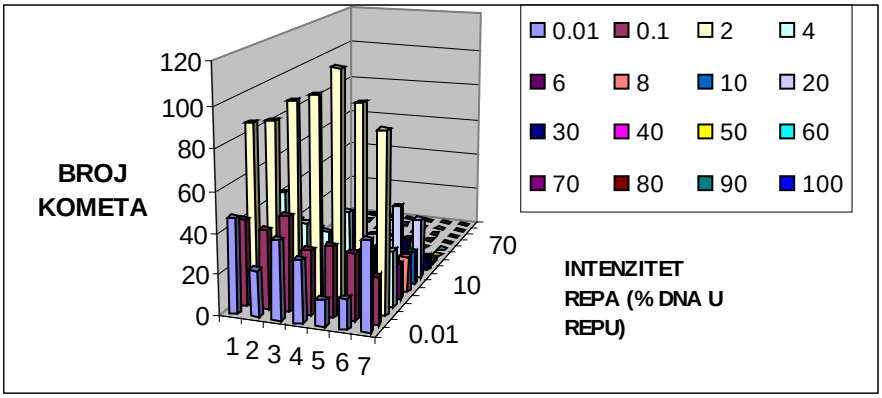
Tablica 1. Rezultati dužine repa, intenziteta repa i repnog momenta komet testa u uzorcima leukocita periferne krvi u ovisnosti o dozi ozračivanja i vremenu uzorkovanja (prikazane su srednja vrijednost±standardna devijacija, medijan te raspon vrijednosti za sva tri parametra)

KRV	DUŽINA REPA	POSTOTAK DNA U REPU	REPNI MOMET
KONTROLA	17,96±3,18 17,50 (13,33-28,75)	2,70±4,02 0,52 (0,00-19,88)	0,20±0,30 0,04 (0,00-1,33)
1Gy-0´	19,61±4,46***** 18,75 (8,33-40,83)	3,56±7,25***** 1,49 (0,00-99,41)	0,34±1,04***** 0,13 (0,00-16,17)
1Gy-2h	17,48±3,97 16,67 (10,42-27,50)	1,97±2,79 0,56 (0,00-13,76)	0,15±0,20 0,05 (0,00-0,96)
1Gy-6h	13,04±4,16***** 12,08 (4,58-27,92)	2,83±3,98***** 0,81 (0,00-25,77)	0,19±0,27***** 0,04 (0,00-1,81)
2Gy-0´	18,93±4,32 17,92 (12,08-29,58)	2,53±3,08 1,30 (0,00-15,52)	0,22±0,27 0,11 (0,00-2,01)
2Gy-2h	20,70±4,82***** 20,42 (12,50-44,17)	5,43±7,93***** 1,41 (0,00-39,99)	0,43±0,64***** 0,13 (0,00-3,48)
2Gy-6h	13,08±4,49***** 11,67 (7,50-34,17)	3,99±5,65***** 1,32 (0,00-38,73)	0,29±0,42***** 0,09 (0,00-2,81)

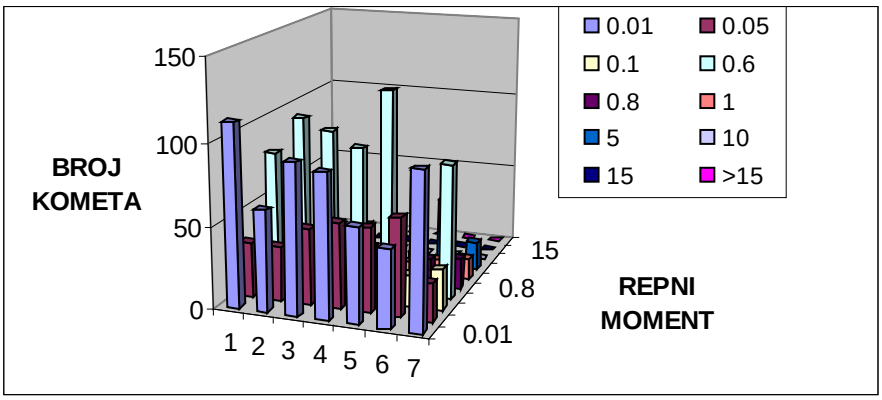
***-** statistički značajne razlike od kontrolnih vrijednosti ($p<0,05$)



Slika 2. Distribucije oštećenih DNA leukocita za parametar dužine repa kometa; **1**- kontrola. **2**- 1 Gy, 0', **3**- 1 Gy, 2h. **4**- 1Gy, 6h, **5**- 2 Gy, 0', **6**- 2 Gy, 2h, **7**- 2 Gy, 6h



Slika 3. Distribucije oštećenih DNA leukocita za parametar postotka DNA u repu kometa; **1**- kontrola. **2**- 1 Gy, 0', **3**- 1 Gy, 2h. **4**- 1Gy, 6h, **5**- 2 Gy, 0', **6**- 2 Gy, 2h, **7**- 2 Gy, 6h



Slika 4. Distribucije oštećenih DNA za parametar repnog momenta kometa; **1**- kontrola. **2**- 1 Gy, 0', **3**- 1 Gy, 2h. **4**- 1Gy, 6h, **5**- 2 Gy, 0', **6**- 2 Gy, 2h, **7**- 2 Gy, 6h

4.2. *PRIMARNA OŠTEĆENJA U JETRI PRIJE I NAKON OZRAČIVANJA*

Tablici 2. prikazuje srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom, medijanom i rasponom vrijednosti triju promatranih parametara komet testa u uzorcima jetre Swiss albino soja miševa. Srednje vrijednosti kontrolnih uzoraka prije ozračivanja bile TL=17,08±5,56 µm; TI=3,12±5,69; TM= 0,24±0,48. Rezultati pokazuju da je najveće oštećenje nakon ozračivanja dozom od 1 Gy kao i od 2 Gy bilo neposredno nakon ozračivanja. U uzorcima su uočene stanice s različitim stupnjevima oštećenja DNA, što je vidljivo i iz grafičkog prikaza raspodjele svih izmjerenih parametara komet testa (Slika 5., 6., 7.)

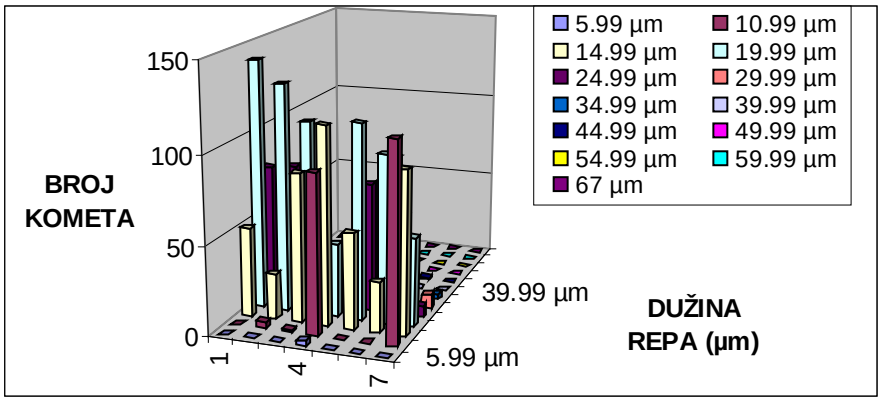
Distribucija oštećenih stanica (Slika 5., 6., 7.) pokazuje obrazac smanjenja broja stanica s dugim repovima i jako oštećenom DNA (1Gy-0´ i 2 Gy-0´) prema povećanju boja stanica s kraćim repovima i manjim oštećenjem DNA (1Gy-6h i 2 Gy-6h).

Utvrđena razina primarnih oštećenja DNA statistički je značajno odstupala od kontrolnih vrijednosti nakon 6 sati nakon ozračivanja dozom od 1 Gy (p=0,00).

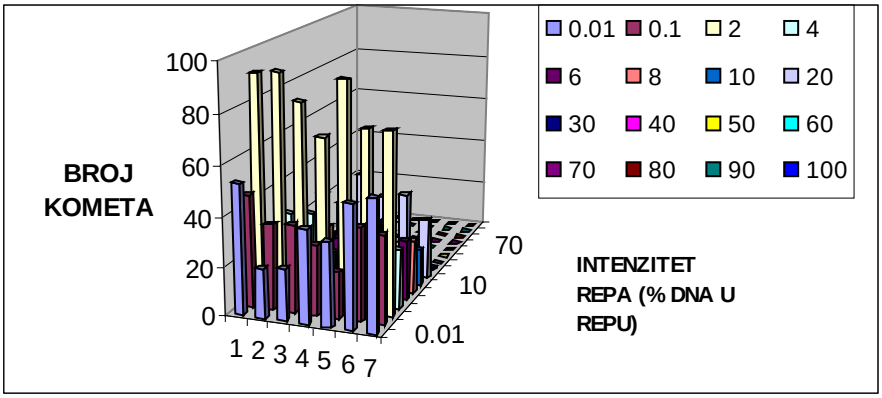
Tablica 2. Rezultati dužine repa, intenziteta repa i repnog momenta komet testa u jetre u ovisnosti o dozi ozračivanja i vremenu uzorkovanja (prikazane su srednja vrijednost±standardna devijacija, medijan te raspon vrijednosti za sva tri parametra)

JETRA	DUŽINA REPA	POSTOTAK DNA U REPU	REPNI MOMET
KONTROLA	17,08±5,56 16,25 (8,33-35,83)	3,12±5,69 0,28 (0,00-4,01)	0,24±0,48 0,01 (0,00-4,01)
1Gy-0´	18,71±7,92 16,67 (9,17-54,58)	5,03±7,62 1,54 (0,00-36,94)	0,54±1,13 0,14 (0,00-6,92)
1Gy-2h	18,55±5,71 17,92 (8,75-35,42)	4,09±5,15 1,96 (0,00-27,29)	0,35±0,44 0,18 (0,00-2,57)
1Gy-6h	11,06±4,45***** 10,00 (4,17-30,42)	6,14±8,15***** 2,03 (0,00-38,51)	0,40±0,55***** 0,13 (0,00-3,33)
2Gy-0´	16,89±6,98 15,00 (5,83-46,67)	3,91±4,75 1,73 (0,00-24,61)	0,33±0,43 0,15 (0,00-3,08)
2Gy-2h	16,55±4,81 15,83 (8,33-34,58)	3,38±4,80 0,75 (0,00-26,08)	0,27±0,40 0,05 (0,00-2,27)
2Gy-6h	15,89±4,81 14,58 (8,33-32,92)	3,36±4,63 0,96 (0,00-20,42)	0,26±0,35 0,07 (0,00-1,97)

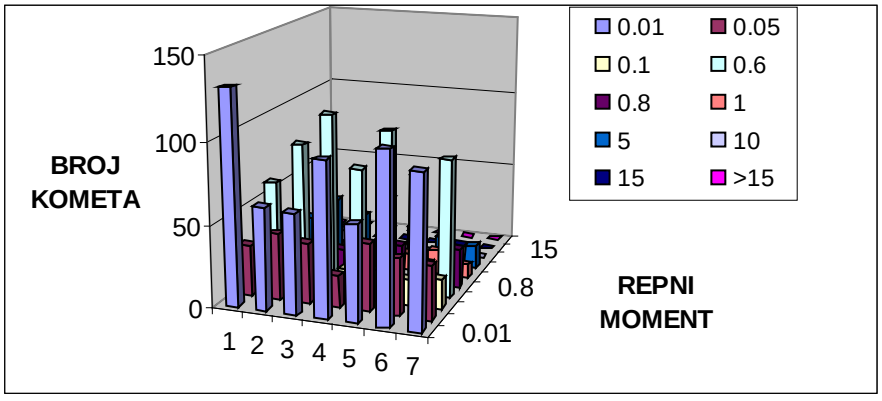
*****- statistički značajne razlike od kontrolnih vrijednosti (p<0,05)



Slika 5. Distribucije oštećenih DNA za parametar dužine repa kometa; **1**- kontrola. **2**- 1 Gy, 0', **3**- 1 Gy, 2h. **4**- 1Gy, 6h, **5**- 2 Gy, 0', **6**- 2 Gy, 2h, **7**- 2 Gy, 6h



Slika 6. Distribucije oštećenih DNA za parametar postotka DNA u repu kometa; **1**- kontrola. **2**- 1 Gy, 0', **3**- 1 Gy, 2h. **4**- 1Gy, 6h, **5**- 2 Gy, 0', **6**- 2 Gy, 2h, **7**- 2 Gy, 6h



Slika 7. Distribucije oštećenih DNA za parametar repnog momenta kometa; **1**- kontrola. **2**- 1 Gy, 0', **3**- 1 Gy, 2h. **4**- 1Gy, 6h, **5**- 2 Gy, 0', **6**- 2 Gy, 2h, **7**- 2 Gy, 6h

4.3. *PRIMARNA OŠTEĆENJA U BUBREGU PRIJE I NAKON OZRAČIVANJA*

Prikaz promatranih parametara komet testa u uzorcima bubrega Swiss albino soja miševa, srednjih vrijednosti sa standardnom devijacijom, medijanom i rasponom vrijednosti, priložen je u Tablici 3.. Srednje vrijednosti kontrolnih uzoraka prije ozračivanja bile su TL=17,10±6,37μm; TI=5,69±8,66; TM=0,46±0,73. Rezultati pokazuju da je najveće oštećenje nakon ozračivanja dozom od 1 Gy bilo neposredno nakon ozračivanja, dok je kod ozračivanja dozom od 2 Gy oštećenje bilo najveće dva sata nakon ozračivanja. U uzorcima su uočene stanice s različitim stupnjevima oštećenja DNA, što je vidljivo i iz grafičkog prikaza raspodjele svih izmjerenih parametara komet testa (Slika 8., 9., 10.)

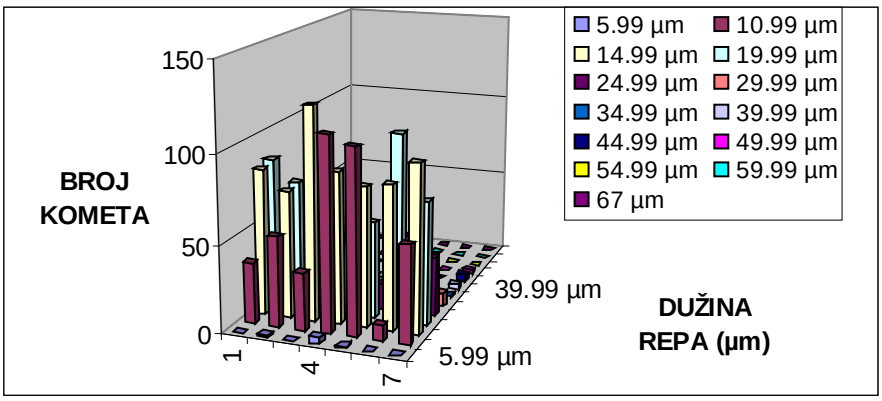
Distribucija oštećenih stanica (Slika 8., 9., 10.) pokazuje obrazac smanjenja broja stanica s dugim repovima i jako oštećenom DNA (1Gy-0´ i 2 Gy-0´) prema povećanju broja stanica s kraćim repovima i manjim oštećenjem DNA (1Gy-6h i 2 Gy-6h).

Utvrđena razina primarnih oštećenja DNA statistički je značajno odstupala od kontrolnih vrijednosti nakon 2 sata (p=0,02) i 6 sati nakon ozračivanja dozom od 1 Gy (p=0,00), te neposredno nakon i dva sata (p=0,00) nakon ozračivanja dozom od 2 Gy (p=0,00).

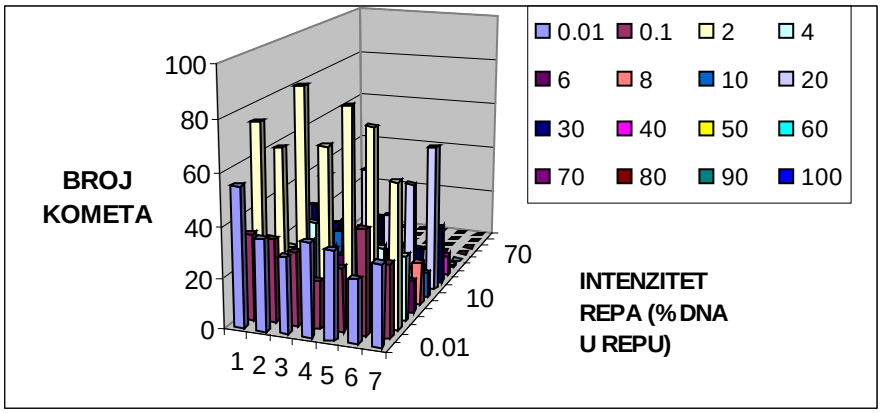
Tablica 3.: Rezultati dužine repa, intenziteta repa i repnog momenta komet testa u uzorcima bubrega u ovisnosti o dozi ozračivanja i vremenu uzorkovanja (prikazane su srednja vrijednost±standardna devijacija, medijan te raspon vrijednosti za sva tri parametra)

BUBREG	DUŽINA REPA	POSTOTAK DNA U REPU	REPNI MOMET
KONTROLA	17,10±6,37 15,42 (7,08-48,75)	5,69±8,66 0,82 (0,00-42,83)	0,46±0,73 0,04 (0,00-3,84)
1Gy-0´	16,84±6,67 15,42 (5,83-40,00)	6,33±8,28 2,24 (0,00-38,55)	0,51±0,68 0,19 (0,00-3,97)
1Gy-2h	14,88±3,53***** 14,17 (8,75-26,25)	3,64±4,53***** 1,42 (0,00-21,00)	0,28±0,35***** 0,11 (0,00-1,74)
1Gy-6h	13,11±5,52***** 11,67 (5,42-40,42)	8,45±10,89***** 3,76 (0,00-61,85)	0,62±0,83***** 0,22 (0,00-4,61)
2Gy-0´	13,62±5,19***** 12,08 (5,83-32,92)	4,45±5,86***** 1,70 (0,00-28,42)	0,33±0,45***** 0,12 (0,00-2,55)
2Gy-2h	17,71±5,13***** 16,25 (9,17-33,33)	5,27±7,26***** 1,63 (0,00-39,97)	0,46±0,71***** 0,14 (0,00-4,08)
2Gy-6h	15,74±6,57 13,75 (7,50-47,08)	7,67±9,20 3,38 (0,00-41,38)	0,65±0,98 0,27 (0,00-6,48)

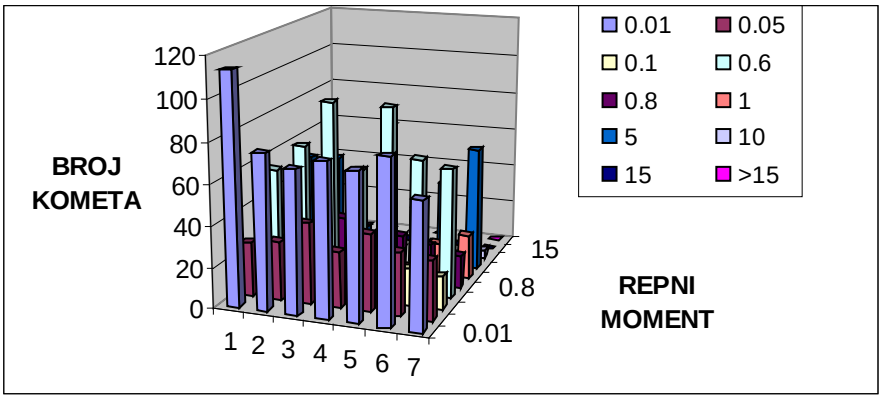
*****- statistički značajne razlike od kontrolnih vrijednosti ($p<0,05$)



Slika 8. Distribucije oštećenih DNA za parametar dužine repa kometa; **1**- kontrola. **2**- 1 Gy, 0', **3**- 1 Gy, 2h. **4**- 1Gy, 6h, **5**- 2 Gy, 0', **6**- 2 Gy, 2h, **7**- 2 Gy, 6h



Slika 9. Distribucije oštećenih DNA za parametar postotka DNA u repu kometa; **1**- kontrola. **2**- 1 Gy, 0', **3**- 1 Gy, 2h. **4**- 1Gy, 6h, **5**- 2 Gy, 0', **6**- 2 Gy, 2h, **7**- 2 Gy, 6h



Slika 10. Distribucije oštećenih DNA za parametar repnog momenta kometa; **1**- kontrola. **2**- 1 Gy, 0', **3**- 1 Gy, 2h. **4**- 1Gy, 6h, **5**- 2 Gy, 0', **6**- 2 Gy, 2h, **7**- 2 Gy, 6h

4.4. *PRIMARNA OŠTEĆENJA U MOZGU PRIJE I NAKON OZRAČIVANJA*

Tablica 4. sadrži prikaz srednjih vrijednosti sa standardnom devijacijom, medijanom i rasponom vrijednosti triju promatranih parametara komet testa u uzorcima mozga Swiss albino soja miševa. Srednje vrijednosti kontrolnih uzoraka prije ozračivanja bile su TL=32,08±9,42 μm; TI=15,28±11,24; TM=2,03±1,59. Rezultati pokazuju da su najveća oštećenja nastupila neposredno nakon ozračivanja kod obje doze ozračivanja. U uzorcima su uočene stanice s različitim stupnjevima oštećenja DNA, što je vidljivo i iz grafičkog prikaza raspodjele svih izmjerenih parametara komet testa (Slika 11., 12., 13.). Na Slici 14. je prikaz oštećenih i neoštećenih DNA bubrega.

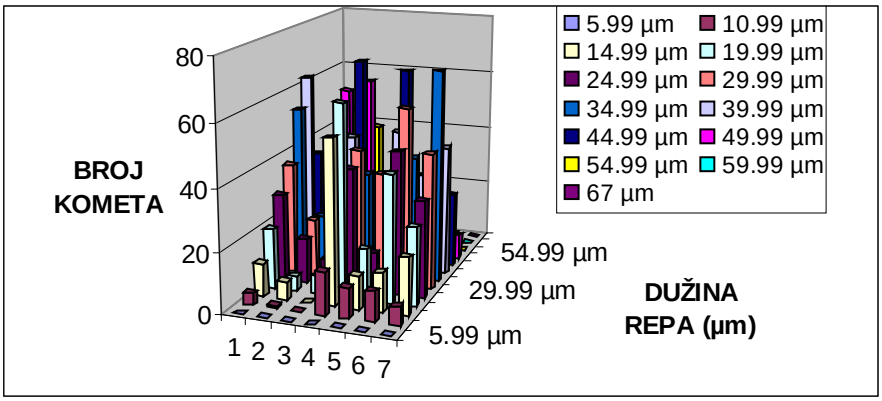
Distribucija oštećenih stanica (Slika 11., 12., 13) pri ozračivanju dozom od 1 Gy pokazuje obrazac povećanja broja stanica s dugim repovima i jako oštećenom DNA (1Gy-0´) prema smanjenju boja stanica s kraćim repovima i manjim oštećenjem DNA (1Gy-6h). Pri ozračivanju dozom od 2 Gy utvrđen je obrazac smanjenja broja stanica s dugim repovima i jako oštećenom DNA (2 Gy-0´) prema povećanju boja stanica s kraćim repovima i manjim oštećenjem DNA (2 Gy-6h).

Utvrđena razina primarnih oštećenja DNA statistički je značajno odstupala od kontrolnih vrijednosti neposredno nakon (p=0,00), nakon 2 sata (p=0,00) i 6 sati nakon ozračivanja dozom od 1 Gy (p=0,00), te dva sata (p=0,00) nakon ozračivanja dozom od 2 Gy (p=0,00).

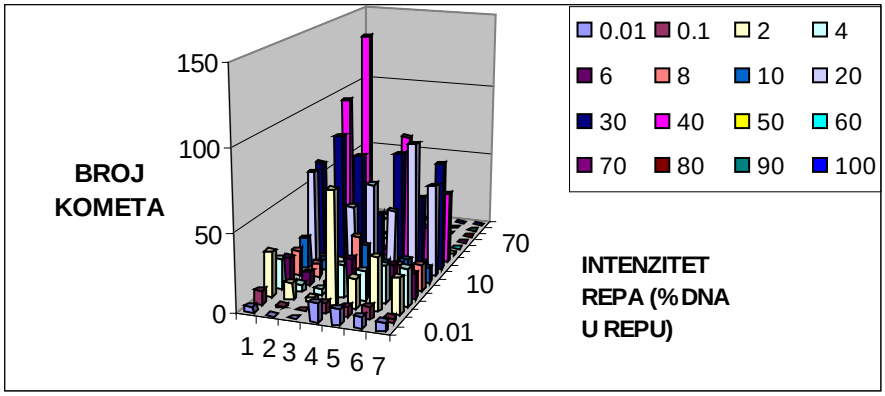
Tablica 4.: Rezultati dužine repa, intenziteta repa i repnog momenta komet testa u uzorcima mozga u ovisnosti o dozi ozračivanja i vremenu uzorkovanja (prikazane su srednja vrijednost±standardna devijacija, medijan te raspon vrijednosti za sva tri parametra)

MOZAK	DUŽINA REPA	POSTOTAK DNA U REPU	REPNI MOMET
KONTROLA	32,08±9,42 32,92 (10,42-51,25)	15,28±11,24 15,05 (0,00-39,30)	2,03±1,59 1,81 (0,00-9,71)
1Gy-0´	42,08±11,38***** 44,17 (10,83-66,25)	23,86±10,86***** 26,29 (0,07-39,72)	4,39±2,40***** 4,75 (0,00-9,71)
1Gy-2h	41,81±8,80***** 42,92 (16,25-59,17)	27,78±9,69***** 30,86 (0,40-39,94)	5,12±2,15***** 5,54 (0,03-9,02)
1Gy-6h	22,17±8,49***** 20,83 (8,75-46,25)	8,60±8,81***** 6,41 (0,00-42,83)	0,92±1,01***** 0,65 (0,00-5,35)
2Gy-0´	34,51±11,30 36,67 (8,75-64,58)	20,78±13,30 23,82 (0,00-44,58)	3,47±2,52 3,49 (0,00-8,90)
2Gy-2h	27,28±9,30***** 26,67 (8,33-51,25)	13,10±10,49***** 11,82 (0,00-39,99)	1,68±1,60***** 1,25 (0,00-7,32)
2Gy-6h	29,11±9,22 30,83 (9,17-50,83)	16,85±12,01 15,84 (0,00-46,21)	2,38±2,01 1,89 (0,00-7,72)

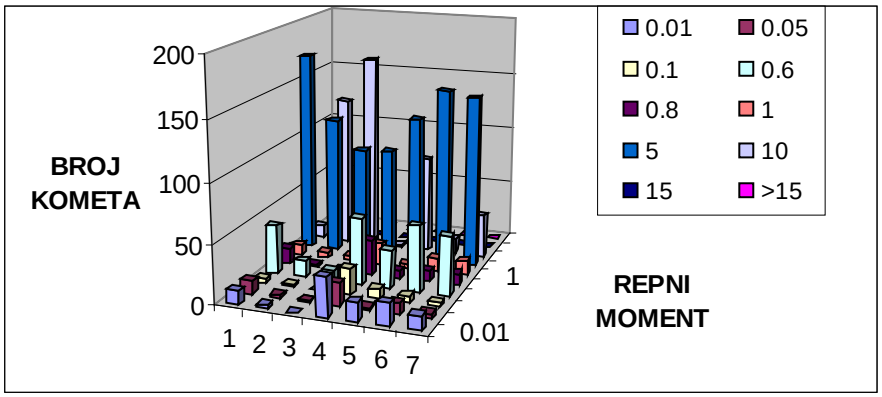
*****- statistički značajne razlike od kontrolnih vrijednosti ($p<0,05$)



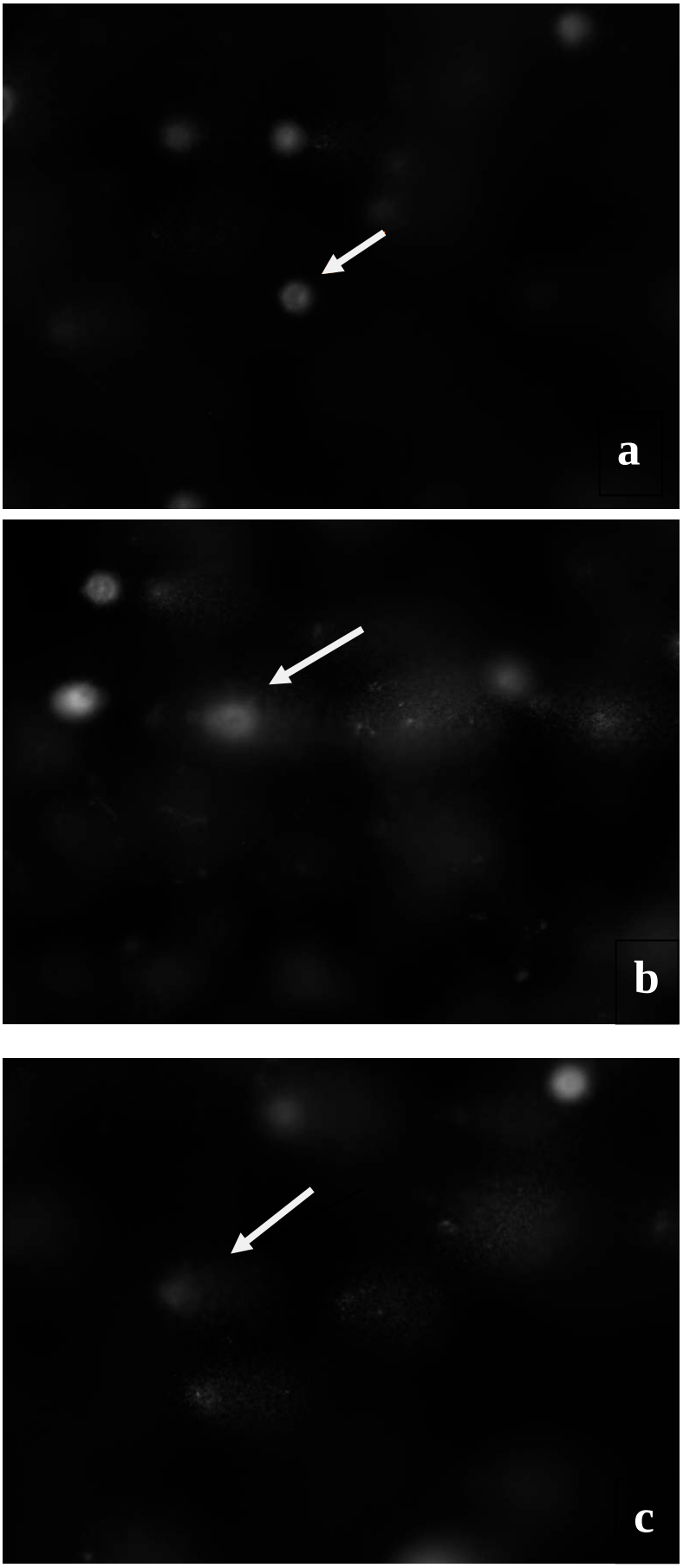
Slika 11. Distribucije oštećenih DNA za parametar dužine repa kometa; **1**- kontrola. **2**- 1 Gy, 0', **3**- 1 Gy, 2h. **4**- 1Gy, 6h, **5**- 2 Gy, 0', **6**- 2 Gy, 2h, **7**- 2 Gy, 6h



Slika 12. Distribucije oštećenih DNA za parametar postotka DNA u repu kometa; **1**- kontrola. **2**- 1 Gy, 0', **3**- 1 Gy, 2h. **4**- 1Gy, 6h, **5**- 2 Gy, 0', **6**- 2 Gy, 2h, **7**- 2 Gy, 6h



Slika 13. Distribucije oštećenih DNA za parametar repnog momenta kometa; **1**- kontrola. **2**- 1 Gy, 0', **3**- 1 Gy, 2h. **4**- 1Gy, 6h, **5**- 2 Gy, 0', **6**- 2 Gy, 2h, **7**- 2 Gy, 6h



Slika 14. Prikaz DNA stanica jetre različitih stupnjeva oštećenja detektiranih komet testom; **a**- neoštećene DNA, **b**- DNA s manjim oštećenjima, **c**- DNA s većim oštećenjima

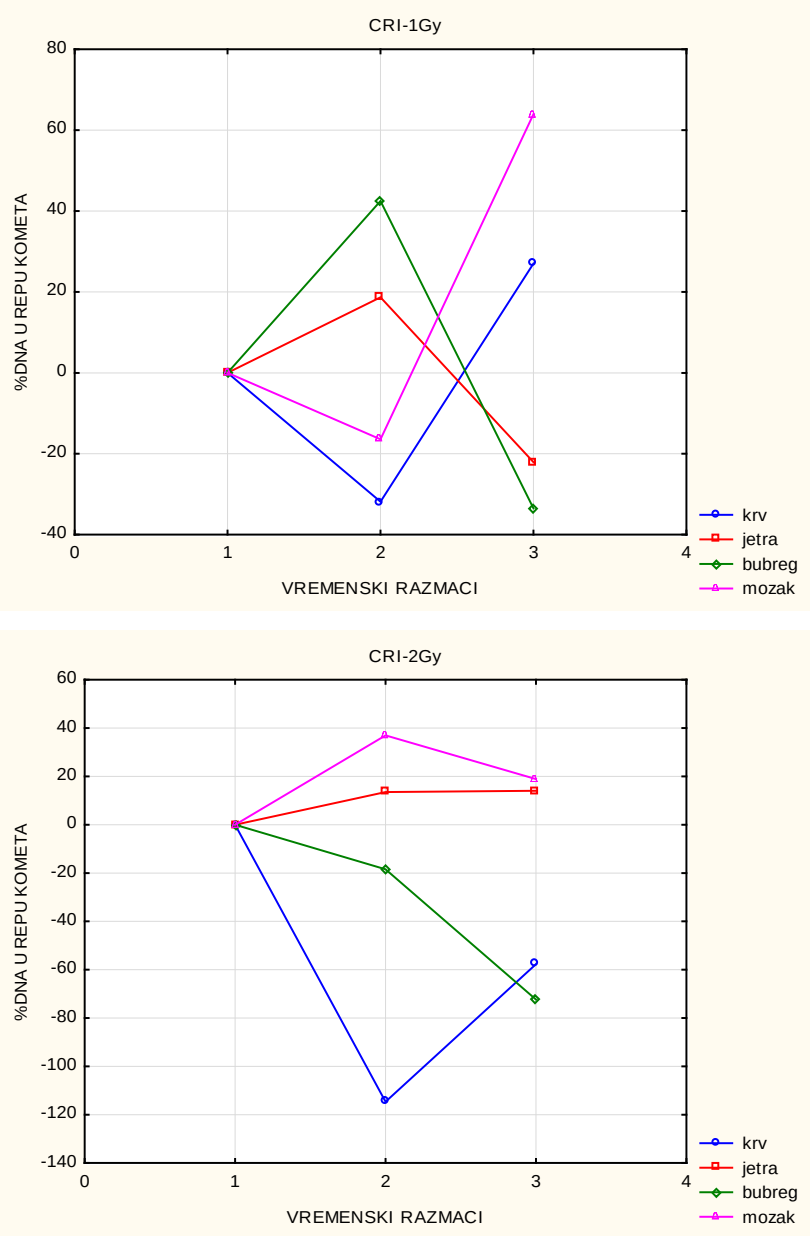
4.5. *USPOREDBA POPRAVKA PRIMARNIH OŠTEĆENJA U KRVI I RAZLIČITIM ORGANIMA*

Popravak primarnih oštećenja uvelike ovisi i o početnom oštećenju prije zračenja. Od sva tri parametra komet testa, postotak DNA u repu predstavlja najrelevantiniji parametar za promatranje popravka (Milić 2010, Collins 2004). Da bismo ispitali postoje li razlike u veličini i brzini popravka između različitih tkiva, te krvi; vrijednosti primarnih oštećenja za postotak DNA u repu kometa izražene su kao stanični indeks DNA popravka (CRI- od eng. *cellular DNA repair index*). CRI je izražen za svaki promatrani parametar komet testa kao postotak smanjenja početne vrijednosti oštećenja zbog popravka DNA prema formuli (Nair i Nair, 2010):

CRI=[1-(vrijednost komet parametra u vremenu t/ vrijednost komet parametra u početnom vremenu t0)]*100

Rezultati su pokazali zanimljive obrasce ponašanja pojedinih stanica (Slika 15.). Stanice jetre i bubrega pokazale su da 2 sata nakon ozračivanja dozom od 1 Gy još uvijek postoje stanice koje imaju oštećenja, ali 6 sati nakon ozračivanja, CRI vrijednosti imaju vrlo visok negativan predznak. Za razliku od njih, krv i mozak pokazuju da 2 sata nakon ozračivanja postoji velik broj oštećenih stanica koje se 6 sati nakon ozračivanja počinju brzo popravljati, te od početnih 0% dolaze na 27% za krv, te 63% za mozak.

Nakon ozračivanja dozom od 2 Gy, stanice krvi pokazuju i dalje isti obrazac, ali pokazuju i da 6 sati nakon ozračivanja dozom od 2 Gy nije dovoljno da bi popravak stanica došao na pozitivne vrijednosti. Stanice bubrega su dva sata nakon ozračivanja imale manja oštećenja nego stanice krvi, ali niti 6 sati nakon ozračivanja nisu pokazale da su popravile svoja oštećenja. Mozak i jetra su pokazali da dva sata od ozračivanja još uvijek postoje neoštećene stanice, ali da se krivulja popravka počinje spuštati prema nepopravljenim stanicama.



Slika 15. CRI vrijednosti za krv i organe nakon ozračivanja dozama od 1 i 2 Gy u različitim vremenskim razmacima: **1**- nulto vrijeme, **2**- 2h nakon izlaganja ionizirajućem, zračenju, **3**- 6h nakon izlaganja ionizirajućem zračenju

5. RASPRAVA

Sve učestalija izloženost ljudi ionizirajućem zračenju, profesionalno, tijekom primjene dijagnostičkih i terapijskih postupaka ili slučajno prilikom nesreća na radnim mjestima u čijim se procesima rabe izvori zračenja, osim razmatranja alternativnih metoda zahtijeva i pomnije promišljanje o potencijalnoj zaštiti pojedinaca tijekom takvih postupaka i upotrebi novih metoda za procjenu nastalih oštećenja. Sve veća izloženost niskim dozama ionizirajućeg zračenja i nedovoljno poznavanje učinaka takve izloženosti predstavlja područje od velikog interesa za znanstveno istraživanje. Promatranje učinka IR-a na animalnim modelima može poslužiti za procjenu nastalih oštećenja u humanom organizmu. Jedan od animalnih modela, koji pokazuju sličnost s imunološkim sustavom i imunološkim odgovorom ljudi su i Swiss albino miševi. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti vrijednosti i brzinu popravka primarnih oštećenja DNA u stanicama mozga, jetre i bubrega te leukocitima, kod Swiss albino soja miševa metodom komet testa i utvrditi postoje li razlike u osjetljivosti na samu izloženost odmah nakon ozračivanja, 2 sata nakon i 6 sati nakon ozračivanja dozama od 1 i 2 Gy. Doze korištene u ovom istraživanju smatraju se dijagnostički relevantim dozama te su različita istraživanja potvrdila njihovu kvalitativnu i kvantitativnu značajnost u odnosu na niže doze. Proučavajući utjecaj zračenja na embrionalne stanice miša u različitim početnim fazama razvoja (32 do 64-stanični embriji), Müller i sur. (1994) zaključili su da je granična doza za detekciju oštećenja izazvanih zračenjem iznosila oko 1 Gy. Krivulje preživljavanja u ovisnosti o dozi zračenja iznimno su strme, pa se stoga pri promjeni doze od otprilike 2 Gy pri ozračivanju cijeloga tijela (TBI, od eng. *total body irradiation*) preživljavanje životinja mijenja s početnih 37% na čak 87% (McBride i sur. 2004).

Osim odgovarajućeg modela, potrebno je imati i odgovarajuću tehniku za procjenu koja bi bila dovoljno osjetljiva za procjenu oštećenja u različitim organima animalnog modela. Genotoksičnost u stanicama s mitotskom aktivnošću (dakle, kod stanica koje se dijele) može se pratiti standardnim citogenetskim metodama, kao što su mikronukleus test, kromosomske aberacije ili izmjena sestrinskih kromatida (Patel i sur. 2006). No, genotoksičnost u organima ne može se mjeriti ovakvim metodama, pogotovo kod organa koji nemaju mitotski aktivne stanice, pa su Tsuda i sur. (1998) predložili korištenje alkalne verzije komet testa za procjenu genotoksičnosti više različitih organa na modelu miša.

Izloženost ionizirajućem zračenju pokazuje trenutne i direktne učinke i posljedična oštećenja na različite stanične komponente. No, ipak indirektni učinci izlaganja uzrokuju najveći dio DNA oštećenja. Iako nakon izlaganja većim dozama ozračivanja dolazi do

stanične smrti ili popravka oštećene DNA što se očituje promjenama u staničnom ciklusu, ponekad se signali oštećenja mogu ignorirati i oštećene stanice se mogu nastaviti dijeliti (Oka i sur. 2011). Oštećenja nastala nakon izloženosti gama ili X-zračenju su većinom jednolančani lomovi (90 %), dok samo mali dio oštećenja čine dvolančani lomovi (10 %) (Cornetta i sur., 2006). Iako se jednolančani lomovi se ne smatraju štetnima u tolikoj mjeri kao dvostruki lomovi, oni su citotoksični i blokiraju replikaciju i transkripciju

Dva najvažnija stanična mehanizma obrane i popravka DNA oštećenja u ozračenim stanicama su aktivirani antioksidativni sustavi te mehanizmi popravka DNA (Zheng i sur. 2008, Sharma i Sisodia 2009). Antioksidacijski enzimi Cu i Zn-superoksid dismutaze te Mn-superoksid dismutaze (SOD), glutation-peroksidaza (GPx) i katalaza (CAT) se smatraju temeljnim markerima oksidativnog stresa u tkivima. Uz koncentracije ovih enzima često se mjeri i količina malondialdehida (MDA), produkta lipidne peroksidacije.

Antioksidacijski enzimi su u različitim organima prisutni u različitim količinama i njihova ekspresija varira ovisno o promatranome organu pri istim izvorima i uvjetima oštećenja. Primjerice, pri administraciji tetrakloruglјika primjećena je povećana aktivnost katalaze u jetri dok su aktivnosti SOD i GPx ostale nepromijenjene. Nasuprot jetri, aktivnost GPx je bila povećana u mozgu i bubrezima, dok je aktivnost CAT i SOD bila smanjena (Szymonik-Lesiuk 2003). Istraživanjem značajnosti GPx za pojedine organe Brigelius-Flohé (1999) je zaključila da su enzimi glutation-peroksidaznog sistema u najmanjoj koncentraciji prisutni u jetri, bubrezima i plućima dok su u najvećoj koncentraciji prisutni u mozgu, pri čemu je glutation peroksidaza nađena u značajno većoj koncentraciji nego u ostalim organima. Prema koncentraciji GPx nakon mozga slijede vrlo radioosjetljivi i vijabilni organi poput testisa i timusa. Katalaza je prisutna u svim organima, no u različitim koncentracijama. Istraživanje provedeno kako bi se ustanovila aktivnost katalaze i SOD u organima sisavaca pokazalo je da, iako postoje značajne razlike u istim organima čak i između taksonomski bliskih vrsta (Sani 2006), generalno najveća aktivnost ovih enzima nalazi se u jetri (Ilyukha 2001).Ukupna koncentracija katalaze u mozgu je niska u odnosu na druge promatrane organe, no ona je raspoređena selektivno, uglavnom u neuronima (Zimatkin i Lindros 1996).

Jedan od često korištenih i vrlo korisnih pokazatelja oštećenja pri ozračivanju cijeloga tijela su leukociti (IAEA 2001). Broj leukocita rapidno pada nakon izloženosti ionizirajućem zračenju (Benković i sur. 2009, Maks i sur. 2011) najviše zbog brzog raspada limfocita u perifernoj krvi koji su najviše radioosjetljivi u miševa (Samarth i sur. 2001, Sancheti i Goyal 2007).

Usporedbom ponašanja ljudskih i mišjih leukocita utvrđeno je gotovo linerano povećanje oštećenja u ovisnosti o dozi ozračivanja do doze od 4 Gy, pri kojoj dolazi do zasićenja kod mišjih leukocita te se oni smatraju radioosjetljivijima od ljudskih (Chaubey 2001). Oštećenja nađena u leukocita u ovome istraživanju pokazuju ovisnost o dozi zračenja i slažu se s drugim provedenim istraživanjima: najveća oštećenja primijećena su neposredno nakon ozračivanja nakon čega slijedi popravak kao funkcija vremena (Maurya i sur. 2005, Mozdarani i sur. 2007, Jayakumar i sur. 2011). Kinetiku popravka perifernih leukocita proučavali su Mendiola-Cruz i Morales-Ramírez (1999) pri čemu je potvrđeno postojanje latentnog perioda popravka oštećene DNA, odnosno trend rasta broja kometa 25 minuta nakon ozračivanja.

Jetra je primarni organ u metabolizmu toksičnih tvari. Ona igra ključnu ulogu u detoksifikaciji organizma. Bilo kakvo oštećenje ovog organa može stvoriti ozbiljne poremećaje koji mogu uzrokovati različite forme histopatoloških i biokemijskih lezija (Soyal i sur. 2007). Iako su izolirani primarni hepatociti relativno otporni na razorne efekte ionizirajućeg zračenja, međustanične interakcije različitih staničnih sustava u jetri imaju glavnu ulogu u razvoju jetrenih bolesti uzrokovanih kao posljedicu izloženosti ionizirajućem zračenju (Christiansen i sur. 2006, Christiansen i sur. 2007). Nakon izloženosti ionizirajućem zračenju, u jetri se stvaraju različite lezije kao što su razorena hepatička arhitektura, oštećene jezgre, citoplazmatska granulacija, vakuolizacija i stvaranje Kupfferovih stanica (Soyal i sur. 2007). Ove nuklearne i citoplazmatske promjene mogu biti posljedica lipidne peroksidacije i destrukcije proteina, DNA, citoskeleta i organela. Slobodni radikali nastali nakon izlaganja IR-u, pogotovo stvoreni hidroksilni radikal (OH•) napadaju poluzasićene masne kiseline u staničnoj membrani i stvaraju visoko reaktivne radikale kao što su lipidni hidroperoksidni radikali te lipidni hidroperoksidi koji oštećuju staničnu membranu (Sharma i Kumar 1997; Shimoi i sur. 1996). Uspoređujući popravak jednostrukih lomova hepatocita i leukocita pri različitim dozama zračenja i fazama popravka, Pinchiera i sur. (2008) su zaključili da hepatociti brži i efikasniji dosežući vrijednosti konstitutivnog oštećenja 2 sata nakon ozračivanja dozom od 1 Gy, iako je frekvencija oštećenja neposredno nakon ozračivanja bila podjednaka kod oba tipa stanica.

Oštećenja nađena u stanicama bubrega, kao i u stanicama jetre mogu biti posljedica stvaranja slobodnih radikala koji svojim djelovanjem uzrokuju oštećenja u jetri i bubregu (Kale i sur. 1999). Uspoređujući odgovor jetre i bubrega na x-zračenje praćenjem promjene koncentracije metalotioneina, još jednog od indikatora oksidativnog stresa, Shiraishi i sur. (1986) su utvrdili su trostruko povećanje koncentracije metalotioneina u jetri već nakon 6 sati

od ozračivanja, dok se povećanje koncentracije u bubregu moglo utvrditi tek nakon 12 sati, a nakon 24 sata je koncentracija bila dvostruka u odnosu na kontrolne vrijednosti.

Razlike u odgovorima jetre i bubrega na oksidativni stres dokazali su Patra i sur. (2000) promatrajući utjecaj olova na antioksidativne mehanizme navedenih organa. Istraživanje provedeno na ozračenim bubrezima dalo je bolji uvid u obranu tkiva bubrega od nakupljanja vodikovog peroksida u stanicama, odnosno u kooperaciju katalaze i glutation peroksidaze (Kobayashi i sur. 2005).

Razlike u ekspresiji antioksidacijskih enzima nisu samo karakteristika različitih organa već su zapažene i unutar samih organa. Iako je bubreg organ koji, za razliku od ljudi, u miša pokazuje relativnu radiorezistenciju (Stewart i sur. 1989), pojedini dijelovi samog organa pokazuju različitu radioosjetljivost kao i različite odgovore na ionizirajuće zračenje (Rose 1987, Sharma i sur. 2001, Yammani i sur. 2002).

Uspoređujući radioosjetljivost korteksa i hipokampusa mozga dokazane su razlike kao i različita radioinducibilnost Mn SOD u tim regijama (Todorović i sur. 2005). Uspoređujući promjene u ekspresiji gena kao odgovor na ionizirajuće zračenje u stanica mozga i bubrega Zhao i sur. (2006) su dokumentirali su potpuno različite kvalitativne reakcije ova dva organa na oksidativni stres.

Mozak se sastoji od neurona i glija stanica; glija stanice zadržavaju sposobnost proliferacije dok se za neurone, kao diferencirane stanice, smatra da su trajno u post-mitotičkom stanju. Novija istraživanja (Gould i sur. 1999, Eriksson i sur. 1998, Sahay i sur. 2011) potvrđuju pojavu neurogeneze u pojedinim dijelovima mozga odraslih sisavaca, no neupitna je važnost mehanizama obrane od oštećenja te popravka oštećene DNA stanica mozga obzirom da u sisavaca mozak koristi do 20% ukupnog kisika (Erecińska 2001) te 25% ukupne glukoze tijela. Kulkarni i sur. (2008) istraživali su ljudske neuroblastoma stanice SH-SY5Y kako bi ustanovili razliku u oksidativnom oštećenju DNA kod mitotski aktivnih i neaktivnih stanica. Njihovo istraživanje je pokazalo generalno veću otpornost mitotski neaktivnih stanica, no također različitu ekspresiju te utjecaj enzima ovisno o agensu koji izaziva oštećenje. U radu je potvrđena uloga popravka jednostrukih lomova DNA kao jednog od najbitnijeg mehanizma uklanjanja oštećenja genoma mitotski neaktivnih stanica ali i stanica uopće. Istraživanja na mozgu su pokazala da zračenje ^{60}Co gama izvorom ima više učinka na funkciju DNA, RNA i proteina (Egana i sur. 1983). Postoji i istraživanje koje pokazuje smanjenu sintezu DNA u štakorima starima od 1 do 10 dana nakon izloženosti niskim dozama ionizirajućeg zračenja (Cerda 1983). Smanjenje količine DNA je posljedica inhibicije replikacije DNA u jezgri i akumulacije RNA. Postoji generalno slaganje

znanstvenika da je utjecaj na DNA jedan od najvažnijih učinaka nakon izlaganja zračenju. RNA koja se vjerojatno sintetizira u većoj količini u neuronima je više radiorezistentna nego DNA (Egana 1962).

Odgovor stanica mozga na vrijednosti doza zračenja u rasponu od 0,1 do 2 Gy se i kvalitativno razlikuje: pri niskim dozama došlo je do povećane ekpresije gena vezanih uz popravak i zaštitu stanica te smanjenja ekspresije gena vezanih uz neuralni signaling (Yin i sur. 2003). Navedeno zapažanje može objasniti razlike u kinetici popravka stanica mozga i ostalih promatranih stanica opažene primijenjujući CRI index u ovom istraživanju. Mitotski indeks kod Swiss albino miševa neposredno nakon zračenja dozom od 2 Gy gama zračenja bio je 32.9% (Al-Meer i sur. 2011).

Rezultati ovog istraživanja su u skladu s istraživanjima Chandrasekharan i suradnika (2009) koji su također pokazali da su nakon izlaganja miševa gama zračenju vrijednosti postotka DNA u repu, dužine repa i repnog momenta povećane u odnosu na kontrolne vrijednosti. Također, razlike u razini DNA oštećenja zamijećena u ovoj studiji slažu se s rezultatima Tomascik-Cheeseman i sur. (2004). Njihovo istraživanje na miševima korištenjem DNA microarray metode pokazalo je da te razlike mogu biti objašnjene različitom ekspresijom bazičnih količina gena koji sudjeluju u DNA popravku u različitim tkivima miša. Štoviše, pokazano je da je čak i konstitutivna ekspresija citokroma P450 (aktiviran kod oksidativnog oštećenja) različita u različitim organima kod miševa (Choudhury i sur. 2003). Pokazano je da je CYP1A1, gen koji kodira citokrom P450, maksimalno eksprimiran u slezeni, pa zatim u jetri, pa tek onda u bubregu po svojoj količini.

Izloženost niskim dozama ionizirajućeg zračenja ne utječe na sintezu proteina, ali nakon izloženosti višim dozama zračenja razina sinteze proteina se vrlo brzo smanjuje (Braunstein 2009). Smanjenje količine proteina može biti posljedica liziranja proteina gama zračenjem, smanjenja enzima uključenih u aktivaciju aminokiselina i prijenosa na tRNA ili inhibicije otpuštanja polipeptida iz polisoma. Smanjenje proteina može rezultirati povećanim stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva koji oštećuju stanicu i inciraju lipidnu peroksidaciju (Ermolazeva i sur.1967, Ivanov i Radakov 1968, Kim i sur. 2004, Gaura i Lal Bhatiab 2009). Smanjenje postotka DNA čak i 7 dana nakon zračenja, s malim porastom oko 30-tog dana nakon zračenja pronađeno je nakon ozračivanja miševa dozom od 6 Gy (Gaura i Lal Bhatiab 2009). Postoji nekoliko objašnjenja za reduciranu količinu DNA (Sit i sur. 1991). Pokazano je da nakon zračenja može doći do stanične smrti koja vodi do povećanog gubitka DNA nego što se inače eliminira iz tkiva. Odgođena interfaza ili odgođena sinteza DNA nakon zračenja može također dovesti do smanjenog sadržaja DNA (Gaura i Lal Bhatiab 2009). Smanjenje

sadržaja DNA je posljedica inhibicije replikacije u jezgri i akumulacije ribonukleotida u citoplazmi, zbog nemogućnosti stanica da reduciraju ribonukleotide u DNA u jezgri.

Patel i sur. (2006) su također koristili komet test da bi mjerili razinu oštećenja u različitim organima nakon izlaganja pesticidu. Rezultati prije tretiranja se ne mogu usporediti s našima, jer su naši rezultati za sva tri izmjerena parametra značajno manji za sve organe i krvne uzorke, jedino su oštećenja detektirana u mozgu veća nego u tom istraživanju. Razlog tome može biti korištenje drugog programa za obradu slike, ali i takvi rezultati pokazuju da je ova metoda dovoljno osjetljiva da detektira nastalo oštećenje.

Popravak oštećenja DNA ionizirajućim zračenje započinje odmah po zračenju, a može se podijeliti najčešće u dvije faze odnosno dvije komponente. Brza komponenta se uglavnom odnosi na popravljanje oštećenja koja su najbrojnija: jednostrukih lomova i izrezivanje izmijenjenih baza, dok se spora komponenta veže uz popravak mnogostrukih SSB i DSB na što upućuju podaci da je većina SSB popravljena u roku od 2 sata; nakon 24 sata su SSB potpuno popravljeni dok DSB još uvijek postoje (Calini i sur. 2002). Postoje i oprečna tumačenja po kojima se spora komponenta se veže i uz popravak manje dostupnih dijelova DNA (Wheeler i Wierowski 1983).

Alkalnim komet testom se, osim direktnih SSB, mjere i oksidativna oštećenja DNA. Djelovanjem lužine oštećena mjesta prelaze u AP mjesta i nove SSB, koji komet testom mogu biti detektirani kao oštećenja koja popravlja spora komponenta (Trzeciak i sur. 2008). Kinetika popravka oštećenja primijećena u ovom istraživanju mogla bi upućivati na veću relativnu radioosjetljivost bubrega i jetre naspram stanica mozga i leukocita obzirom da radioosjetljivije stanice pokazuju sporije stope popravka (Vanankeren i sur. 1988).

Ako se ispitivani organi i krv poslože prema stupnju nastalog oštećenja, najveće oštećenje je zabilježeno u stanicama mozga, jetre, bubrega i na kraju kod krvi. Prilikom detektiranja oštećenja i vremena potrebnog za popravak DNA uočljive su razlike između niže i više doze ozračivanja, što je u skladu s istraživanjem Neumaier i suradnika (2011). Razlike u odgovorima pojedinih tkiva i krvi mogu se objasniti različitim mehanizmima obrane od ROS-a odnosno citotoksina uopće, potvrđenih različitim koncentracijama pojedinih enzima (Mahboob i sur. 2001) kao i regulacijom ekspresije potpuno različitih setova gena među različitim tkivima (Zhao i sur. 2006) te različitim brzinama i učinkovitosti popravka SSB (Zheng 1996). Također, pri TBI treba uzeti u obzir da doze koje pojedini dijelovi tijela apsorbiraju nisu uniformne, pa tako lubanja apsorbira 44 puta veću dozu zračenja od okolne kože, a slojevi mozga na 25 cm dubine do 20% manje doze od površinskih slojeva (Werner i sur. 1986).

6. ZAKLJUČAK

1. Doze od 1 i 2 Gy ionizirajućeg zračenja mogu izazvati mjerljiva oštećenja nakon izlaganja cijelog tijela miša soja Swiss albino
2. Najveća oštećenje zabilježena su u stanicama mozga, jetre, bubrega i na kraju kod krvi
3. Rezultati ukazuju na različitu osjetljivost različitih organa koja je vjerojatno rezultat različite količine i brzine djelovanja mehanizama popravka DNA
4. Popravak primarnih oštećenja se uvelike razlikuje među organima i među obje primjenjene doze zračenja.
5. Dva sata od izlaganja dozi od 1 Gy, stanice jetre i bubrega imaju veliki postotak oštećenih stanica, a šest sati od izlaganja CRI indeks, kao pokazatelj popravka, postaje negativan. Krv i mozak pokazuju da 2 sata nakon ozračivanja postoji velik broj oštećenih stanica koje se 6 sati nakon ozračivanja počinju brzo popravljati, te od početnih 0% dolaze na 27% za krv, te 63% za mozak.
6. Nakon ozračivanja dozom od 2 Gy, stanice svih tkiva i leukociti pokazuju veća oštećenja i sporiju brzinu popravka nego pri izloženosti dozi od 1 Gy, te iako se stanice krvi, jetre i mozga u roku šest sati od zračenja počinju popravljati, taj popravak nije dovoljan da bi CRI vrijednosti došle do negativnih, popravljivih vrijednosti

7. POPIS LITERATURE

1. Acharya, P.V. (1971): The isolation and partial characterization of age-correlated oligo-deoxyribo-ribonucleotides with covalently linked aspartyl-glutamyl polypeptides. Johns Hopkins Med. J. Suppl. (1): 254–60.

2. Acharya, P.V.N. (1976): Implicatons of The Action of Low-Level Ionizing Radiation on the Inducement of Irreparable DNA Damage Leading to Mammalian Aging and Chemical Carcinogenesis. 10th International Congress of Biochemistry, Hamburg, Germany. Abstract No. 01-1-079.

3. Al-Meer, R.S., El-Habit, O.H.M, Al-Hazaa, A. A. (2011): Adaptive response to ionizing radiation and the role of vitamin B12 in amelioration radiation protection standards, Journal of King Saud University – Science **23**: 197–204.

4. An, J.H., Kim, J., Seong, J. (2004): Redox signaling by ionizing radiation in mouse liver. Ann. N. Y. Acad. Sci. **1030**: 86-94.

5. Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P.A., Browne, M.A. (1994): The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. Mutagenesis **10** (2): 85-90.

6. Baden, J. M., Brodsky, J. B. (1985): The Pregnant surgical patient. Futura, London.

7. Benković, V., Horvat Knežević, A., Đikić, D., Lisičić, D., Oršolić, N., Bašić, I., Kopjar, N. (2009): Radioprotective Effects of Quercetin and Ethanolic Extract of Propolis in Gamma-Irradiated Mice. Arh. Hig. Rada Toksikol. **60** (2): 129-138.

8. Best, B.P. (2009): Nuclear DNA damage as a direct cause of aging. Rejuvenation Res. **12** (3): 199–208.

9. Betti, C., Davini, T., Gianessi, L., Loprieno, N., Barale, R. (1994): Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. Mutat. Res. **307**: 323-333.

10. Bjorksten, J., Acharya, P.V., Ashman, S., Wetlaufer, D.B. (1971): Gerogenic fractions in the tritiated rat. J. Am. Geriatr. Soc. **19** (7): 561–574.

11. Braunstein, S., Badura, M.L., Xi, Q., Formenti, S.C., Schneider, R.J. (2009): Regulation of protein synthesis by ionizing radiation. Mol. Cell Biol. **29** (21): 5645–5656.

12. Brenner, D.J. and Elliston, C.D. (2004) Estimated Radiation Risks Potentially Associated with Full Body CT Screening. Radiology **232**: 735–738.

13. Brenner, D.J., Doll, R., Goodhead, D.T., Hall, E.J., Land, C.E., Little, J.B., Lubin, J.H., Preston, D.L., Preston, R.J., Puskin, J.S., Ron, E., Sachs, R.K., Samet, J.M., Setlow, R.B., Zaider, M. (2003): Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**: 137-161.

14. Brigelius-Flohé, R. (1999): Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radic. Biol. Med. **27**(9-10): 951–965.

15. Browner, W.S., Kahn, A.J., Ziv, E., Reiner, A.P., Oshima, J., Cawtho, R.M., Hsueh, W.C., Cummings, S.R. (2004): The genetics of human longevity. Am. J. Med. **117** (11): 851–860.

16. Calini, V., Urani, C., Camatini, M. (2002): Comet assay evaluation of DNA single- and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells. Cell Biol. Toxicol..**18** (6): 369-379.

17. Cerda, H. (1983): Effects of low doses of gamma radiation on DNAsynthesis in the developing rat brain. Acta. Radiol. Oncol. **3**: 233-239.

18. Chandrasekharan, D. K., Kagiya, T. V., Nair, C. K. K. (2009): Radiation Protection by 6-Palmitoyl Ascorbic Acid-2-Glucoside:Studies on DNA Damage in vitro, ex vivo, in vivoand Oxidative Stress in vivo. J. Radiat. Res. **50**: 203–212.

19. Chaubey, R.C., Bhilwade, H.N., Rajagopalan, R., Bannur, S. V. (2001):Gamma ray induced DNA damage in human and mouse leucocytes measured by SCGE-Pro: a software developed for automated image analysis and data processing for Comet assay. Mutat. Res. **490** (2): 187-197.

20. Choudhury, D., Jansson, I.,. Schenkman, J.B, Sarfarazi, M., Stoilov, I. (2003): Comparative expression profiling of 40-mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. Arch. Biochem. Biophys. **414**: 91–100.

21. Christiansen, H., Batusic, D., Saile, B., Hermann, R.M., Dudas, J., Rave- Frank, M., Hess, C.F., Schmidberger, H., Ramadori, G. (2006): Identification of genes responsive to gamma radiation in rat hepatocytes and rat liver by cDNA array gene expression analysis. Radiat. Res. **165** (3): 318-325.

22. Christiansen, H., Sheikh, N., Saile, B., Reuter, F., Rave-Fränk, M., Herman, R.M., Dudas, J., Hille, A., Hess, C.F., Ramadori, G. (2007): X-irradiation in rat liver: consequent upregulation of hepcidin, downregulation of hemojuvelin, ferroportin-1 gene expression. Radiology **242** (1): 189–196.

23. Collins, A.R. (2004): The Comet Assay for DNA damage and repair: Principles, applications and limitations. Mol. Biotechnol. **26**: 249-261.

24. Cornetta, T., Festa, F., Testa, A., Cozzi, R. (2006): DNA damage repair and genetic polimorphisms: assessment of indivisual sensitivity and repair capacity. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **66** (2): 537-545.

25. Egana, E. (1962): Some effects of ionizing radiations on the metabolism of the neuron system. Ind. J. Neurol. **3**: 631-647.

26. Egana, E., Liona, I., Ramimirej, M.T. (1983): Effect of whole body gamma radiation in DNA, RNA and protein function in developing CNS. Proc. VII Int. Cong. Radiat. Res. 1-7.

27. Erecińska, M., Silver, I.A. (2001): Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. Respir. Physiol.**128** (3): 263–276.

28. Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M. , Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H. (1998): Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat. Med. **4** (11): 1313–1317.

29. Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M. , Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H. (1998): Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat. Med.**4** (11): 1313–1317.

30. Ermolazeva, N.V. (1967): Enzymic degradation of deoxyribonuleoprotein (DRNP) isolated from tissue of normal and after X-irradiation. Biokhimua **32**, 639.

31. Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neil, K.L. (1995): The comet assay: a comprehensive rewiev. Mutat. Res.**339**: 37-59.

32. Frank, M., Hess, C.F., Schmidberger, H., Ramadori, G. (2006): Identification of genes responsive to gamma radiation in rat hepatocytes, rat liver by cDNA array gene expression analysis. Radiat. Res. **165**: 318–325.

33. Frankenberg-Schwager, M. (1989) Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. Radiother. Oncol. **14**: 307-320.

34. Fridovich, I. (1995): Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem. **64**: 97–112.

35. Friedberg, E.C. (2003): DNA damage and repair. Nature **421**: 436- 440.

36. Gaura, A., Lal Bhatiab, A. (2009): Effects of radiation on the protein and dna content in genistein treated swiss albino mice. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences **5** (4): 239-248.

37. Gonzalez, A.B.,Darby, S. (2004:) Risk of Cancer from Diagnostic X rays, Estimate for UK and 14 Other Countries. Lancet **363**: 345–351.

38. Gould, E., Reeves A.J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross C.G., Fuchs E. (1999): Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96** (9): 5263–5267.

39. Gould, E., Reeves A.J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross C.G., Fuchs E. (1999): Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96** (9): 5263–5267.

40. Hall, E.J., Giaccia, A.J. (2006): Radiobiology for the Radiologist. 6th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

41. Hebrang A., Lovrenčić M. (2001): Radiologija. Medicinska naklada, Zagreb.

42. Hellman B, Vaghef H, Boström B. (1995): The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. Mutat. Res. **336** (2): 123-131.

43. Hellman B, Vaghef H, Friis L, Edling C. (1997): Alkaline single cell gel electrophoresis of DNA fragments in biomonitoring for genotoxicity: an introductory study on healthy human volunteers. Int. Arch. Occup. Environ. Health. **69** (3):185-192.

44. IAEA, 2001: Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. Technical Report Series 405.

45. Ilyukha, V. A. (2001): Superoxide Dismutase and Catalase in the Organs of Mammals of Different Ecogenesis. J. Evol.Biochem. Physiol. **37** (3): 241-245.

46. Ivanov, I.I., Radakov, V.V. (1968): Effects of whole body gamma-rays irradiation on tissue protein synthesis. Bull. Expt. Biol. Med. **66**: 1340.

47. Jayakumar, S., Bhilwade, H.N., Dange P.S., Sarma H.D, Chaubey R.C., Pandey B.N. (2011): Magnitude of radiation-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes and its correlation with aggressiveness of thymic lymphoma in Swiss mice. Int. J. Radiat. Biol. **87** (11): 1113-1119.

48. Jeggo, P., Lavin, M.F. (2009) Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it? Int. J. Radiat. Biol. **85**: 1061-1081.

49. Kale, M., Rathore, N., John, S., Bhatnagar, D. (1999): Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues in pyrethroid toxicity: possible involvement of reactive oxygen species. J. Nutr. Environ. Med. **9**: 37–46.

50. Kassie, F., Parzefall, W., Knasmüller, S. (2000): Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. Mutat. Res. **463** (1): 13-31.

51. Kim, S.T., Kim, J.D., Ahn, S.H., Ahn, G.S., Lee, Y.I., Jeong, Y.S. (2004): Hepatoprotective and antioxidant effects of Alnus japonica extracts on acetaminophen-induced epatotoxicity in rats. Phytother. Res. **18**: 971-975.

52. Kobayashi, M., Sugiyama, H., Wang, D.H., Toda, N., Maeshima, Y., Yamasaki, Y., Masuoka, N., Yamada, M., Kira, S., Makino, H. (2005): Catalase deficiency renders

remnant kidneys more susceptible to oxidant tissue injury and renal fibrosis in mice. Kidney Int. **68**: 1018–1031.

53. Kruszewski, M., Wojewódzka, M., Iwanenko, T., Collins, A.R., Szumiel, I. (1998): Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation: II. Base damage. Mutat. Res. **416** (1-2): 37-57.

54. Kulkarni, A., McNeill, D.R., Gleichmann, M., Mattson, M.P.,Wilson, D.M. III (2008): XRCC1 protects against the lethality of induced oxidative DNA damage in nondividing neural cells. Nucleic Acids Res. **36** (15): 5111-5121.

55. Mahboob, M., Shireen, K.F., Atkinson, A., Khan, A.T. (2001): Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. J. Environ. Sci. Health B. **36** (5): 687-697.

56. Maks, C.J., Wan, X.S., Ware, J.H., Romero-Weaver, A.L., Sanzari, J.K., Wilson, J.M., Rightnar, S., Wroe, A.J., Koss, P., Gridley, D.S., Slater, J.M. ,Kennedy, A.R. (2011): Analysis of white blood cell counts in mice after gamma- or proton-radiation exposure. Radiat. Res. **176** (2): 170-176.

57. Maurya, D.K., Salvi, V.P., Nair, C.K. (2005): Radiation protection of DNA by ferulic acid under in vitro and in vivo conditions. Mol. Cell. Biochem. **280** (1-2): 209-217.

58. McBride, W.H., Chiang, C.S., Olson, J.L., Wang, C.C., Hong, J.H., Pajonk, F., Dougherty, G.J., Iwamoto, K.S., Pervan, M., Liao, Y.P. (2004): A sense of danger from radiation. Radiat. Res.**162**: 1–19.

59. McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Méo, M.P., Collins, A. (1993): The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. Mutat. Res. **288** (1): 47-63.

60. McKelvey-Martin, V.J., Ho, E.T.S., McKeown, S.R., Johnston, S.R., McCarthy, P.J., Rajab, N.F., Downes, C.S. (1998): Emerging applications of the single cell gelelectrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitionalcell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. Mutagenesis **13** (1): 1–8.

61. Mendiola-Cruz, M.T., Morales-Ramírez, P. (1999): Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined by the single cell gel electrophoresis assay in murine leukocytes in vivo. Mutat. Res. **433** (1): 45–52.

62. Milić, M. (2010): Važnost individualne osjetljivosti za procjenu rizika od oštećenja genoma pri kroničnoj profesionalnoj izloženosti niskim dozama ionizirajućeg zračenja. Doktorska disertacija. Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

63. Morgan, W.F. (2003): Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: ii. radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. Radiat. Res. **159**: 581–596.

64. Mozdarani, H., Nasirian, B., Haeri, S.A. (2007): In vivo gamma γ-rays induced initial DNA damage and the effect of famotidine in mouse leukocytes as assayed by the alkaline comet assay. J. Radiat. Res. (Tokyo) **48**: 129-134.

65. Müller, W.U., Bauch, T., Streffer, C., Niedereichholz, F., Böcker, W. (1994): Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. Int. J. Radiat. Biol. **65** (3): 315-319.

66. Nair, G.G., Nair, C.K.K. (2010): Protection of Cellular DNA and Membrane from g-Radiation–Induced Damages and Enhancement in DNA Repair by Sesamol. Cancer Biother. Radiopharm. **25** (6): 629-635.

67. Neumaier, T., Swenson, J., Pham, C., Polyzos, A., Lo, A.T., Yang, P.A., Dyball, J., Asaithamby, A., Chen, D.J., Bissell, M. J., Thalhammer, S., Costes, S. V. (2011): Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **109** (2): 443-448.

68. Oka, Y., Yamauchi, M., Suzuki, M., Yamashita, S., Suzuki, K. (2011): Persistence and Dynamics of DNA Damage SignalAmplification Determined by Microcolony Formation and Live-cell Imaging. J. Radiat. Res. **52**: 766–774.

69. Olive, P.L. (1999): DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. Int. J. Radiat. Biol. **75** (4): 395-405.

70. Olive, P.L., Banáth J.P., Durand R.E. (1990): Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet assay". Radiat. Res. **122**: 86-94.

71. Patel, S., Pandey, A.K., Bajpayee, M., Parmar, D., Dhawan, A. (2006): Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: Evidence from the comet assay. Mutat. Res. **607**: 176–183.

72. Patra, R.C., Swarup, D., Dwivedi, S. K. (2000): Antioxidant defense and lipid peroxide level in liver and kidneys of lead exposed rats. Asian-australas. j. anim. sci. **13** (10): 1433-1439.

73. Pierce, D.A., Preston D.L. (2000): Radiation-related cancer risks at low doses among atomic bomb survivors. Radiat. Res. **154**: 178– 186.

74. Pincheira, J., Carrera, P., Marcelain, K., De La Torre, C. (2008): Hepatocytes, rather than leukocytes reverse DNA damage in vivo induced by whole body y-irradiation of mice, as shown by the alkaline comet assay. Biol. Res. **41**: 217-225.

75. Plappert U.G., Stocker B., Fender H., Fliedner T.M. (1997): Changes in the repair capacity of blood cells as a biomarker for chronic low-dose exposure to ionizing radiation. Environ. Mol. Mutagen **30** (2): 153-160.

76. Plappert, U., Raddatz, K., Roth, S., Fliedner, T.M. (1995): DNA damage detection in man after radiation exposure-the comet assay-its possible application for human monitoring. Stem Cells **13** (1): 215-222.

77. Prise, K.M., Schettino, G., Folkard, M., Held, K.D. (2005): New insights on cell death from radiation exposure. Lancet Oncol. **6**: 520–528.

78. Rose, B.D. (1987): Pathophysiology of renal disease. McGraw-Hill Professional, New York.

79. Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'Carroll, C. M. Kheirbek, M. A., Burghardt, N.S., Fenton, A. A., Dranovsky, A., Hen R. (2011): Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. Nature **472**: 466–470.

80. Samarth, R.M., Goyal, P.K., Kumar, A. (2001): Radioprotective effects of Mentha Piperita. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences **22-23**: 91- 97.

81. Sancheti, G., Goyal, P. K. (2007): Prevention of radiation induced hematological alterations by medicinal plant Rosmarinus Officinalis in mice. Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med. **4** (2): 165–172.

82. Sandeep, D., Nair, C.K.K. (2010): Protection from lethal and sub-lethal whole body exposures of mice to γ -radiation by Acorus calamus L.: Studies on tissue antioxidant status and cellular DNA damage. Exp. Toxicol. Pathol. **64** (1-2): 57-64.

83. Sani, M., Sebaï, H., Gadacha, W., Boughattas, N.A., Reinberg, A., Mossadok, B.A. (2006): Catalase activity and rhythmic patterns in mouse brain, kidney and liver. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. **145** (3-4): 331-337.

84. Sharma KV, Sisodia R. (2009): Evaluation of the free radical scavenging activity and radioprotective efficacy of Grewia asiatica fruit. J. Radiol. Prot. **29** (3): 429-43.

85. Sharma, M., Sharma, R., Ge, X.L., Fish, B.L., McCarthy, E.T., Savin, V.J., Cohen, E.P., Moulder, J.E. (2001): Early detection of radiation-induced glomerular injury by albumin permeability assay. Rad. Res.**155**: 474–480.

86. Sharma, S., Kumar, A. (1997): Histopathological lesions caused by |β|-irradiation in liver of Swiss albino mice. Adv. Bios. **16**: 49-56.

87. Shimoi, K., Masuda, S., Shan, B., Furugori, M., Kinae, N. (1996): Radioprotective effect of antioxidative plant flavonoids in mice. Mutat. Res. **35**0: 153-161.

88. Shiraishi, N., Yamamoto, H., Takeda, Y., Kondoh, S., Hayashi, H., Hashimoto, K., Aono, K. (1986): Increased metallothionein content in rat liver and kidney following X-irradiation. Toxicol. Appl. Pharmacol. **85** (2): 128-134.

89. Singh N.P., Mc Coy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988): A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. Exp. Cell Res. **175**: 184-191.

90. Sit, K.H., Wong, K.P., Bay, B.H.(1991): Effects of genistein on ATP induced DNA synthesis and intracellular alkalinization in chang liver cells. Japan J. Pharmacol. **57**: 109-111.

91. Soyal D., Jindal A., Singh I., Goyal P.K. (2007): Protective capacity of Rosemary extract against radiation induced hepatic injury in mice. J. Radiat. Res. **4** (4): 161-168.

92. Stewart, F.A., Luts, A., Lebesque, J.V. (1989): The lack of long-term recovery and reirradiation tolerance in the mouse kidney. Int. J. Radiat. Biol. **56**: 449–462.

93. Szymonik-Lesiuk, S., Czechowska, G., Stryjecka-Zimmer, M., Słomka, M., Madro, A., Celiński, K., Wielosz, M. (2003): Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. **10** (4): 309-315.

94. Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlison, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C, Sasak, Y.F.. (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and an in vivo genetic toxicological testing. Environ. Mol. Mutagen. **35**: 206–222.

95. Todorović, A., Kasapović, J., Pejić, S., Stojiljković, V., Pajović, S.B. (2005): Antioxidant radiation response of rat brain after exposure to a clinical dose of γ-rays. Arch. Biol. Sci. **57** (4): 273-275.

96. Tomascik-Cheeseman, L.M.,. Coleman, M.A, Marchetti, F., Nelson, D.O., Kegelmeyer, L.M., Nath, J., Wyrobek, A.J. (2004): Differential basal expression of genes associated with stress response, damage control, and DNA repair among mouse tissues. Mutat. Res. **561**: 1-14.

97. Trzeciak, A.R., Barnes, J., Ejiogu, N., Foster, K., Brant, L.J., Zonderman, A.B., Evans, M.K. (2008): Age, sex, and race in!uence single-strand break repair capacity in a human population. Free Radic. Biol. Med. **45** (12): 1631–1641.

98. Tsuda, S., Kosaka, Y., Murakami, M., Matsuo, H., Matsusaka, N., Taniguchi, K., Sasaki, Y.F. (1998): Detection of nivalenol genotoxicityin cultured cells and multiple mouse organs by the alkaline single-cell gel electrophoresis assay. Mutat. Res. **415**: 191–200.

99. Vanankeren, S. C. , Murray, D. , Meyn, R. E. (1988): Induction and Rejoining of γ-Ray-Induced DNA Single- and Double-Strand Breaks in Chinese Hamster AA8 Cells and in Two Radiosensitive Clones. Radiat. Res. **116** (3): 511-525.

100. Vijayalaxmi, Reiter, R.J., Tan, D.X., Herman, T.S., Thomas, J.R.C.R. (2004): Melatonin as a radioprotective agent: A review. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **56**: 639-653.

101. Werner A., Modan B., Davidoff D.(1968): Doses to brain, skull and thyroid, following x-ray therapy for Tinea capitis. Phys. Med. Biol.**13** (2): 247–258.

102. Wheeler, K. T., Wierowski J. V. (1983): DNA repair kinetics in irradiated undifferentiated and terminally differentiated cells. Radiat. Environ. Biophys. **22** (1): 3-19.

103. Wojewódzka M, Buraczewska I, Kruszewski M. (2002): A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. Mutat. Res. **518** (1): 9-20.

104. Yammani, R.R., Sharma, M., Seetharam, S., Moulder, J.E., Seetharam, B. (2002): Loss of albumin and megalin binding to renal cubilin results in albuminuria in rats exposed to total body irradiation. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **283** (2): 339–346.

105. Yin, E., Nelson, D.O., Coleman, M.A., Peterson, L.E., Wyrobek, A.J. (2003): Gene expression changes in mouse brain after exposure to low dose ionizing radiation. Int. J. Radiat. Biol. **79** (10): 759-775.

106. Zhao, W., Chuang, E.Y., Mishra, M., Awwad, R., Bisht, K., Sun, L., Nguyen, P., Pennington, J.D., Wang, T.J,. Bradbury, C.M., Huang, L., Chen, Z., Bar-Sela, G., Robbins, M.E., Gius, D. (2006): Distinct Effects of Ionizing Radiation on In vivo Murine Kidney and Brain Normal Tissue Gene Expression. Clin. Cancer Res. **12** (12): 3823-3830.

107. Zheng, H. (1996): Radiation-induced DNA single-strand break induction and repair in murine tissues measured by the comet assay. MSc Thesis. University of British Columbia.

108. Zheng, H., Chen, Z.W., Wang, L., Wang, S.Y., Yan, Y.Q., Wu, K., Xu, Q.Z., Zhang, S.M., Zhou, P.K. (2008): Radioprotection of 3-hydroxy-3, 5-dimethoxybenzaldehide (VND3207) inculture cells is associatedwith minimizing DNA damage and activating. Akt. Europ. J. Pharm. Sci. **33**: 52–59.

109. Zimatkin, S.M., Lindros, K.O. (1996): Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. Alcohol Alcohol. **31** (2): 167-74.