



**UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET**

mr Jasmin Adrović

**CITOGENETIČKA ANALIZA UTICAJA
KONCENTRACIJE AKTIVNOSTI RADONA U VODI
NA MERISTEMSKE ĆELIJE LUKA (*ALLIUM CEPA* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2021.



**UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF NATURAL SCIENCES AND MATHEMATICS**

mr Jasmin Adrovic

**CYTOGENETIC ANALYSIS OF THE INFLUENCE
OF RADON ACTIVITY CONCENTRATION IN WATER
ON MERISTEMATIC CELLS OF ONION (*ALLIUM CEPA* L.)**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2021.

INFORMACIJE O MENTORIMA I DOKTORSKOJ DISERTACIJI

Mentori:

prof. dr. Izet Eminović, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu, uža naučna oblast: „Biomedicina“ i „Genetika“.

prof. dr. Stojko Vidović, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, uža naučna oblast: „Biohemija“ i „Molekularna biologija“.

Naslov doktorske disertacije:

Citogenetička analiza uticaja koncentracije aktivnosti radona u vodi na meristemske ćelije luka (*Allium cepa* L.)

Rezime: U ovoj disertaciji izvršena su originalna citotoksikološka i genotoksikološka istraživanja uticaja koncentracije aktivnosti radona u vodi, na meristemske ćelije test organizma *Allium cepa* L. Za procjenu hromozomskih aberacija i poremećaja u mitotičkom ciklusu, korišten je *Allium* test, jedna je od rijetkih direktnih metoda za mjerenje citogenetskih oštećenja u bološkim sistemima, prvenstveno zbog njegove osjetljivosti i dobre povezanosti s test organizmima sisara. Za pouzdano sagledavanje bioloških efekata jonizirajućeg zračenja koji dolaze od radona u vodi, potrebno je bilo adaptirati proces eksponiranja uzoraka ovog test organizama, u skladu sa migrativnim potencijalom radioaktivnog gasa radona. Meristemske ćelije korijena *Allium cepa* L. tretirane su serijom od 10 koncentracija aktivnosti radona u vodi, u rasponu od 100.62 do 1,006.25 Bq/L. Studije genotoksičnosti uključivale su mjerenje mitotskog indeksa (*MI*), hromozomskih aberacija (*CA*) i nuklearnih abnormalnosti (*NA*) u apikalnim meristemskim ćelijama korijena *Allium cepa* L. Pokazano je da sve aplicirane koncentracije aktivnosti radona u vodi, mogu na ovom test organizmu izazvati klastogene i aneugene efekte (uključujući poremećaje mitoze i citokineze). Povećanje koncentracije aktivnosti radona u vodi, izazvalo je povećanu inhibiciju rasta korijena, smanjenje mitotičkog indeksa (*MI*), i značajno povećanje broja aberantnih ćelija, u tretiranim meristemskim ćelijama *Allium cepa* L. Iz širokog spektra uočenih hromozomskih aberacija (*CA*) i nuklearnih promjena na meristemskim ćelijama, najveću frekvenciju pojavljivanja imali su: poliploidija, ljepljivi hromosomi, C-mitoza, hromozomski mostovi, mikronukleusi, nepravilne segregacije hromozoma, multipolarnost hromozoma, nekroza, apoptoza, binuklearne ćelije. Sporadično su uočene trinuklearne i tetranuklearne ćelije, kao i lutajući hromozomi. Istraživanja u ovoj disertaciji dade prepoznatljiv doprinos naučnoj literaturi, o efektima koncentracije aktivnosti radona u vodi na biološke sisteme.

Ključne riječi: *Allium* test, koncentracija aktivnosti radona u vodi, hromozomske aberacije, citotoksičnost, genotoksičnost.

Naučna oblast: Prirodne nauke

Naučno polje: Biološke nauke

Klasifikaciona oznaka za naučnu oblast prema CERIF šifrarniku: B 220; B 145

Tip odabrane licence Kreativne zajednice: Autorstvo - nekomercijalizovano (CC BY-NC)

THE INFORMATION ABOUT THE MENTORS AND THE DOCTORAL DISSERTATION

Mentors:

prof. dr. Izet Eminović, full professor, Faculty of Natural Sciences and Mathematics,
University of Sarajevo, narrow scientific field: „Biomedicine ” and „Genetics”.

prof. dr. Stojko Vidović, full professor, Faculty of Natural Sciences and Mathematics,
University of Banja Luka, narrow scientific field: „Biochemistry“ and „Molecular biology“.

Title of the doctoral dissertation:

Cytogenetic analysis of the influence of radon activity concentration in water on meristematic cells of onion (*Allium cepa* L.)

Abstract: In this dissertation, were performed original cytotoxicological and genotoxicological studies of the influence of radon activity concentration in water on meristematic cells of test organism *Allium cepa* L. We used the *Allium* test to assess chromosomal aberrations and disorders in the mitotic cycle, which is one of the few direct methods to measure cytogenetic damage in biological systems, primarily because of its sensitivity and good association with test organisms. In order to reliably observe the biological effects of ionizing radiation coming from radon in water, it was necessary to adapt the process of exposing the samples of this test organism to migratory potential of the radioactive gas radon. Meristematic cells of *Allium cepa* L. root were treated with a series of 10 radon activity concentrations in water, ranging from 100.62 to 1,006.25 Bq/L. Genotoxicity studies included measurement of mitotic index (*MI*), chromosomal aberrations (*CA*) and nuclear abnormalities (*NA*) in apical meristematic cells of *Allium cepa* L. root.

It has been shown that all applied radon activity concentrations in water can cause clastogenic and aneugenic effects on this test organism (including disorders of mitosis and cytokinesis).

An increase of the radon activity concentration in water caused increased inhibition of root growth, a decrease in mitotic index (*MI*), and a significant increase in the number of aberrant cells in *Allium cepa* L. treated meristematic cells, the highest frequency of occurrence were: polyploidy, sticky chromosomes, C-mitosis, chromosomal bridges, micronuclei, irregular chromosome segregation, chromosome multipolarity, necrosis, apoptosis, binuclear cells. Trinuclear and tetranuclear cells, as well as stray chromosomes, were observed sporadically. The research in this dissertation will make a recognizable contribution to the scientific literature, on the effects of radon activity concentration in water on biological systems.

Key words: *Allium* test, radon activity concentration in water, chromosomal aberrations, cytotoxicity, genotoxicity.

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Biological sciences

Classification code for the scientific field under CERIF code book: B 220; B 145

Type of selected licence Creative Commons: Authorship-non-commercial (CC BY-NC)

ZAHVALE

Nezmjernu zahvalnost dugujem mentorima prof. dr. Izetu Eminoviću (Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu) i prof. dr. Stojku Vidoviću (Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci), na dragocjenoj pomoći i sugestijama tokom izrade ove doktorske disertacije. Čast mi je što sam bio u prilici da učim od ovih perjanica genetike i molekularne biologije u BiH i šire.

Veliku zahvalnost dugujem članovima Komisije za pregled, ocjenu i odbranu doktorske disertacije, na čitanju rukopisa i sugestijama.

Trajno će mi ostati u sjećanju profesionalizam i ljudska toplina, koje su iskazane u toku realizacije doktorske disertacije, od strane pravne službe i profesora na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci.

Duboko sam zahvalan Ministarstvu obrazovanja i nauke FBiH, na finansijskoj podršci Federalnog projekta, u nabavci opreme i finansiranju eksperimentalnih istraživanja. Posebnu zahvalnost dugujem Jasminu Brankoviću, pomoćniku Ministra, na iskazanom profesionalnom interesovanju i ljudskoj brizi za realizaciju ovog naučnog projekta.

Iskreno sam zahvalan Državnoj regulatornoj agenciji za radijacijsku i nuklearnu sigurnost BiH, na stručnoj pomoći i finansiranju dijela eksperimentalnih istraživanja na projektu.

U eksperimentalnim istraživanjima, nesebičnu pomoć pružili su prof. dr. Dragana Todorović (Institut za nuklearne nauke "Vinča", Beograd), i prof. dr. Dušan Mrđa (Departman za nuklearnu fiziku, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu). Iskreno sam zahvalan ovim referentnim naučnicima i plemenitim ljudima.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr. Ferizu Adroviću, osnivaču prestižne Laboratorije za detekciju, dozimetriju i zaštitu od zračenja (LDDZZ) i Radon laboratorije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Tuzli, gdje je ova doktorska disertacija i nastala, i gdje je urađen najveći dio eksperimentalnih istraživanja. Ponosan sam što sam sin i student ovog profesora, koji je nesebično pomogao desetinama doktoranata i magistranata širom Balkana, da osjete i spoznaju snagu nauke.

Moji dragi stričevi Samir, Selman i Sefadin, vođeni porodičnom toplinom i solidarnošću, pružili su dominantnu finansijsku podršku za moje naučno usavršavanje i za realizaciju ove disertacije. Zahvalan sam im na njegovanju te porodične tradicije, koju ću i ja s istim elanom i odgovornošću dalje nastavljati.

Zahvalan sam svojoj porodici na bezgraničnoj višegodišnjoj podršci, iskazanoj ljubavi, ali i odricanju, tokom realizacije doktorske disertacije.

Autor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Opšta razmatranja	1
1.2. Predmet i cilj istraživanja.....	4
2. JONIZIRAJUĆA ZRAČENJA U ŽIVOTNOJ SREDINI	6
2.1. Prirodna radioaktivnost.....	8
2.1.1. Vrste radioaktivnih raspada.....	8
2.1.2. Vrste prirodnih radioaktivnih jezgara	10
2.1.3. Prirodni radioaktivni nizovi	12
2.1.4. Radon	15
2.1.4.1. Radon u vazduhu	17
2.1.4.2. Radon u zemlji.....	18
2.1.4.3. Radon u vodi	18
2.1.5. Radioaktivna kontaminacija biljaka	21
2.2. Veličine i jedinice u dozimetriji	23
2.2.1. Apsorbovana doza	23
2.2.2. Brzina (jačina) apsorbovane doze	24
2.2.3. Kerma	25
2.2.4. Doza ekspozicije (ekspoziciona doza)	25
2.2.5. Brzina (snaga) doze ekspozicije	26
2.2.6. Linearni transfer energije (LET)	26
2.2.7. Relativna biološka efikasnost (RBE).....	27
2.2.8. Ekvivalentna doza	27
2.2.9. Efektivna doza	29
3. BIOLOŠKI EFEKTI JONIZIRAJUĆIH ZRAČENJA	31
3.1. Direktno i indirektno djelovanje zračenja	33
3.2. Citogenetički efekti zračenja	35
3.2.1. Genske mutacije	36

3.2.2.	Hromozomske aberacije	37
3.2.2.1.	Strukturne hromozomske aberacije	38
3.2.2.2.	Numeričke aberacije hromozoma	40
3.2.3.	Genomske mutacije	40
3.2.4.	Apoptoza i nekroza kao parametar citotoksičnosti.....	41
3.3.	Biološki efekti radona	42
3.4.	Radijacioni hormesis.....	47
4.	BIOINDIKATORI JONIZIRAJUĆIH ZRAČENJA	50
4.1.	<i>Allium cepa</i> L., kao test organizam.....	52
4.2.	Karakteristike crnog luka (<i>Allium cepa</i> L.).....	53
5.	METODE ISTRAŽIVANJA I INSTRUMENTALIZACIJA	55
5.1.	Metode i instrumentalizacija za detekciju radona u vodi i jačine doze gama zračenja.....	56
5.1.1.	Osnovne karakteristike sistema AlphaGUARD PQ 2000 PRO i procedura mjerjenja koncentracije aktivnosti radona u vodi.....	56
5.1.2.	Priprema uzoraka vode sa različitim koncentracijama aktivnosti radona.....	60
5.1.3.	Mjerenje jačine doze gama zračenja	62
5.2.	Gama spektrometrijska metoda	63
5.2.1.	Softver za spektralnu analizu gama spektara	65
5.3.	<i>Allium cepa</i> test.....	66
5.3.1.	Metodologija <i>Allium cepa</i> testa	68
5.4.	Mikronukleus test.....	71
5.5.	Statistička obrada podataka	72
6.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA	73
6.1.	Rezultati gama spektrometrijske analize	73
6.2.	Rezultati mjerenja jačine apsorbirane doze gama zračenja u vazduhu	73
6.3.	Rezultati mjerenja koncentracije aktivnosti radona u vazduhu laboratorije.....	74

6.4. Rezultati mjerenja koncentracije aktivnosti radona u uzorcima izvorske vode	75
6.5. Rezultati makroskopskog i mikroskopskog istraživanja morfologije tkiva luka (<i>Allium cepa</i> L.).....	77
6.5.1. Makroskopski i mikroskopski parametri izlaganja koncentracijama aktivnosti radona u destilovanoj vodi.....	77
6.5.2. Makroskopski i mikroskopski parametri izlaganja koncentracijama aktivnosti radona u izvorskoj vodi	81
7. ZAKLJUČAK	94
8. LITERATURA.....	96

1. UVOD

1.1. Opšta razmatranja

Sva bića na Zemlji neprekidno su izložena zračenju. Zračenje u fizičkom smislu predstavlja tokove čestica ili kvanata energije, a svojstveni efekti svih tipova zračenja je njihova interakcija sa sredinom kroz koju prolaze. Jonizirajuća zračenja su elektromagnetska ili čestična zračenja, čije su energije veće od minimalne vrijednosti, koje dovode do jonizacije atoma i molekula [1]. Kod većine atoma i molekula, najniža energija jonizacije je veća od 12.4 eV, odnosno, talasna dužina manja od 100 nm, ili frekvencija veća od $3 \cdot 10^{15}$ Hz. U jonizirajuća elektromagnetna (fotonska) zračenja, spadaju zračenja viših energija, a čine ih rendgenski (X) - zraci i γ - zraci. Jonizirajuće čestice mogu biti naelektrisane, kao što su: elektroni, pozitroni, protoni, α - čestice, teški joni, a i bez naelektrisanja, kao što su neutroni.

Opšta populacija neizbježno i svakodnevno je izložena prirodnim izvorima jonizirajućih zračenja, koja predstavljaju prirodni fon. U mnogobrojnim istraživanjima, utvrđeno je da neki radni i boravišni prostori u brojnim zemljama svijeta, imaju visoke nivoe prirodnih zračenja, pri čemu se ti nivoi prvenstveno odnose na koncentracije radioaktivnog gasa radona. Širom svijeta izvršene su epidemiološke studije velikih populacija, u cilju otkrivanja uzročno posljedične veze između izlaganja radonu i njegovim produktima raspada, i pojave plućnog kancera. Udisanje produkata raspada radioaktivnog gasa radona čini oko 50% godišnje efektivne doze (oko 1.26 mSv), koju čovjek prima od svih prirodnih izvora zračenja [2]. To je jedan od najznačajnijih mehanizama izlaganja čovjeka prirodnom zračenju. Radon je identifikovan kao javno-zdravstveni problem.

Značajnu ulogu u ukupnom ozračivanju stanovništva ima sadržaj radona u vodi za piće, ali i vodi koja se koristi i za druge svrhe. To se prvenstveno odnosi na vodu koja se koristi u bazenima za kupanje, kao i kadama i kupatilima za inhalaciju rekreaciono-lječilišnih centara. Doza ozračivanja organizma od radona unijetog vodom za piće zavisi od njegove koncentracije aktivnosti u vodi, njegovog metabolizma i kinetike u organizmu. Unijeti radon se lako apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta i distribuira među tkivima, dijelom zbog velikog koeficijenta emanacije, a djelimično zbog njegove rastvorljivosti u krvi i tkivu.

Zbog same prirode atoma radona, pouzdano određivanje nivoa koncentracije aktivnosti radona u vodi, određuje se tek zadnjih 20 godina. Ova činjenica imala je za posljedicu nekontrolisano i rizično izlaganje stanovništva širom svijeta ovim radioaktivnom gasom. To se prvenstveno odnosi na visoko radioaktivne radonske vode, koje se koriste u domenu balneologije, zbog čega su tretirane kao ljekovite vode. Nedostatak pouzdane informacije za koncentraciju aktivnosti radona u vodi, bila je velika barijera za sagledavanje njegovih bioloških efekta, kada se s vodom radon transportuje kroz biološke sisteme.

Problem zaštite od zračenja, kao i od drugih genotoksičnih agenasa, multidisciplinarni je problem, i zauzima veoma značajno mjesto u biološkim disciplinama. Jonizirajuće zračenje direktno ili indirektno narušava integritet biomakromolekula, što za rezultat ima široku lepezu strukturnih i funkcionalnih promjena. Jonizirajuće zračenje je snažni mutagen, koji dovodi do promjena na DNK molekulu, izaziva genomsku nestabilnost, povećava učestalost mutacija iznad prisutnog normalnog nivoa mutacija u ćeliji [3]. Ove promjene mogu biti kako na nivou manjih molekula, tako i na nivou proteina, DNK i RNK, najvažnijih organskih molekula.

Za nastajanje bioloških promjena, od daleko najvećeg značaja je obrazovanje jona i nastanak slobodnih radikala. Slobodni radikali se ubrajaju u najreaktivnije hemijske sisteme[4]. Brojna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja pokazala su da jonizirajuća zračenja u organizmu generišu povećanu koncentraciju visoko reaktivnih vrsta slobodnih radikala, kao što su slobodni kiseonični radikali, superoksid anjon radikal i hidroksil radikal, kao i određene azotne reaktivne vrste. Generisani slobodni radikali reaguju s drugim molekulima koji su prisutni u biološkim sistemima, s osnovnim ćelijskim strukturama i biomolekulima u organizmu, dovodeći do velikog broja štetnih efekata poput oksidativne degradacije lipida i proteina, ili jednolančanih prekida DNK [5]. Stanje oksidativnog stresa je stanje u kome dolazi do narušavanja ravnoteže između produkcije reaktivnih oblika kiseonika u organizmu u toku metaboličkih procesa i sposobnosti samog organizma da njihovu hiper produkciju neutrališe ili eliminiše.

Reakcija slobodnih radikala s drugim molekulima u biološkom sistemu zavisi od njihove koncentracije, veličine i reaktivnosti. Ove reakcije dovode do obrazovanja novih tipova molekula, koji mogu na različite načine da djeluju na biološke sisteme. Radon i njegovi produkti raspada odlikuju se širokom lepezom energija uzmaklog jezgra i energija emitujućih radioaktivnih čestica, koje mogu da uzrokuju različite reakcije, u kojima se generišu slobodni radikali i različiti radijacioni biološki efekti. Na tim interakcijama zasnovana je ideja, da se u aktuelnoj doktorskoj disertaciji istraži uticaj raznih koncentracija aktivnosti radona u vodi, u stvaranju potencijalnih bioloških efekata na meristemske ćelije crnog luka *in vivo*.

Procjena genetskih rizika povezanih s izlaganjem čovjeka jonizirajućem zračenju, suočena s brojnim neizvjesnostima, dijelom zbog činjenice što nije moguće direktno pratiti i potvrditi mutacije uzrokovane zračenjem na ljudskoj populaciji. S obzirom da mnoge mutacije dovode do nastanka kancera, mutageni se obično smatraju i kancerogenima. Radon je klasifikovan kao klasa A kancerogena, i poslije duvana je drugi uzročnik raka pluća kod ljudi [6]. Genotoksični efekti predstavljaju sve promjene u strukturi i funkcionisanju genetičkog materijala koje izazivaju genotoksični faktori. Pod tim promjenama najčešće se podrazumjevaju mutacije koje se odnose ne samo na promjene u genetičkom materijalu, već i na sam proces koji dovodi do tih promjena. Prilikom djelovanja raznih mutagena, citogenetičke studije na biljnim vrstama daju pouzdane dokaze određenih promjena na

hromozomima. Mutageni faktori mogu biti detektovani citološki, ćelijskom inhibicijom, zaustavljanjem metafaze, indukcijom numeričkih ili strukturnih hromozomskih aberacija, od fragmentacije hromozoma, pa sve do dezorganizacije mitotičkih vlakana, a potom i svih ostalih mitotičkih faza [7].

Da bi se dobile pouzdane citogenetičke procjene efekata ili oštećenja koje koncentracija aktivnosti radona u vodi i njegovih potomaka raspada uzrokuju na biološkim vrstama, neophodno je da uzorak bude u konstantnoj mitotičkoj diobi da bi se identifikovali toksični efekti i promjene tokom ćelijskog ciklusa. Iz tih razloga, u aktuelnoj doktorskoj disertaciji koristio se biljni test. Bioindikaciju je moguće izvoditi na svim nivoima organizacije živih sistema, počevši od molekularnog, preko biohemijsko-fiziološkog, celularnog, individualnog, populacionog, biocenološkog (ekosistemskog), završno sa biosfernim.

U sagledavanju bioloških efekata zračenja, biološki indikatori igraju veoma važnu ulogu. Pomoću bioloških indikatora se retrospektivno procijenjuje izloženost i veličina akutnog radijacionog oštećenja na biološkim sistemima, predviđanju se pojave njihovih kasnih efekata. Dvije su glavne vrste bioloških indikatora, klinički indikatori i indikatori laboratorijskih testova. Klinički biološki indikatori akutnog radijacionog oštećenja, svrstani su prema izloženim organima/tkivima i simptomima u tri različite podgrupe: gastrointestinalne, hematopoetske i neurovaskularne.

Indikatori laboratorijskih testova su citogenetički, hematološki i biohemijski indikatori. Citogenetički indikatori, poznati kao citogenetička dozimetrija ili biološka dozimetrija, koji su zasnovani na citogenetskim metodama, trenutno su najefikasniji biološki dozimetri. Od četiri moguće citogenetske metode trenutno dostupne, najefikasnija metoda zasniva se na značajnom povećanju frekvencije hromozomskih aberacija. Citogenetički indikatori postali su nezaobilazna komponenta programa za zaštitu od jonizirajućeg zračenja.

U aktuelnoj doktorskoj disertaciji, za citogenetičku analizu i za ispitivanje uticaja radona u vodi na meristemske ćelije crnog luka *in vivo*, korišteni su testovi citotoksičnosti i genotoksičnosti: *Allium cepa* test i mikronukleus (MN) test. Na vrh ljestvice pouzdanosti testova genotoksičnosti, je tzv. *Allium cepa* test. *Allium cepa* L. (crni luk), sadrži veliki broj različitih klasa primarnih i sekundarnih biomolekula, od kojih su najvažnija organosumporna jedinjenja. Pored sumpornih jedinjenja, za biološku aktivnost crnog luka najznačajnija su fenolna jedinjenja (flavonoidi, antocijani i fenolne kiseline) [8].

Veoma dobro razjašnjene citogenetičke osobine crnog luka, te mali broj hromozoma u diploidnoj hromozomskoj garnituri ($2n=16$), odlična korelacija između biljnih i životinjskih sistema, su pouzdani parametri kada su u pitanju negativni rezultati pri testiranju mutagenosti. Jednostavnost čuvanja i rukovanja uzoraka tokom eksperimenta, su dodatne prednosti *Allium cepa* testa. U novije vrijeme ovaj test se sve češće koristi kao standard za utvrđivanje prisutnosti genotoksičnih zagađivača u prirodi.

Biološka dozimetrija se najvećim dijelom bazira na citogenetičkoj analizi dicentričnih hromozoma. Svaka živa ćelija koja ima sposobnost da se dijeli sadrži jedro, koje se može iskoristiti za proučavanje hromozoma. U aktuелnoj doktorskoj disertaciji, za analizu hromozomskih oštećenja, koristila se analiza mikronukleusa (MN) primjenom mikronukleus (MN) testa. MN testom hromozomske aberacije se detektuju indirektno preko hromatinskih gubitaka nukleusa koji dovode do stvaranja mikronukleusa (MN) u citoplazmi ćelije. MN se definišu kao mala, okrugla citoplazmatska tijela koja sadrže DNK i formiraju se za vrijeme ćelijske diobe od ostataka acentričnih hromozomskih fragmenata ili cijelih hromozoma zaostalih u anafazi ćelijskog ciklusa. Posebna odlika ovog testa što je primjenljiv na veliki broj ćelijskih tipova, i što je dobar biomarker u biološkoj dozimetriji, jer pouzdano identifikuje hromozomske i genomske mutacije.

Obećavajući citogenetski postupak, posebno pri dugoj izloženosti, ili ako se izloženost jonizirajućem zračenju dogodila davno, je metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije (fluorescent in situ hybridization, FISH), koja se može koristiti za dalje definisanje stabilnih aberacija hromozoma i dobijanju potpune frekvencije genomske translokacije. Ova metoda omogućava veću efikasnost u otkrivanju aberacijskih razmjena i veću pouzdanost u procjeni manjih doza zračenja, nego što je to moguće uz pomoć konvencionalnih citogenetskih metoda.

1.2. Predmet i cilj istraživanja

Imajući u vidu udio radona u izloženosti čovjeka i ostalih živih bića prirodnoj radijaciji, definisan je predmet istraživanja aktuелne doktorske disertacije. Problem istraživanja ove doktorske disertacije, predstavlja utvrđivanje uticaja raznih koncentracija aktivnosti radona u vodi, na vijabilnost ćelija biljne kulture meristenskog tkiva luka (*Allium cepa* L.), kroz ostvarivanje narednih ciljeva:

- Pouzdano određivanje koncentracije aktivnosti radona u uzorcima vode.

Određivanje nivoa koncentracije aktivnosti radona u vodi do prije 20 godina, bio je veliki naučni problem, zato što su sve hemijske analitičke metode i većina nuklearnih metoda, bile nemoćne za pouzdano određivanje njegove koncentracije u vodi. Pouzdano određena koncentracija aktivnosti radona u uzorcima vode, predstavlja temelj uspješnosti aktuелne doktorske disertacije. Ova mjerenja vršena su u Laboratoriji za detekciju, dozimetriju i zaštitu od zračenja (LDDZZ) na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Tuzli, jedinoj Radon laboratoriji u BiH, koja ima međunarodne reference.

- Za uspješno sagledavanje uticaja koncentracije aktivnosti radona u vodi na meristemske ćelije luka, nužna je bila pouzdana detekcija produkata raspada radona u vodi.

Produkti raspada radona prate turbulentni prijenos radona kroz razne medije, pri kojem može doći do narušavanja radioaktivne ravnoteže među nastalim radioizotopima. Ovo se odnosi prvenstveno na kratkoživeće izotope ^{218}Po , ^{214}Bi , ^{214}Po i ^{214}Pb . Pouzdano određena koncentracija aktivnosti radona u vodi, kvalitetno određena aktivnost produkata raspada radona, kao i poznavanje ukupnih nivoa radioaktivnosti u vodi, primarni su ulazni parametri za uspješno sagledavanje citogenetičkih efekata radona na vijabilnost ćelija biljne kulture meristenskog tkiva luka. Kvalitativne i kvantitativne gamaspektrometrijske analize uzoraka vode za potrebe ove doktorske disertacije, vršene su na najsavremenijem visokorezolucionom, niskofonskom gamaspektrometru, koji je dostupan na tržištu.

- Izvođenje *Allium cepa* testa i analize mikronukleusa (MN) u ćelijama korijena luka, izvršene su na određenim koncentracijama radona u vodi, u cilju sagledavanja mogućih korelacija između nivoa koncentracija aktivnosti radona u vodi, i odgovarajućih bioloških efekata na tretiranim meristemskim ćelijama luka.

U disertaciji je detaljno istražena učestalost i tipovi hromozomskih aberacija meristemske ćelije korijena luka, koje su bile izložene određenim koncentracijama radona u vodi. Hromozomske aberacije su prihvaćene kao pouzdani parametri u evaluaciji oštećenja usljed indukcije jonizirajućeg zračenja. Hromozomska nestabilnost se manifestuje kao povećana frekvencija hromozomskih aberacija, a javlja se nakon izlaganja kako niskim tako i visokim dozama zračenja. Defekti u hromozomskoj segregaciji, neblagovremen i defektan odgovor u mehanizmu popravka DNA, dovode do nastanka strukturnih i numeričkih hromozomskih aberacija. Biološka dozimetrija se najvećim dijelom bazira na citogenetičkoj analizi acentričnih fragmenata, dicentričnih hromozoma i prstenastih hromozoma, koji su bili sfera interesovanja u ovoj disertaciji.

Kod svakog uzorka izvršeno je izračunavanje mitotskog indeksa, radi praćenja promjena u mitozu, tretiranih i netretiranih (kontrolnih) meristemske ćelije korijena luka. Izvršena analiza hromozomskih promjena pomoću *Allium cepa* testa, jedna je od rijetkih direktnih metoda za sagledavanje oštećenja u sistemima izloženim mogućim mutagenima ili karcinogenima. Da bi se omogućila procjena učinaka ili oštećenja koje uzrokuje jonizirajuće zračenje generisano radonom i njegovim produktima raspada, nužno je bilo da uzorci budu u stalnoj mitotičkoj podjeli, kako bi se vjerodostojno verifikovale promjene nastale tokom ćelijskog ciklusa. *Allium cepa* test, primijenjen u ovoj doktorskoj disertaciji, opravdao je svoju namjenu.

2. JONIZIRAJUĆA ZRAČENJA U ŽIVOTNOJ SREDINI

Životna sredina je prostor, prirodno okruženje, kojeg čine zemljište, vazduh i voda, dinamičke zajednice živog svijeta (biocenoze) i staništa (biotopa) koji međusobno djeluju. Moderna definicija ekosistema koju je uveo britanski biljni ekolog Transley još 1935. godine, uključuje ne samo zajednicu organizama u životnoj sredini, klimu, okruženja koje je stvorio čovjek, nego i cijeli kompleks fizičkih i hemijskih faktora, koji su direktno ili indirektno povezani sa čovjekom aktivnošću.

Za stanje prirodnih resursa životne sredine, važnu ulogu imaju radioaktivni materijali u životnoj sredini, kao primarni, globalni izvori opterećenja od jonizirajućeg zračenja. Prirodni radionuklidi koji su prisutni u okolišu, glavni su izvori izloženosti zračenju za ljude i predstavljaju osnovni nivo zračenja [9]. Pored radioaktivnih izotopa koji egzistiraju u prirodi od samog njenog nastanka, različitim nuklearnim reakcijama stvaraju se različiti vještački radioaktivni izotopi (radioizotopi). Vještačka radioaktivnost u životnoj sredini, posljedica je lokalne ili globalne radioaktivne kontaminacije. Potencijalna ugroženost ljudi, materijalnih dobara i teritorije od štetnih dejstava velikih doza jonizirajućih zračenja na širem prostoru, uslovljena je postojanjem opasnosti da u određenim okolnostima i situacijama dođe do nuklearnih akcidenata. Izloženost jonizirajućem zračenju dolazi i zbog aplikacija u medicini, redovnih aktivnosti na poslu kod radnika u industriji, istraživanjima koji koriste jonizirajuća zračenja ili radioaktivne materije. Na slici 1 prikazane su prosječne godišnje efektivne doze koje primaju pojedinci od raznih izvora jonizirajućih zračenja (svjetski prosjek).

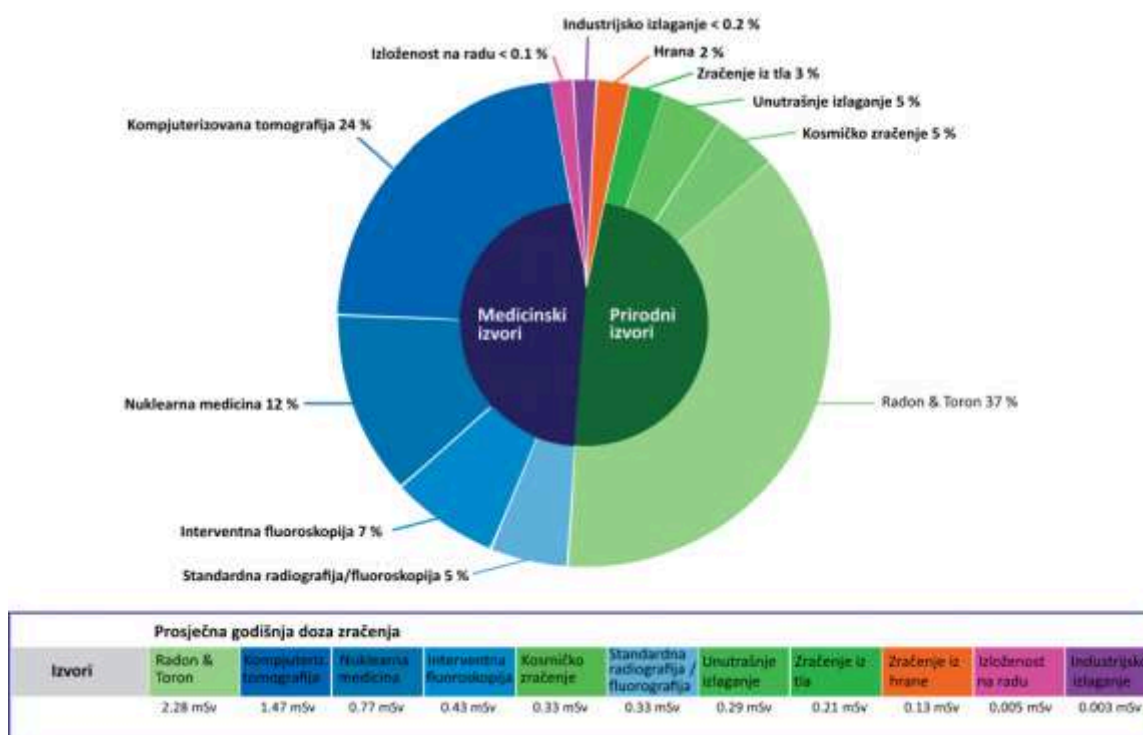


Slika 1. Zaokružene procjene godišnje efektivne doze pojedinaca (svjetski prosjek) [10]

Sa slike 1 se vidi da godišnja efektivna doza kao posljedica jonizirajućeg zračenja prirodnog porijekla iznosi 2.4 mSv. To je prosječna vrijednost, pri čemu je procijenjeno da 65% svjetske populacije primi dozu od 1 do 3 mSv godišnje, oko 25% primi dozu manju od 1 mSv, a 10% primi dozu veću od 3 mSv.

Medicinska upotreba jonizirajućih zračenja je najveći i stalno rastući vještački izvor jonizirajućih zračenja kojima je čovjek u zadnje vrijeme izložen. Uključuje dijagnostičku radiologiju, radioterapiju, nuklearnu medicinu i intervencionu radiologiju. Na taj način se stanovništvo pored prirodnog zračenja, dodatno i ubrzano izlaže vještačkim izvorima jonizirajućih zračenja.

Postoje značajne varijacije od zemlje do zemlje u mogućnostima i obimu korištenja jonizirajućeg zračenja. U medicinskoj dijagnostici se koriste relativno male doze u tretmanu pacijenata (0.1-10 mSv), dok terapijska upotreba jonizirajućeg zračenja uključuje vrlo visoke doze precizno usmjerene na tumore (20-60 Gy), slika 2.



Slika 2. Izloženost izvorima zračenja u SAD u 2006. godini [11]

Broj CT pregleda i postupaka nuklearne medicine koji su obavljani u Sjedinjenim Američkim Državama tokom 2006. godine, iznosili su 67 miliona, odnosno 18 miliona respektivno [11]. Cilj organizovanog praćenja radioaktivnosti u životnoj sredini je da se traže rješenja za zaštitu živih bića na zemlji (posebno ljudi) od jonizirajućih zračenja, kao i podizanje svijesti građana o mogućim zdravstvenim rizicima povezanim s izvorima tih zračenja. Jonizirajuće zračenje predstavlja jedan od najopasnijih zdravstvenih rizika u životnoj sredini.

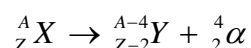
2.1. Prirodna radioaktivnost

Prirodna radioaktivnost je pojava raspadanja jezgara atoma koja postoje u prirodi, bez spoljašnjih uticaja. Pod prirodnim izvorima zračenja podrazumijevaju se radijacije iz Svemira i radioaktivnih materijala koji se nalaze u Zemljinoj kori. Iz ovih prirodnih izvora zračenja svjetsko stanovništvo prima najveći dio radijacije. Glavne komponente ovog zračenja su: kosmički zraci, zemaljski γ -zraci, radionuklidi unijeti ingestijom i inhalacija radona. Zemaljski izvori, u normalnim prilikama, odgovorni su za najveći dio čovjekove izloženosti prirodnoj radijaciji [12]. Na ove izvore zračenja otpada više od pet šestina godišnje ekvivalentne doze koju apsorbuju pojedinci i to, uglavnom, internom radijacijom.

2.1.1 Vrste radioaktivnih raspada

Većina atomskih jezgara u prirodi su stabilna, ostaju nepromijenjena beskonačno dugo vremena. Međutim, određena atomska jezgra se tokom vremena spontano transformišu u druga jezgra. Nestabilna atomska jezgra pri tome emituju: α čestice (jezgra helijuma), β čestice (elektrone i pozitrone), γ -zrake ili X-zrake (fotoni).

Alfa (α) raspad predstavlja radioaktivni raspad atomskog jezgra, pri kojem se smanjuje broj nukleona u jezgru emisijom α čestice. Alfa čestica (α) predstavlja jezgro atoma helijuma, koje se sastoji od dva protona i dva neutrona. U opštem slučaju α -raspad može se predstaviti na sljedeći način:



gdje je sa X označeno jezgro prije raspada, odnosno emisije α -čestice (tzv. jezgro roditelj, ili predak, prethodnik), a sa Y novoobrazovano jezgro (jezgro potomak datog prethodnika). Dakle, pri ovom tipu spontane nuklearne transformacije maseni broj A potomka se smanjuje za 4, a atomski (redni) broj Z za 2.

Uzrok α nestabilnosti leži u činjenici da teška atomska jezgra sadrže u sebi veliki broj nukleona, pa jake nuklearne sile, koje su kratkog dometa i djeluju samo na najbliže susjede, ne mogu ih držati na okupu. Na to ukazuje činjenica da samo teška jezgra ($A > 200$ i $Z > 82$) su alfa-radioaktivna. Teška jezgra emisijom α -čestica prelaze u stanja niže energije, zbog čega se pri formiranju novog jezgra, oslobađa energija. Energija koja se oslobađa pri α -raspadu preraspodjeljuje se na α -česticu i na uzmaklo jezgro-jezgro potomka. Brzine kojom α -čestice izlijeću iz atomskog jezgra nalaze se u intervalu od $1,4 \cdot 10^7 - 2 \cdot 10^7$ m/s, što odgovara energijama od 4 do 8,8 MeV.

Alfa čestice koje se emituju iz jednog radioizotopa nemaju istu energiju, već u većini slučajeva imaju različite vrijednosti energije. Energetski spektar emitovanih alfa čestica je diskretan. Na primjer, u spektru α -raspada radijuma ^{226}Ra , javljaju se dvije karakteristične linije, jedna sa energijom od 4.88 MeV i odgovara transformaciji $\text{Ra} \rightarrow \text{Rn}$ u osnovno stanje, a druga, sa energijom od 4,694 MeV i odgovara prelazu novonastalog jezgra Rn u pobuđeno stanje. Prelaz jezgra radona (Rn) iz pobuđenog u osnovno stanje vrši se uz emisiju γ -kvanta energije od 0.186 MeV.

Nestabilnost atomskih jezgara može biti uzrokovana i nepovoljnim odnosom broja protona i neutrona u njima. Stabilnost u jezgru će se ostvariti pretvaranjem jednih nukleona u druge, sve dok se ne uspostavi povoljan odnos među njima. Nuklearna transformacija pri kojoj dolazi do pretvaranja neutrona u protone ili protona u neutrone, uz emisiju lakih čestica elektrona i pozitrona naziva se beta (β) raspad. Poznati su sljedeći oblici β raspada: β^- raspad, β^+ raspad, elektronski zahvat (EZ) i dvostruki β raspad.

Kada atomsko jezgro sadrži višak neutrona u odnosu na broj protona, da bi se ostvarila stabilnost jezgra neutroni se transformišu u protone. Ovakav tip transformacije atomskog jezgra naziva se elektronski β^- raspad, koji se simbolički predstavlja na sljedeći način:

$$n \rightarrow p + e^- + \tilde{\nu}_e$$

gdje $\tilde{\nu}_e$ označava elektronski antineutrino. Antineutrino (kao i neutrino) čini se da ima nultu masu mirovanja, nije naelektrisan i praktično ne interaguje sa ostalim djelovima materije.

Stabilnost atomskog jezgra biće narušena i onda, kada je broj protona nepovoljan u odnosu na broj neutrona, pa da bi se ostvarila stabilnost jezgra protoni se transformišu u neutrone. Ovakav tip transformacije atomskog jezgra naziva se pozitronski β^+ raspad, koji se simbolički predstavlja na sljedeći način:

$$p \rightarrow n + e^+ + \nu_e$$

gdje ν_e označava elektronski neutrino. Pozitron je antičestica elektrona, koji ima istu masu i apsolutno naelektrisanje kao i elektron ali suprotnog znaka. U vakuumu pozitron je stabilan isto kao i elektron. Ali susret elektrona i pozitrona završava loše za oba, anihiliraju međusobno, odnosno nestaju, emitirajući pri tom fotone (γ -kvante).

Elektromagnetsko zračenje koje nastaje usljed energijskih promjena u jezgru atoma naziva se gama (γ) zračenje [13]. Ono se ne javlja kao samostalni oblik zračenja, već prati α ili β raspad, i to u onim slučajevima kada se novonastalo jezgro potomka nađe u pobuđenom stanju. Takvo stanje traje veoma kratko (10^{-13} - 10^{-14} s), pri čemu pobuđeno jezgro pri prelasku na niži energijski nivo ili u osnovno energijsko stanje, najčešće emituje γ - fotone ili vrši prijenos energije na neki od atomskih elektrona. Dakle, radi se o deekscitacionom procesu koji obično nastaje odmah nakon pobude jezgra na neki od viših energijskih nivoa.

Energija emitovanog γ - fotona je strogo određena razlikom energija stanja jezgra pri takvom prelazu. Zato je energijski spektar γ - zračenja linijski, odnosno govorimo o diskretnom energijskom spektru emitovanog γ -zračenja. Talasne dužine γ - zraka prirodno radioaktivnih izvora, obuhvataju oblast spektra elektromagnetne radijacije od 0.466 pm - 0.0428 nm, dok se energije γ - fotona koji se emituju iz prirodno radioaktivnih izotopa, nalaze u intervalu od 0.03 do 3.1 MeV [14]. Ovo zračenje daleko je prodorniji fizički mutageni agens u odnosu na α i β zračenje.

2.1.2 Vrste prirodnih radioaktivnih jezgara

Prirodni radioaktivni izotopi koji se susreću u biosferi Zemlje dijele se u tri osnovne grupe:

a) Prirodni radioaktivni izotopi, koji su nastajali u svim fazama evolucije Zemlje i čije nastajanje traje i danas. To su kosmogeni radionuklidi, koji nastaju u procesima direktne ili indirektne interakcije kosmičkog zračenja sa gornjim i u nešto manjoj mjeri, donjim slojevima atmosfere [15]. Kosmogeni radionuklidi su srednjeg ili malog atomskog broja, emiteri β , γ i X - zraka, čije se vrijeme poluraspada nalazi u opsegu od nekoliko sekundi do $5.7 \cdot 10^3$ godina. Sa stanovišta ukupnog sadržaja i ozračivanja žive materije, glavni doprinos kosmogenih radionuklida dolazi od četiri nuklida: ^{14}C , ^3H , ^7Be i ^{22}Na , a najznačajniji mehanizam izlaganja je ingestija. Najznačajniji od njih je ugljenik. Godišnja efektivna doza od ^{14}C je 12 μSv , 0.15 μSv od ^{22}Na , 0.01 μSv od ^3H , i 0.03 μSv od ^7Be [16].

b) Prirodni radioaktivni izotopi koji ne ulaze u radioaktivne porodice. Njihov nastanak je vezan za nastanak Zemlje. Sadržaj im u biosferi opada sa brzinom njihovog radioaktivnog raspada. Zajednička karakteristika ovih radionuklida je da se direktno raspadaju na stabilne nuklide. Glavni predstavnici ove grupe radionuklida su ^{40}K i ^{87}Rb . U Zemljinoj kori kalijuma ima 2.1 %, što je veoma visoko učešće. Prirodni kalijum se sastoji od tri izotopa i to dva stabilna i jednog radioaktivnog. Stabilni izotopi su ^{39}K (93.2581 %) i ^{41}K (6.7302 %), a radioaktivni ^{40}K (0.0117%) sa periodom poluraspada $T_{1/2}=1.28 \cdot 10^9$ godina, čiji je doprinos ukupnom radijacionom opterećenju u normalnim uslovima značajan. U biosferi je prisutna visoka dinamika kruženja ^{40}K , uz različite koncentracije u pojedinim elementima biosfere, pri čemu se u organizam čovjeka unosi ishranom i uzrokuje interno ozračivanje.

c) Prirodni radioaktivni izotopi koji su članovi radioaktivnih porodica, odnosno tri prirodna radioaktivna niza: Uran - radijumovog (^{238}U), uran - aktinijumovog (^{235}U) i torijumovog niza (^{232}Th). Vremena poluživota su im dovoljno duga u poređenju sa životima ovih kosmičkih formacija, pa se zato i danas nalaze na Zemlji. Njihova koncentracija u biosferi postepeno se smanjuje, analogno opadanju količine rodonačelnika niza. Prosječne efektivne doze širom svijeta za svaku od četiri komponente prirodnog uticaja, prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1. Srednja godišnja doza za odrasle od prirodnih izvora jonizirajućeg zračenja [16]

Ekspozicione komponente	Godišnja efektivna doza (mSv)	
	U oblastima normalnog fona	U oblastima povišenog fona
Kosmičko zračenje	0,38	2,0
Kosmogeni radionuklidi	0,01	0,01
Zemaljska radijacija: Spoljna ekspozicija	0,46	4,3
Zemaljska radijacija: unutrašnja ekspozicija (isključujući radon)	0,23	0,6
Zemaljska radijacija: unutrašnja ekspozicija od radona i njegovih produkata:		
Inhalacija Rn -222	1,2	10
Inhalacija Rn -220	0,07	0,1
Inhalacija Rn -219	0,005	0,1
Ukupno	2,4	

Najveći doprinos spoljašnjoj ozračenosti prirodnim izvorima jonizirajućeg zračenja predstavlja izlaganje γ - zračenju unutar zatvorenog prostora, koje potiče od dezintegracije radioaktivnih elemenata iz nizova ^{238}U i ^{232}Th , kao i ^{40}K , u građevinskim materijalima. Ovi radionuklidi sa svojim potomcima raspada, doprinose i unutrašnjem izlaganju kada putem lanaca ishrane ingestijom ili inhalacijom dopijevaju u ljudski organizam i ozračavaju različite organe alfa i beta česticama, kao i gama zračenjem. Sirovine prirodnog porijekla, su prirodno radioaktivni materijali (NORM - akronim od Naturally Occurring Radioactive Materials) sa različitim sadržajem prirodnih radionuklida, koji su generisani različitim geološkim procesima u formiranju minerala i stijena iz kojih se dobijaju građevinski materijali.

2.1.3 Prirodni radioaktivni nizovi

Prirodni radionuklidi pojavljuju se kao sastavni djelovi gotovo svih prirodnih sistema. To su prije svega radionuklidi koji su članovi tri prirodna radioaktivna niza: uran – radijumovog (^{238}U), uran - aktinijumovog (^{235}U) i torijumovog niza (^{232}Th). Svi članovi ovih nizova genetski su vezani i nastaju sukcesivnim raspadom prvog člana niza. Uzastopnim raspadom iz jednog elementa nastaje drugi, iz drugog treći, itd., sve dok se ne dobije stabilan izotop.

Uran-radijumov niz počinje izotopom ^{238}U , a završava se stabilnim izotopom olova ^{206}Pb . Primarni minerali urana su njegovi oksidi i složeni bezvodni oksidi koji sadrže izomorfne primijese titana, gvožđa i torijuma (uranit, uranijumove smole). Sekundarni minerali uranijuma su sulfati, karbonati, fosfati, arsenati, vanadati, molibdati, silikati uranila i hidroksidi uranijuma (karnotit, kofinit, autunit). Uranijuma u Zemljinoj kori ima oko $2.4 \cdot 10^{-4} \%$ [10]. Svaki prirodni uzorak urana sadrži 99.285 % ^{238}U ($T_{1/2} = 4.51 \cdot 10^9 \text{ g}$), oko 0.72 % ^{235}U ($T_{1/2} = 7.1 \cdot 10^8 \text{ g}$) i ukoliko su prva četiri člana uranovog niza u radiohemijskoj ravnoteži 0.0057 % ^{234}U ($T_{1/2} = 1.47 \cdot 10^5 \text{ g}$). U prirodi odnosi ovih izotopa su: $^{235}\text{U}/^{238}\text{U} = 0.00725$, $^{234}\text{U}/^{238}\text{U} = 5.5 \cdot 10^{-5}$. Prosječna koncentracija urana u zemljištu Evrope iznosi 2.03 mg kg^{-1} [12]. Antropogene aktivnosti kao što su rudarstvo, nuklearna industrija i tehnologija, sagorijevanje fosilnih goriva, fabrike fosfatnih đubriva i njegova upotreba u poljoprivredi, pridonose povećanju koncentracije urana u tlima. Zbog visokog jonskog potencijala u oksidativnim uslovima uran je mobilan.

Produkti raspada urana imaju različita hemijska svojstva i poluživote dovoljno duge da dozvoljavaju značajnu separaciju njegovih članova. Članovi uranovog niza, izotop radijuma ^{226}Ra i njegovi kratkoživeći potomci, su od najvećeg značaja u procjeni zagađenja, prvenstveno zbog pokretljivosti gasa radona ^{222}Rn . Zbog rastvorljivosti u vodi izotop radijuma ^{226}Ra može biti izvor unutrašnje kontaminacije od pijaće vode, posebno ako je voda iz velikih dubina, koja sadrži koncentracije U i Ra veće od prosječnih. U kiseloj sredini ili vodama bogatim hloridima, radijum je veoma mobilan, dok u alkalnim ili sulfatnim vodama mobilnost mu je znatno smanjena, zbog toga što gradi sa anjonima Cl^- , Br^- , J^- , NO_3^- u vodi lako rastvorljive, a sa anjonima F^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , PO_3^{3-} teško rastvorljive soli.

U tabeli 2 prikazane su energije zračenja prirodnog uranovog niza.

Tabela 2. Energije zračenja prirodnog uranovog niza [17].

Radionuklid	Period poluraspada	Glavne energije zračenja (MeV) i intenziteti*		
		α	β	γ
^{238}U	4.468·10 ⁹ g	4.15 (23%) 4.19 (77%)	-	-
^{234}Th	24.1 d	-	~0.103 (19%) 0.191 (81%)	0.063 (3,5%) 0.093 (4%)
^{234}Pa	1.18 m	-	2.29 (98%)	0.765 (0,30%) 1.001 (0,60%)
^{234}Pa	6.7 h	-	0.53 (66%) 1.13 (13%)	0.10 (50%) 0.70 (24%) 0.90 (70%)
^{234}U	2.48·10 ⁵ g	4.72 (28%) 4.77 (72%)	-	0.053 (0,2%)
^{230}Th	7.52·10 ⁴ g	4.62 (24%) 4.68 (76%)	-	0.068 (0,6%) 0.142 (0,07%)
^{226}Ra	1602 g	4.60 (5,5%) 4.78 (94,5%)	-	0.186 (4%)
^{222}Rn	3.825 d	5.49 (~100%)	-	0.510 (0,07%)
^{218}Po	3.05 m	6.11 (100%)	0.33 (100%)	-
^{214}Pb	26.8 m	-	1.03 (6%)	0.295 (19%) 0.352 (36%)
^{218}At	2 s	6.65 (6%) 6.70 (94%)	0.67 (94%)	-
^{214}Bi	19.7 m	5.61 (100%)	3.26 (100%)	0.609 (47%) 1.120 (17%) 1.764 (17%)
^{214}Po	164 ms	7.83 (100%)	-	0.799 (0,014%)
^{210}Ti	1.32 m	-	2.3 (100%)	0.296 (80%) 0.795 (100%) 1.31 (21%)
^{210}Pb	~ 22 g	3.7 (1.8·10 ⁻⁸ %)	0.017 (85%) 0.064 (15%)	0.047 (4%)
^{210}Bi	5.02 d	4.93 (60%) 4.89 (34%) 4.59 (5%)	1.155 (100%)	-
^{210}Po	138.3 d	5.30 (100%)	-	0.803 (0.0011%)
^{206}Tl	4.19 m	-	1.520 (100%)	-
^{206}Pb	Stabilan	-	-	-

* Intenziteti se odnose na procenat dezintegracije samog nuklida a ne roditelja ovog niza

Torijumov niz počinje prirodnim radioizotopom torijuma ^{232}Th sa periodom poluraspada $T_{1/2} = (1.41 \pm 0.01) \cdot 10^{10}$ godina. Ostali članovi ovog niza su relativno kratkoživeći izotopi. Ako članovi niza ne migriraju, radioaktivna ravnoteža se uspostavlja u periodu oko 60 godina, što je vrlo kratak period u terminima geoloških procesa. U mineralima i stenama niske permeabilnosti, očekuje se ravnoteža radionuklida torijumovog niza. Međutim, u tlu prirodnoj vodi, prirodnom gasu, nafti i atmosferi, različiti hemijski i fizički odnosi članova niza mogu biti uzročnici neravnoteže. Izotop ^{232}Th jedini je izotop torijuma koji se nalazi u prirodi, tj. njegova izotopska obilnost je 100%. U litosferi ^{232}Th je zastupljen sa $7.5 \cdot 10^{-4} \%$, koji u prirodi postoji u četvorovalentnom stanju, kao vrlo stabilan oksid ili u relativno inertnim silikatnim mineralima. Po veličini radijusa ($r = 0.112 \text{ nm}$), hemijskom ponašanju i drugim parametrima, sličan je četvorovalentnom uranu. Njegovo geochemijsko ponašanje mnogo je prostije od urana: sjedinjujući se sa drugim jonima Th^{4+} daje samo jedan anjon $(\text{ThO})^{4-}$ [17]. Osnovna osobenost jedinjenja ^{232}Th je njihova slaba rastvorljivost. ^{232}Th je manje pokretan od niza radionuklida i mnogo je manji broj elemenata koji asociraju s njim nego s uranom, zbog toga je znatno manja raznovrsnost ležišta torijuma nego urana.

Članovi ovog niza su inertni plemeniti gas ^{220}Rn (toron) i njegovi kratkoživeći produkti raspada, koji se na kraju prelaze u stabilno ^{208}Pb . Iako je generalno manje značajan i manje istražen od emanacije ^{222}Rn , ^{220}Rn i njegovi produkti raspada ^{212}Pb , ^{212}Bi i ^{212}Po su nemalo dozimetrijski značajani na mnogim lokacijama. Ukoliko se inhaliraju u pluća ^{212}Bi i ^{212}Po vrše sa svojim α -česticama značajnu kontaminaciju, jer te α -čestice imaju energije od 6.05 MeV i 8.78 MeV.

Prvi član uran-aktinijumskog niza je izotop urana ^{235}U , čije je vrijeme poluraspada $7.1 \cdot 10^8$ godina i kraće je oko šest puta od vremena poluraspada ^{238}U . Slično uranovom nizu, aktinijumov niz uključuje radionuklide, čije je vrijeme poluraspada dosta dugo, što dopušta da niz bude razbijen u biosferi, gdje su geološki procesi relativno brzi. Neravnoteža od gubitka pokretljivog gasa ^{219}Rn (aktinon) vrlo je lokalna, jer njegovo kratko vrijeme poluraspada (3,9 s), ograničava njegovo migraciono rastojanje. Sa stanovišta radioaktivne ekspozicije, aktinijumov niz nije značajan. U toku geološkog vremena, odnos masa $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$ se smanjuje na račun brže raspadajućeg ^{235}U na vrijednost od 0.0073. Jedan gram prirodnog urana sadrži: 12 kBq ^{238}U ; 0.55 kBq ^{235}U i 11 kBq ^{234}U , prisutnog u raznim varijacijama [17].

2.1.4. Radon

Radon je prirodni radioaktivni element, gas, bez boje, mirisa i ukusa. Otkrio ga je Friedrich Ernst Dorn 1900 godine, kao emanaciju radijuma ^{226}Ra , kojeg je nazvao niton (od Latinske riječi nitens - sjajan). Od strane Međunarodnog odbora za hemijske elemente 1923. godine, ovaj element dobio je ime radon.

Radon je jedan od biološki najznačajnijih radioizotopa u prirodi, jer zajedno sa svojim produktima raspada, daje glavni doprinos ljudskoj izloženosti prirodnim izvorima zračenja. On je jedini prirodni radioaktivni inertni gas. Izotopi radona ^{222}Rn , ^{220}Rn i ^{219}Rn , s vremenom poluraspada od 3.825 dana, 55.6 s i 3.96 s respektivno, su srednji članovi svakog prirodnog radioaktivnog niza. Zbog vrlo kratkog vremena poluraspada, a i zbog odnosa koncentracija $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$ u prirodi, koji iznosi 0.00725, izotop ^{219}Rn može se zanemariti, dok izotop ^{220}Rn je od manje važnosti za izloženost bioloških vrsta zbog kratkog vremena poluraspada.

Zbog najdužeg vremena života i izotopske obilnosti, primarni doprinos izloženosti zračenju stanovništva od prirodnih izotopa radona ima ^{222}Rn , i pojam radon u ovoj disertaciji odnosiće se na ovaj izotop. U svom lancu raspada, gasoviti radon ^{222}Rn se preko kratkoživećih potomaka raspada, transformiše u stabilno olovo ^{206}Pb , emitujući 5 alfa čestica energije do 7.7 MeV, beta zračenja energije do 2.8 MeV i fotona gama zračenja energije do 2.4 MeV.

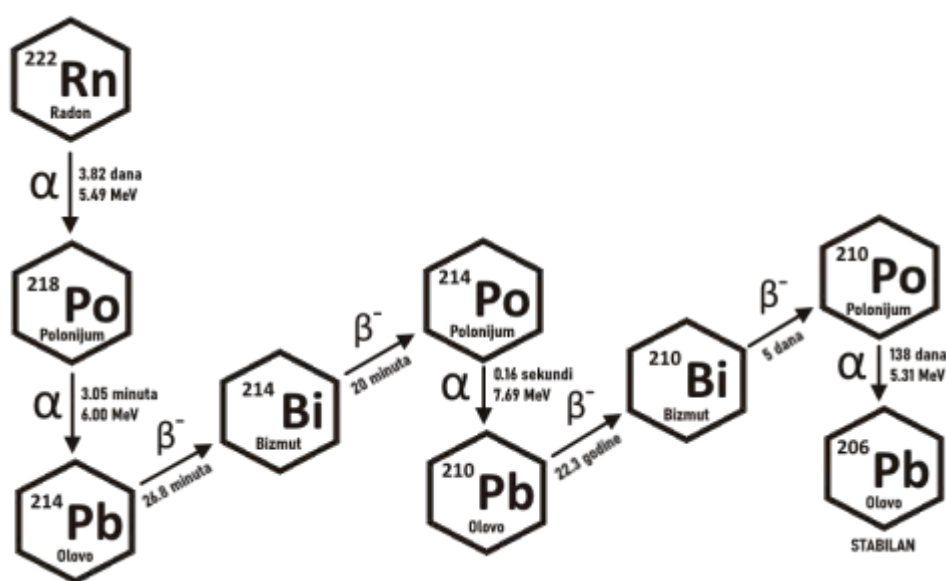
Radon je jedini gas koji zrači alfa čestice. Za fizičko-hemijsko ponašanje radona i njegovih produkata raspada, od posebne je važnosti znati penetracionu snagu alfa čestica emitovanih raspadom, a takođe i uzmak novonastalih jezgara. U tabeli 3 date su energije i dometi alfa čestica u vazduhu i vodi koje emituju izotopi ^{222}Rn , ^{220}Rn i njihovi alfa aktivni potomci. Dometi ovih alfa čestica u tipičnim plastičnim materijalima su slični onim u vodi.

Tabela 3. Energije i dometi α -čestica izotopa ^{222}Rn , ^{220}Rn i njihovih potomaka [18]

Jezgro	Energija α -čestica (MeV)	Domet α -čestica	
		voda (μm)	vazduh (mm)
^{222}Rn	5.49	39	4.08
^{218}Po	6.00	44	4.67
^{214}Po	7.69	66	6.91
^{220}Rn	6.29	48	5.01
^{216}Po	6.78	41	5.67
^{212}Po (64%)	8.78	83	8.53
^{212}Bi (36%)	6.05	45	4.73

Radon zbog stabilne elektronske konfiguracije daje mali broj jedinjenja. S fluorom i fenolom može pri određenim uslovima (analognim kao kod ksenona) stvarati jedinjenja, prvenstveno floride. Spoj RnF_2 je stabilan i nehlapljiv i stvara kompleksne soli. Takođe, su registrovani i neki hlorati radona.

Izotop radona ^{222}Rn je direktni potomak ^{226}Ra . Uključuje se usred njegovih kratkoživećih produkata raspada ^{218}Po , ^{214}Pb , ^{214}Bi i ^{214}Po , čija se vremena poluraspada nalaze u rasponu od 26.8 min do 164 μs , slika 3. Kao inertan gas ne učestvuje u hemijskim reakcijama pri normalnim uslovima s okolinim materijalima, i svaki atom ^{222}Rn , koji je oslobođen pri bilo kojoj kombinaciji ^{226}Ra , može da difunduje kroz materijal u stepenu koji mu dozvoljava njegovo vrijeme poluživota od 3.82 dana.



Slika 3. Šema raspada radona ^{222}Rn .

Gama zraci ^{214}Bi i ^{214}Pb su daleko najveća komponenta i najveći energetik uranovog niza. Ova dva radioizotopa emituju skoro sve γ -zrake u ovoj radioaktivnoj seriji, a doprinose oko 1/4 od svih prirodnih zračenja koje dolaze od Zemlje [19].

Dugoživeći produkti raspada radona: ^{210}Pb , ^{210}Bi i ^{210}Po , čine zadnji segment uranove serije. Od ovih radioizotopa prisustvo ^{210}Pb je najznačajnije u atmosferi, sa aspekta izloženosti ljudske populacije, zbog svoje radiotoksičnosti i dužine vremena poluraspada od 22.3 godine. Zbog toga se koncentracija ^{210}Pb upotrebljava za datiranje recentnih aerosola.

2.1.4.1. Radon u vazduhu

U otvoreni vazdušni prostor gas radon dolazi iz zemlje s gustinom fluksa koji zavisi od njenog geološkog sastava, nadmorske visine zemlje, disperzije u atmosferi, što je sve povezano i s meteorološkim uslovima. Na nivoe koncentracije unutrašnjeg radona u zgradama utiče niz faktora, kao što je sadržaj radijuma u zemlji ispod zgrade, propustljivost zemlje, karakteristike konstrukcionih građevinskih materijala. U suterenu zgrade radon obilato ulazi sa zemljinim vazduhom kroz pukotine i otvore u strukturi objekta, posebno podova. Radon takođe emanira iz konstrukcionih materijala zgrade, dopinoseći povećanju nivoa izloženosti u stambenom i radnom prostoru [20]. Ekshalirajući sa zemljine površine u slobodnu atmosferu, radon se rasijava u njoj pod uticajem vertikalne konvekcije i turbulentnog miješanja, radi čega mu se koncentracija smanjuje sa visinom. Međutim, kada radon dospije u zatvoreni prostor, mogu da se ostvare njegove velike koncentracije. Istraživanja pokazuju da su osnovni izvori radona u zgradama tlo ispod zgrada i građevinski materijali. Zbog specifičnosti stambene gradnje i geološke podloge, u SAD (gdje je problem radona najtemeljnije istražen) tlo se ispod zgrada smatra osnovnim uzrokom povećanih koncentracija radona u zgradama.

U mnogobrojnim istraživanjima, otkriveno je da neki radni i boravišni prostori u brojnim zemljama svijeta imaju visoke nivoe prirodnog zračenja, pri čemu se ti nivoi prvenstveno odnose na koncentracije radioaktivnog gasa radona. Koncentracija aktivnosti radona u zatvorenim prostorima može varirati od nekoliko Bq/m³ do više od 10⁵ Bq/m³. Uobičajene koncentracije radona u zatvorenom prostoru u većini evropskih država nalaze se između 20 i 80 Bq/m³. U vazduhu u normalnim uslovima, koncentracija ²²²Rn obično se nalazi u rasponu od 10 - 20 Bq/m³, dok u nekim oblastima može iznositi i preko 100 Bq/m³. U zavisnosti od vrste građevinskih materijala, izloženost radijaciji u zatvorenom radnom i boravišnom prostoru, može biti i do hiljadu puta veća nego u otvorenom prostoru, prvenstveno zbog ekshalacije radioaktivnog gasa radona iz građevinskog materijala i slabe ventilacije. Za zemlje članice EU, prema Direktivi Vijeća 2013/59/Euratom od 5. decembra 2013 godine, utvrđeno je da referentna prosječna godišnja koncentracija aktivnosti radona u zatvorenim prostorima (stambenim prostorima te prostorima zgrada javne namjene), ne smije biti veća od 300 Bq/m³[21].

Generisanje radona, njegov transport i prodiranje, su veoma kompleksni procesi. Radon do atmosfere dopijeva difuzijom kroz sistem pora i šupljina u tlu. Za datu koncentraciju radona u zemljištu, koncentracija ovog gasa koja emanira u atmosferu zavisi od propustljivosti zemljišta, vlažnosti i meteoroloških parametara (temperature zemljišta i vazduha, atmosferskog pritiska, brzine vjetera i pravca duvanja). Zbog relativno dugog vremena poluraspada (3.82 dana), radon može da boravi relativno dugo u atmosferi prije nego se raspadne. Na taj način on učestvuje u turbulentnom prenosu kroz atmosferu i može da dospije i do njenih viših slojeva i da pređe velika rastojanja. Iz tog razloga je pouzdanost detekcije njegovog mjesta generisanja složen naučni problem.

Produkti raspada radona su u većini slučajeva pozitivno naelektrisani joni, do 85 %, i hemijski su aktivni. Oni interaguju sa negativnim jonima prisutnim u atmosferi i u procesu izmjene naelektrisanja dolazi do njihovog pripajanja prirodnim aerosolima [9]. Tako nastaju prirodno radioaktivni aerosoli. Povišena relativna vlažnost vazduha stvara povoljne uslove za pojačanu kondenzaciju vodene pare i sorpciju radioaktivnih produkata raspada emanacije na česticama vodene pare. Nastali aktivni aerosoli pod dejstvom gravitacionih sila talože se na površini zemlje, gdje se zadržavaju na rastinju, i lagano prodiru u unutrašnjost tla.

2.1.4.2. Radon u zemlji

Zemljište predstavlja najpovršniji sloj Zemljine kore u kome se neprekidno odvijaju dinamički procesi pod uticajem klimatskih, bioloških, fizičko-hemijskih faktora i ljudskih aktivnosti. Sastav i struktura tla definišu njegovu poroznost i moć apsorpcije za različite radioaktivne elemente [22]. Difuzija radona unutar matrice tla značajno zavisi od ovih faktora. Za određeni hemijski sastav tla i pri određenoj konfiguraciji puteva unutar tla, radon može da difunduje prije nego što se raspadne u metalni ^{218}Po , koji ostaje skoro kompletno nepokretan u tlu. Ako je zemlja propustljiva, poput pješčara, gas radon stvoren u stijenama, lako se transportuje naviše kroz zemlju.

Prisustvo podzemne vode, vlažna glina ili druga nepropustljiva zemlja, su sredine koje manje ili više sprečavaju ekshalaciju radona iz tla. Glavni putevi izlaska radona s mjesta generisanja, su zone pukotina i fraktura slojeva, preko kojih se gas radon efektivno transportuje naviše. Radon se sa zemljinim vazduhom uvlači u kuću usljed postojanja gradijenata temperature i pritiska. U velikom broju sistematskih istraživanja migracije radona, ustanovljeno je da je koncentracija radona u vazduhu uglavnom određena brzinom priticanja radona iz tla. Istraživanja su pokazala povećanje nivoa koncentracije radona u prizemnom unutrašnjim prostoru, u odnosu na nivoe u višespratnim stambenim zgradama. Razlog je neposredan kontakt prizemnih prostora sa tlom.

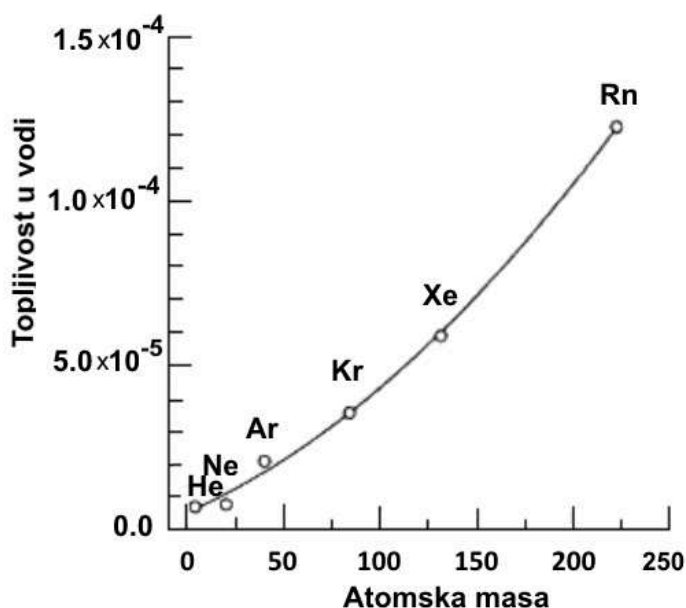
2.1.4.3. Radon u vodi

Hemijski sastav voda formira se kao rezultat uzajamnog dejstva vode i materije u Zemljinoj kori. U procesu nastanka, postojanja i obnavljanja vodenih tokova (posebno podzemnih voda), veliku ulogu imaju porijeklo kompleksa stijena, njihova hidrogeološka struktura i minerološki sastav, kao i geohemijski i mikrobiološki uslovi. Prodiranjem kroz određene tipove stijena heterogenog sastava (magnetske, sedimentne, metamorfne) i rastvorljivosti, ili kroz druge terene, voda ih rastvara i nosi sa sobom, i na taj način dobijaju karakteristične fizičko-hemijske osobine [22].

Prirodni radionuklidi nalaze se u vodi od njenog postanka. Njihova koncentracija u vodi zavisi od izotopske oblinosti u materijalima s kojima voda ima direktan kontakt, kao i od

njihovih fizičko-hemijskih osobina, prvenstveno od topivosti u vodi. Primarni prirodni radionuklidi: uran, radijum i radon su topivi u vodi, što je od posebne važnosti za izloženost stanovništva zračenju. Topljivost gasa radona naglo se smanjuje s povećanjem temperature. Radon otopljen u vodi, može pod određenim uslovima ekshalirati iz nje u slobodan vazduh, s tendencijom koncentrisanja u zatvorenom prostoru.

Podzemne vode obično sadrže veće koncentracije radona od površinskih voda. Podzemne vode koje često prolaze kroz stijene bogate prirodnim uranom i njegovim produktima raspada. Pri radioaktivnom raspadu ^{226}Ra , uzmaklo jezgro radona se otpušta u vodu i zato podzemne vode mogu sadržati značajne koncentracije radona. Iz tog razloga značajan doprinos izloženosti radonu i njegovim produktima raspada dolazi od ingestije vode za piće iz podzemnih izvora. Rastvorljivost radona u podzemnim vodama doprinosi transportu radona iz tla na površinu zemlje, a samim tim ima značajan udio na nivoe prirodnog fona. Procjena porasta koncentracije radona u stanovima ili kućama, kao posljedica korištenja vode koja sadrži rastvoren radon je složen problem. Razlog tome je rastvorljivost radona u vodi, ukupna potrošnja vode u objektima, veličina objekta i jačina ventilacije, slika 4. Procijenjeno je da koncentracija radona od 1000 Bq/L u vodi za piće koja se ispušta iz slavine ili pri tuširanju, u prosjeku povećava koncentraciju radona za 100 Bq/m³ u zatvorenom prostoru [23].



Slika 4. Toplivost plemenitih gasova u vodi na tjelesnoj temperaturi, prikazana kao funkcija atomske mase [24].

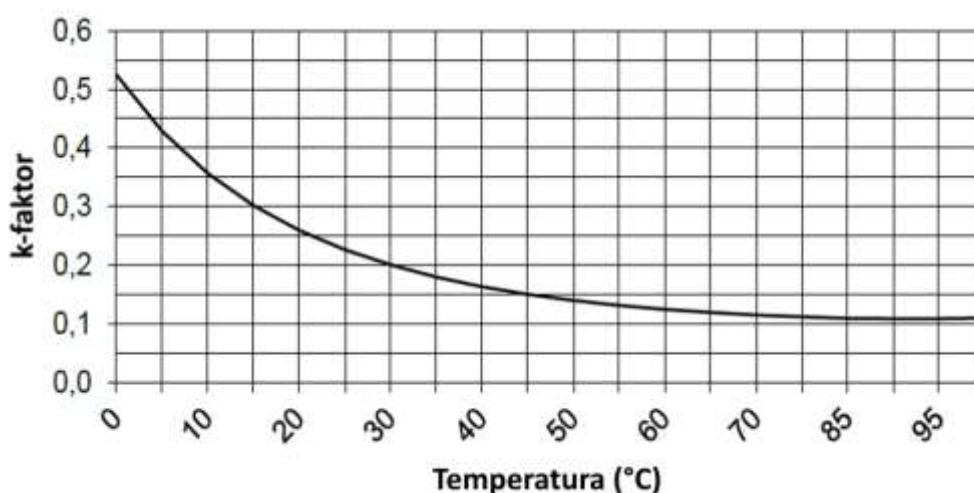
Atomi radona koji su prisutni u vodi, s molekulima vode pod dejstvom Van der Walsovih sila stvaraju metastabilne strukture, tzv. klatrati ($\text{Rn} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). U njima je atom radona polarizovan zbog djelovanja velikog električnog dipolnog momenta molekula vode ($p = 6.2 \cdot 10^{-30} \text{ C m}$), koji stvaraju jaka električna polja na međumolekularnim rastojanjima ($r \approx 0.1 \text{ nm}$). U mastima rastvorljivost radona je sto puta veća nego u krvi, a rastvorljivost u

krvi četiri puta veća nego u vodi. Ova osobina je od velikog uticaja na biološko djelovanje radona. Radon rastvoren u vodi pri ključanju izlazi iz nje, a pri višim pH - vrijednostima pojačano se destabilizuju i razaraju klatrati, čime se radon vraća u gasovitu fazu [24].

Atomi radona mogu da se kreću duž pora u zemljištu putem difuzije (znači nije neophodno da se i voda kreće u porama). S povećanjem poroznosti zemljišta difuzija se povećava, a drastično opada sa povećanjem vlažnosti tla. Prosječna dužina koju radon prelazi difuzijom u suvom zemljištu iznosi 1.6 - 1.9 m, dok u zemljištu sa vodom u porama iznosi 0.01 m [25]. Koeficijent difuzije radona takođe zavisi i od temperature, ima vrijednost oko 0.3 u temperaturnom opsegu od 10°C do 30°C, a na 0°C ima maksimalnu vrijednost od 0.5, a izračunava na osnovu sljedeće relacije:

$$k = 0.106 + 0.405 e^{-0.052t} \quad (1)$$

gdje je k - koeficijent difuzije radona, t - temperatura vode. Zavisnost koeficijenta difuzije radona od temperature prikazana je na slici 5.



Slika 5. Zavisnost koeficijenta difuzije radona od temperature [26].

Nivoi radona u vodi određeni su sadržajem radijuma u stijenama i hidrogeološkim uslovima kretanja vode. Iz tog razloga, sadržaj radona u prirodnim vodama je različit i varira u širokim granicama. U običnim pitkim i rječnim vodama, prosječna koncentracija aktivnosti radona iznosi $3.7 \cdot 10^3 \text{ Bq/m}^3$, a u morskoj vodi $1.1 \cdot 10^3 \text{ Bq/m}^3$, dok u podzemnim vodama nalazi se u intervalu od $(3.7 - 370) \cdot 10^3 \text{ Bq/m}^3$. Visoko radonske vode formiraju se u naslagama travertina obogaćenih radijumom, ili u raznim uransko-radijumskim kristalastim stijenama. Koncentracije radona u vodi bogatoj radonom mogu biti različite i nalaze se u opsegu od 185 Bq/L (nisko koncentrovane radonske vode), do preko 3,000 Bq/L (visoko koncentrovane radonske vode) [27].

Posljednjih godina sve je više naučnih aktivnosti, koja se sprovode u cilju sagledavanja nivoa ozračivanja ljudi radonom i njegovim potomcima raspada, sadržanim u vodama banjskih centara [27]. To se prvenstveno odnosi na vodu koja se koristi u bazenima za kupanje, kao i kadama i kupatilima za inhalaciju. Doza ozračivanja organizma od radionuklida unijetih vodom za piće zavisi od njihove količine u vodi, metabolizma i kinetike u organizmu. Kada se radi o vodi koja se koristi za kupanje i terapiju, najveći doprinos dolazi od inhalacije radona. Ispitivanja i istraživanja sadržaja radona u vodi, od zdravstvenog su značaja kako za posjetioce i pacijente banjskih centara, tako i za stručno osoblje

Referentni nivo koncentracija aktivnosti radona u vodi je 100 Bq/L, dok Akcioni nivo za smanjenje koncentracije radona u vodi iznosi 1000 Bq/L [28]. Odlukom Evropske Komisije iz 2001. godine, godišnja efektivna doza kojoj pojedinac može biti izložen od radona u vodi, ne bi trebalo da prelazi iznos od 1 mSv.

2.1.5. Radioaktivna kontaminacija biljaka

Radioaktivna kontaminacija biljaka nastaje kada radionuklidi iz vazduha, zemlje ili vode dospijevaju na površinu nadzemnih djelova biljaka (lišće, stablo, cvijet) i unose se u organizam biljke. Put unosa radionuklida u biljke može biti trojak:

- Preko lišća (folijarna kontaminacija)
- Preko korijena (radikularna kontaminacija)
- Preko cvijeta (floralna kontaminacija)

Bez obzira na porijeklo i načine na koje su radioaktivne supstancije dospjele u životnu sredinu, one u većoj ili manjoj mjeri ugrožavaju cjelokupni biljni svijet. Stepenn radioaktivne kontaminacije biljaka zavisi od više faktora, od kojih su najznačajniji: nivoi aktivnosti prisutnih radionuklida, fizičko-hemijske osobine medija u kojima se biljke nalaze, morfološko-fiziološke karakteristike biljaka i mineralni metabolizam pojedinih biljnih vrsta.

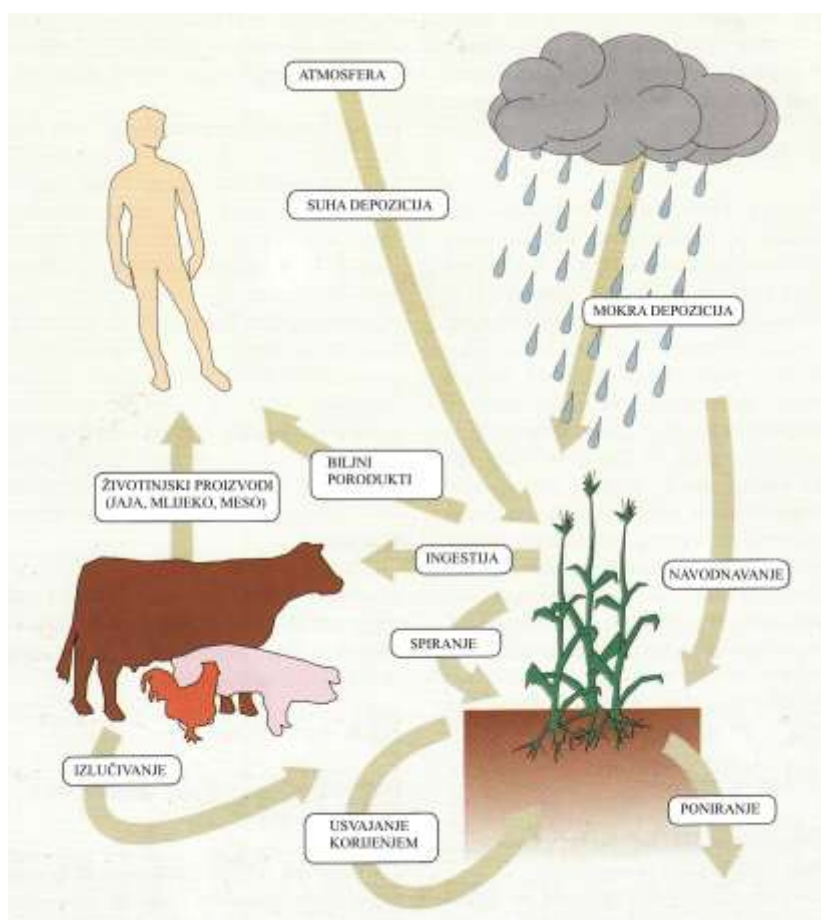
Način na koji se neki radionuklid raspoređuje na različite frakcije zemljišta, određuje i koliko će dugo taj radionuklid ostati na mjestu depozicije i koliko će dugo biti na raspolaganju biljkama. Svakako da postoji još niz faktora koji u većoj ili manjoj mjeri određuju vrijeme zadržavanja radionuklida u onoj frakciji zemljišta koja je bitna za određenu biljnu kulturu.

Za radionuklide prisutne u kopnenom ekosistemu, informacije o njihovoj migraciji u tlu su od posebne važnosti, obzirom da taj proces kontroliše njihovo dugoročno ponašanje u životnoj sredini, njihovu usvajanje florom i faunom preko lanca hrane, ali i njihov potencijal za onečišćenje podzemnih voda. Intenzitet migracije radionuklida u tlu uslovljen je raznim procesima: transportom zbog infiltracije vode (konvektivni transport), prijenos koloidnih i fino dispergovanih čestica (proces difuzije), migracija duž korijenskog sistema biljaka [29]. Apsorpcija radionuklida preko korijena zavisi od velikog broja faktora, među kojima su

najznačajniji: njihova koncentracija u zemljištu i vodi, fizičko-hemijske osobine radionuklida, karakteristike tla i anatomsko-fiziološko odlike biljaka.

Zbog inherentne složenosti i prostorne varijabilnosti sistema tlo - biljka, teško je pouzdano procijeniti transfer radionuklida iz tla u vegetaciju. Parametar koji se obično koristi za procjenu uticaja prisustva radionuklida u životnoj sredini je transfer faktor (TF), koji predstavlja odnos specifičnih aktivnosti radionuklida u tlu i biljkama [30]:

$$TF = \frac{A_p}{A_s} = \frac{\text{aktivnost u biljkama (Bq kg}^{-1}\text{ suhe mase)}}{\text{aktivnost u tlu (Bq kg}^{-1}\text{ suhe mase)}} \quad (2)$$



Slika 6. Pojednostavljeni dijagram prijenosa radionuklida na čovjeka kroz lanac ishrane.

Faktor transfera (TF) daje iznos akumulacije radionuklida iz tla u biljke, i koristi se kao mjera prijenosa radionuklida u lanac hrane. Činioci koji mogu uticati na vrijednosti TF su: karakteristike tla, klimatski uslovi, vrsta biljaka, fizičko-hemijski oblik radionuklida, kao i prisustvo raznih hemijskih elemenata koji usporavaju transportne procese [31].

Vertikalna migracija radionuklida u tlu ima direktan uticaj na nivoe izloženosti spoljašnjem zračenju, pri čemu, koncentracija i raspodjela radioaktivnih elemenata u zoni korijena biljaka, dominantno utiče na prijenos radioaktivnih materija u prehrambeni lanac iz tla do biljaka. Činioci koji određuju varijacije koncentracija radionuklida s dubinom u profilu tla

su: intenzitet kiše, pH, sadržaj organskih materija, sadržaj vlage u tlu, struktura tla, brzina infiltracije, sorpcijska svojstva određenog radionuklida. Biodostupnost kontaminanata iz tla, značajno se razlikuje između različitih biljnih vrsta i kao i godišnjih doba [32, 33].

Unutrašnja raspodjela radionuklida u pojedinim djelovima biljaka, takođe zavisi od puteva unošenja i stepena mobilnosti pojedinih radionuklida.

Bosna i Hercegovina mora se mnogo agilnije uključiti u evropske projekte i aktivnosti u oblasti biomonitoringa radioaktivnosti životne sredine, da bi se ova oblast uredila u skladu sa međunarodnim preporukama posebno u domenu metodologije rada i obrade rezultata, i ti rezultati mogli biti dio jedinstvene evropske mreže monitoringa.

2.2. Veličine i jedinice u dozimetriji zračenja

Dozimetrija jonizirajućeg zračenja obuhvata skup instrumentalnih i teorijskih metoda za mjerenje i proračun doze jonizirajućeg zračenja. Suština dozimetrije je procjena energije koju jonizirajuće zračenje preda sredini, s obzirom da su efekti zračenja proporcionalni dijelu energije zračenja, koji je apsorbovan u datom materijalu. Samo ona energija koju je zračenje predalo materiji uzrokuje niz pojava u materiji i mijenja njena svojstva.

Predana energija definisana je kao razlika ulazne energije E_u i izlazne energije E_i zračenja koje prolazi nekim tijelom

$$E_d = E_u - E_i \quad (3)$$

Doza jonizujućeg zračenja označava predatu energiju jonizirajućeg zračenja određenoj masi materije. Jonizirajuće zračenje prolazeći kroz materiju sudara se s atomima te materije i predaje im svoju energiju, što za posljedicu ima jonizaciju ili ekscitaciju atoma, odnosno molekula. Usljed interakcije s atomima materijala jonizirajuće zračenje gubi dio svoje energije predajući je materijalu stvarajući radijacione efekte. Dejstvo jonizirajućeg zračenja na određenu sredinu zavisi od energije koja se apsorbuje u toma materijalu, vrste zračenja, vrste apsorbenata, vremena izlaganja, itd.

2.2.1. Apsorbovana doza

Energija predata ozračenju materiji je osnovni pokazatelj učinka zračenja, pa je polazna dozimetrijska veličina apsorbovana doza. Apsorbovana doza je osnovna fizička kvantitativna veličina u radijacionoj dozimetriji, a predstavlja dio energije koji apsorbuje jedinica mase ozračenog materijala od jonizujućeg zračenja kojem je izloženo, tj.

$$D = \frac{dE_d}{dm} \quad (4)$$

Apsorbovana doza je nestohastička veličina koja je primjenjiva kako za direktno, tako i indirektno jonizirajuće zračenje, a manifestuje se u vidu jonizacija, ekscitacija, hemijskih promjena i generisanju toplote u materijalima koji su izloženi zračenju [34]. Kod indirektnog jonizirajućeg zračenja energija se predaje materiji u dva koraka. U prvom koraku zračenje predaje energiju naelektrisanim sekundarnim česticama – elektronima, što se opisuje kermom, dok u drugom koraku naelektrisane čestice predaju dio svoje kinetičke energije izloženoj masi, što opisuje apsorbovana doza. Jedinica za apsorbovanu dozu u SI sistemu jedinica je džul po kilogramu (J/kg) i koja je dobila ime grej (Gy), po Louisu Haroldu Grayu:

$$1\text{Gy} = \frac{\text{J}}{\text{kg}} \quad (5)$$

Stara vansistemska jedinica za apsorbovanu dozu je 1rad=10⁻² Gy, odnosno, 1Gy=100 rad (Radiation Absorbed Dose).

Integralna apsorbovana doza predstavlja ukupnu energiju zračenja predatu cjelokupnoj ozračevoj materiji mase m :

$$D_i = mD \quad (6)$$

Jedinica za integralnu apsorbovanu dozu zračenja je 1J.

2.2.2. Brzina (jačina) apsorbovane doze

Efekti jonizirajućeg zračenja zavise ne samo od veličine apsorbovane doze već i od vremena izlaganja zračenju. Ova činjenica je od posebnog značaja za biološke sisteme. Ukoliko dvije jedinice apsorbuju istu dozu zračenja, ali u različitim vremenskim intervalima, posljedice će biti različite. Iz tog razloga uvedena je brzina (ili jačina) apsorbovane doze, koja je brojno jednaka apsorbovanoj dozi u jedinici vremena:

$$\dot{D} = \frac{dD}{dt} \quad (7)$$

Apsorbovana doza se može mjeriti na više načina, no u praksi se informacija o apsorbovanoj dozi dobiva poznavanjem ili određivanjem ekspozicije. Radi ilustracije, brzina apsorbovane doze može se uporediti sa intoksikacijom alkoholom. Veću količinu alkohola koja se konzumira tokom dugog vremena (npr. 1 L žestokog pića u toku jedne godine) zdrava jetra će bez većih štetnih efekata razgraditi, dok, ako se konzumira ista količina alkohola u kratkom vremenu (npr. 1 L žestokog pića u toku 1h) štetni efekat će biti neuporedivo veći.

Pojam jačina doze ili brzine doze ne treba miješati sa pojmom jačine jonizujućeg zračenja. Jačina doze predstavlja energiju zračenja koja ostaje u ozračenoj materiji, dok jačina ili intezitet zračenja predstavlja energiju tog zračenja koje padne na jedinicu površine ozračenog materijala u jedinici vremena. Jedinica za jačinu apsorbirane doze je Grej u sekundi (Gy/s), ili vat po kilogramu ($\text{Gy/s} = \text{J kg}^{-1}\text{s}^{-1} = \text{W/kg}$).

2.2.3. Kerma

Ova dozimetrijska veličina definiše se kao suma početnih kinetičkih energija naelektrisanih čestica koje su oslobođene prilikom djelovanja jonizirajućeg zračenja nenaelektrisanih čestica (fotoni i neutroni) u masi dm određenog materijala [35].

Kerma je skraćenica engleskih riječi Kinetic Energy Released in Medium (slovo a je tu zbog fonetskih razloga). Po definiciji vrijedi:

$$K = \frac{d\bar{E}_{tr}}{dm} \quad (8)$$

Energija fotona se na elektrone prenosi na dva načina: preko kolizionih interakcija (meki i tvrdi sudari) i preko radijativnih interakcija (*bremssstrahlung* i anihilacija elektron-pozitron). Zato je se ukupna kerma sastoji od dvije komponente: jonizacione (koliziona) kerme (K_{col}), i radijativne kerme (K_{rad}). Jonizaciona kerma, K_{col} , je dio kerme odgovoran za proizvodnju elektrona koji svoju energiju oslobađaju u materijalu u vidu jonizacije, što je rezultat Coulombovih interakcija sa elektronima u omotaču atoma. Radijativna kerma, K_{rad} , je dio kerme odgovoran za proizvodnju sekundarnih fotona koji u najvećem broju slučajeva nastaju kada se elektroni usporavaju u materijalu (*bremssstrahlung*). Jedinica za kermu je džul po kilogramu (J/kg), odnosno grej (Gy).

2.2.4. Doza ekspozicije (ekspoziciona doza)

Primarni jonski parovi, elektroni i pozitivni joni, stvaraju se usljed interakcije jonizirajućeg zračenja s atomima ozračenog materijala. Sekundarni jonski parovi se generišu kada primarni jonski parovi oslobode svoju energiju, jonizirajući druge atome materijala. Ukupan broj proizvedenih jonskih parova proporcionalan je s energijom koju zračenje predaje materijalu. Koncept radijacione ekspozicije bazira se na pretpostavci da je apsorber vazduh, i doza izlaganja (ili ekspoziciona doza) odnosi se samo na gama (γ) ili rendgensko (X)-zračenje i ostalo fotonsko zračenje energije manje od 3 MeV, jer za energije fotona veće od 3 MeV teže je odrediti koliko se sekundarnih jonskih parova proizvelo van posmatrane zapremine. Ako je dQ ukupano naelektrisanje, pozitivano i negativano, koje je oslobođeno

tokom djelovanja X ili γ -zraka na malu zapreminu vazduha mase dm , tada je ekspoziciona doza X , u toj zapremini jednaka:

$$X = \frac{dQ}{dm} \quad (9)$$

Jedinica za ekspozicionu dozu je C/kg. 1 C/kg je ona količina X ili gama zračenja koja će u 1 kg materije (vazduhu) stvoriti jone ukupnog naelektrisanja od 1 kulona. Stara jedinica za ekspozicionu dozu je rendgen, $1R = 2.58 \cdot 10^{-4} \text{ C/kg}$, ili, $1\text{C/kg} = 3876 \text{ R}$.

2.2.5. Brzina (snaga) doze ekspozicije (ili brzina ekspozicije)

Za dozimetriju jonizirajućeg zračenja, veoma je važno da se i ekspoziciona doza stavi u odnos s vremenom ozračivanja (eksponiranja ili izlaganja). Brzina doze izlaganja ili brzina ekspozicije, predstavlja ekspoziciju u jedinici vremena:

$$\dot{X} = \frac{dX}{dt} \quad (10)$$

Jedinica za brzinu ekspozicije u SI sistemu jedinica je: $(\text{C/kg})/\text{s} = \text{C}/(\text{kg s}) = \text{A/kg}$

2.2.6. Linearni transfer energije (LET)

Ako je zračenje apsorbovano u biološkoj materiji, jonizacije i eksitacije koje se pri tom pojavljuju nisu distribuirane nasumično, već su lokalizovane duž tragova pojedinačnih naelektrisanih čestica po modelu koji zavisi od tipa posmatranog dejstvujućeg zračenja. U zaštiti od zračenja fizička veličina koja je korisna za definisanje kvaliteta snopa jonizirajućeg zračenja je linerni transfer energije (LET- Linear Energy Transfer). Linearni transfer energije je energija koja se predaje po jedinici dužine traga. LET je kvantitativni izraz za gustinu jonizacije, i predstavlja gubitak energije duž jedinice putanje posmatrane čestice.

Možda je najosnovniji koncept u radijacijskoj dozimetriji distribucija doze s gubitkom energije, zvana LET distribucija. Ovo se odnosi na količinu energije prenesene na ozračenu materiju po jedinici dužine duž čestične staze. Eksperimenti su naime pokazali, da je količina energije lokalno apsorbovana po jedinici dužine, od primarne važnosti za biološka oštećenja. Stoga je predloženo da se raspodjela energije predane tkivu, duž traga čestice, izrazi u predanoj energiji po jedinici dužine, a ne u broju parova jona po jedinici dužine traga. To stanovište je opravdano iz razloga što je broj jona nastao prolazom naelektrisane čestice kroz čvrste ili tekuće materije vrlo nesiguran i može se znatno razlikovati od onog u gasovima.

Specijalna jedinica koja se obično koristi za LET je kiloelektron volt po mikrometru ($\text{keV}/\mu\text{m}$). Međunarodna komisija za radiološke jedinice (Internacional Commission of Radiological Units) je 1962. godine definisala ovu veličinu na sljedeći način: Linearni transfer

energije (L) naelektrisane čestice u mediju je odnos dE/dl , gdje je dE srednja energija predana mediju od naelektrisane čestice specifične energije koja prelazi udaljenost dl .

Tipične vrijednosti LET za zračenja koja se često koriste date su u tabeli 4.

Tabela 4. Tipične vrijednosti LET [36].

Vrste zračenja	LET (keV/ μ m)
150 MeV protoni	0.3
^{60}Co gama-zraci	0.2
250 keV X-zraci	2
^3H beta (0.6 keV)	5.5
^{32}P beta (0.6 keV)	0.25
2.5 MeV neutron	20
10 MeV proton	4.7
^{210}Po alfa (5.3 MeV)	190
Produkti fisije	4000-9000

Tipične LET vrijednosti za γ -zrake, X-zrake i α -čestice u vodi su nekoliko desetina i nekoliko stotina keV/ μ m, respektivno. Razlog zašto X-zrake imaju viši LET od γ -zraka je taj da oni proizvode sekundarne elektrone s nižom energijom koji imaju viši LET

2.2.7. Relativna biološka efikasnost (RBE)

Jednake doze različitih tipova zračenja ne proizvode jednake biološke efekte. Jedan grej neutrona proizvodi veći biološki efekat nego jedan grej X- zraka. Ključ za razlikovanje leži u modelu deponovanja energije na mikroskopskom nivou. Za poređenje različitih zračenja obično se koriste X-zraci kao standard. Definicija relativne biološke efikasnosti je data u sljedećem obliku: RBE nekog testnog zračenja (R) upoređenog s X- zracima definisana je kao odnos D_{250}/D_R gdje su D_{250} i D_R doze X- zraka i testnog zračenja, respektivno, koje proizvode isti biološki efekat.

Da bi izmjerili RBE nekih testnih zračenja prvo treba odabrati biološki sistem u kojem se efekt zračenja može zabilježiti kvantitativno. Radi ilustracije jednog ovakvog procesa poslužiće sljedeći specifičan primjer: mjerenje RBE brzih neutrona, koji se poredi sa 250 kV X-zracima, posmatrajući letalnost biljki koje su zasađene u testni sistem.

2.2.8. Ekvivalentna doza

Apsorbovana doza je osnovna veličina fizičke dozimetrije ali nije u potpunosti dovoljna za svrhe radijacione zaštite, zato što efekat djelovanja na biološke sisteme nije isti od različitih tipova jonizirajućih zračenja. Da bi se procijenio učinak zračenja s obzirom na razne

okolnosti, apsorbovana doza se koriguje tzv. faktorima modifikacije. Učinak raznih vrsta i energija zračenja uspoređuje se s učinkom nekog referentnog zračenja, onog za koje su ti učinci najbolje poznati. Obično se biološka djelotvornost nekog zračenja uspoređuje prema referentnom rendgenskom zračenju proizvedenom uz napon od 200 kV [37].

Faktor kvalitete zračenja ili težinski faktor w_R je jedan od faktora modifikacije. Tako izračunata doza naziva se ekvivalentna doza zračenja H_{TR} , koja se dobija tako što se prosječna apsorbovana doza (D_{TR}) od zračenja R u tkivu ili organu T , pomnoži sa faktorom w_R :

$$H_{TR} = w_R D_{TR} \quad (11)$$

Tako se dobija nova dozimetrijska veličina, ekvivalentna doza jonizirajućeg zračenja, koja najbolje pokazuje učinak zračenja i za praksu je najvažnija dozimetrijska veličina [38]. Parametar w_R je radijacioni težinski faktor, određen relativnom biološkom efektivnošću zračenja, koja je specificirana odnosom apsorbovanih doza jonizirajućeg zračenja R i fotonskog zračenja odgovarajuće energije, koje proizvodi iste biološke efekte.

Kada je radijaciono polje komponovano od više vrsta zračenja sa različitim radijacionim težinskim faktorima w_R , ekvivalentna doza je zbir ekvivalentnih doza pojedinih vrsta zračenja:

$$H_T = \sum_R w_R D_{TR} \quad (12)$$

Tabela 5. Radijacioni težinski faktori zračenja R [39].

Vrsta i energetski opseg zračenja	Radijacioni težinski faktor w_R
Fotoni, svih energija	1
Elektroni i mioni svih energija	1
Neutroni energija :	
< 10 keV	5
10 – 100 keV	10
100 keV- 2 MeV	20
2 – 20 MeV	10
> 20 MeV	5
Protoni > 2 MeV	5
Alfa čestice, fisioni fragmenti, teška jezgra	20

Jedinica za ekvivalentnu dozu u SI sistemu je džul po kilogramu (J/kg) i dobila je ime sivert (Sv). Treba naglasiti da su i grej i sivert samo posebni nazivi za džul po kilogramu. Na taj način se već iz naziva jedinica, grej ili sivert, jasno zna da li je to apsorbovana ili preračunata ekvivalentna doza. Apsorbovana doza od 1 Gy od alfa čestica, dovest će do ekvivalentne doze od 20 Sv. Sivert se koristi da istakne činjenicu da će, na primjer, 1Gy apsorbovanih alfa čestica, izazvati 20 puta veći biološki efekat od 1Gy fotona X zračenja.

2.2.9. Efektivna doza

Efekti oštećenja zbog ekvivalentne doze se razlikuju za različite organe ili tkiva. Zbog toga se ekvivalentna doza za svaki organ i tkivo množi sa tkivnim težinskim faktorom (w_T):

$$H_E = \sum_T w_T H_T \quad \text{ili} \quad H_E = \sum_R w_R \sum_T w_T D_{TR} \quad (13)$$

Ovako uvedena dozimetrijska veličina naziva se efektivna doza, koja je jednaka zbiru proizvoda ekvivalentne doze u tkivu ili organu i odgovarajućeg tkivnog težinskog faktora (w_T). Ova sumacija se vrši za sva tkiva i organe za koje se smatra da su osjetljivi na indukciju stohastičkih efekata zračenja. Vrijednosti w_T predstavljaju udio individualnog organa ili tkiva u ukupnoj štetnosti stohastičkih efekata (tabela 6).

Tabela 6. Težinski faktori osjetljivosti za različita tkiva.

Organi	Tkivni težinski faktori		
	ICRP 26 1977[41]	ICRP 60 1990 [40]	ICRP 103 2007 [39]
Gonade	0.25	0.20	0.08
Koštana srž (crvena)	0.12	0.12	0.13
Debelo crijevo	-	0.12	0.19
Pluća	0.12	0.12	0.16
Želudac	-	0.12	0.12
Dojke	0.15	0.05	0.12
Jednjak	-	0.05	0.04
Jetra	-	0.05	0.04
Štitnjača	0.03	0.05	0,04
Površina kosti	0.03	0.01	0.01
Mozak	-	-	0.01
Koža	-	0.01	0.01
Pljuvačna žlijezda	-	-	0.01
Ostali organi*	0.30	0.05	0.12
Ukupno	1.00	1.00	1.00

Prema najnovijem Izvještaju ICRP-a u ostale organe se ubrajaju: nadbubrežne žlijezde, žučna kesa, srce, bubrezi, limfni čvorovi, mišići, sluznica, gusteraca, prostata (cf), tanko crijevo, slezena, timus, materica/cerviks. Težinski faktor (w_T) uzima u obzir radiosenzitivnost organa ili tkiva, odnosno opisuje dio štetnosti od stohastičkih efekata, koji rezultuju iz izlaganja jonizirajućem zračenju (indukovanje kancera ili genetskih defekata).

Iz gornje tabele 3 se vidi, da je u najnovijem Izvještaju ICRP umanjen značaj gonada kao radiosenzitivnog organa, gdje je težinski faktor smanjen sa 0.20 na samo 0.08. Dojke su

prepoznate kao jedan od najosjetljivijih organa. Težinski faktor tkiva dojki je povećan sa 0.05 na 0.12. Implikacije ove promjene mogu značiti i promjenu lokalnih pravila zaštite pacijenata na radiološkim institucijama. Bitnije je štititi dojke (posebno kod djevojaka u razvoju) u toku snimanja, nego gonade, što je bila dosadašnja praksa. Isto tako, u najnovijem izvještaju među najosjetljivijim organima nalaze i pljuvačne žlijezde, što bi moglo imati uticaja u dentalnoj radiologiji, kao i sagledavanju uticaja kratkoživećih produkata raspada radona, koji se dezintegrišu u regionu usne šupljine.

Isto kao i za ekvivalentnu dozu, jedinica za efektivnu dozu u međunarodnom SI sistemu jedinica je džul po kilogramu (J/kg), koja se naziva svert (Sv).

3. BIOLOŠKI EFEKTI JONIZIRAJUĆIH ZRAČENJA

Ubrzo nakon otkrića X zračenja i prirodne radioaktivnosti, postalo je evidentno da izlaganje radijaciji dovodi do indukcije negativnih efekata na ljudima. Među prvima koji su upozorili na štetno dejstvo novootkrivenog zračenja, bili su Thomas Edison, William Morton i Nikola Tesla, ukazujući na iritacije očiju, koje su se javljale pri eksperimentima s X-zracima i fluorescentnim supstancama. Nikola Tesla već u junu 1896. godine preporučuje da se "eksperimentatori ne bi trebali previše približavati rendgenskoj cijevi" [42]. U novembru 1896. godine, Elihu Thompson, američki fizičar, tražio je da se verifikuje postojanje veze između X zraka i ozljeda. Izložio je svoj mali prst lijeve ruke snopu X zraka i opisao znakove i simptome ozljede: bol, oticanje, krutost, crvenilo i osipanje prsta, što je očigledno bilo povezano s izlaganjem zračenju. Henri Becquerel je 1898. godine, također imao problema s izvorom jonizirajućeg zračenja, radijumom, kojeg su mu dali Curievi. Ovaj radioaktivni element kojeg je nosio u džepu prsluka za vrijeme svojih putovanja i predavanja, prouzrokovao mu je izraženu kožnu eritemu [43]. Početkom prošlog vijeka, osoblje koji je radilo uz rendgenske cijevi, kao i prvi njihovi pacijenti, masovno su umirali od karcinoma kostiju i anemične aplazije.

Širi efekti štetnog dejstva jonizirajućeg zračenja došli su do velikog izražaja poslije prve eksplozije atomskih bombi 1945. godine, koje su bačene na Hirošimu i Nagasaki. Prva atomska bomba od visoko obogaćenog urana, "Little boy", bačena je na Hirošimu, i druga plutonijumska bomba "Fat man" bačena na Nagasaki, koje su preko tkz. tri efekta: udarnog, toplotnog i radijacionog, ubile preko 200,000 civila. Prve kvantitativne studije eksperimentalne radiobiologije razvile su se tokom petdesetih godina prošlog vijeka. Epidemiološke studije preživjelih stanovnika Hirošime i Nagasakija, koji su bili izloženi atomskom bombardovanju, kao i podaci dobijeni iz studija o pacijentima izloženim radioterapijskim tretmanima, obezbjedili su veliku količinu informacija o efektima jonizirajućeg zračenja na zdravlje ljudi.

U biološkim sistemima deponovanje energije zračenja ostvaruje se na atomima i molekulima ćelijskih struktura, pa su njeni glavni recipijenti makromolekule DNK i proteina, intra i ekstra celularna tečnost kao i ostali sastojci ćelija. Danas se zna da efekti jonizirajućeg zračenja zavise ne samo od veličine apsorbovane doze već i od vremena izlaganja zračenju. Ova činjenica je od posebnog značaja za biološke sisteme. Ukoliko dvije jedinice apsorbuju istu dozu zračenja, ali u različitim vremenskim intervalima, posljedice će biti različite. Treba naglasiti, da pojam jačina doze ili brzina doze, ne treba miješati sa pojmom jačina jonizirajućeg zračenja [44]. Jačina doze predstavlja energiju zračenja koja ostaje u ozračenoj materiji, dok jačina ili intezitet zračenja predstavlja energiju tog zračenja koje padne na jedinicu površine ozračenog materijala u jedinici vremena.

Tačna percepcija rizika vezanih za izlaganje jonizirajućem zračenju, zahtijeva dobro razumijevanje njegovih bioloških efekata. U odnosu na zavisnost odgovora organizma na

apsorbovanu dozu, štetni efekti jonizirajućeg zračenja mogu se svrstati u dvije kategorije: determinističke (izvjesne) i stohastičke (slučajne) efekte. Deterministički efekti nastupaju u relativno kratkom vremenu nakon ekspozicije, a nazivaju se deterministički (nestohastički), jer se pojavljuju tek kada doza pređe određeni prag. Ispod praga nema oštećenja koje se može detektovati, jer postoje mehanizmi za oporavak sve dok doza i brzina doze ne pređu neke određene vrijednosti. Stoga ozbiljnost determinističkog efekta zavisi od jačine doze.

Tabela 7. Opsezi doza jonizirajućih zračenja kojima su izloženi pojedinci [12].

Nivoi doza	Opseg apsorbovne doze za nisko-LET* zračenje	Scenariji
visoka	veći od 1 Gy	Tipična doza (za djelimično ili cijelo tijelo) koju primaju pojedinci nakon teških zračenja ili iz radioterapije.
umjerena	od 100 mGy do oko 1 Gy	Doze koju su primili oko 100.000 radnika nakon nesreće u Černobilu
niska	od 10 do oko 100 mGy	Doze koje primaju pojedinci od skeniranja cijelog tijela kompjuterizovanom tomografijom (CT).
veoma niska	manje od 10 mGy	Pojedinačne doze od standardne radiologije (tj. bez CT ili fluoroskopije).

*Na osnovu osobina pojedinih tipova zračenja, izveden je pojam Linearni transfer energije (LET), koji predstavlja energiju zračenja koja se predaje po jedinici dužine traga (puta) jonizujuće čestice kroz sredinu koju prolazi ($\text{keV}/\mu\text{m}$). To je fizička veličina koja se koristi za definisanje kvaliteta snopa jonizirajućeg zračenja (tabela 1). Terminologija koja se koristi za izražavanje raspona doza nisko-LET zračenja ispod 100 mGy kao "niska" u svrhu procjene rizika od raka, uvedena je od strane UNSCEAR 2006 [12].

Deterministički efekti (katarakta, sterilnost, nemaligne promjene na koži, mijelopatija, akutni radijacioni sindrom) su u biti degenerativni. Potrebne su veće doze zračenja da bi se prouzrokovali ovi značajni nestohastički efekti. Dokazi o ovim efektima dolaze iz više izvora, a među njima su najčešće radioterapijski pacijenti, neupućeni radiolozi s početka XX vijeka, ozračeni građani Hirošime i Nagasakija, kao i od osoba koje su ozračene u različitim akcidentalnim situacijama i mnogobrojnim nuklearnim nesrećama [45].

Postoje jasni dokazi da prag iznad kojeg dolazi do determinističkih efekata, zavisi od brzine prijema doze. Na osnovu epidemioloških studija definisana je granična vrijednost niske jačine doze od 0.1 mGy/min (što odgovara 6 mGy/h) [46]. U kojoj mjeri jačina doze, koja je smatra niskom, igra ulogu u nastanku stohastičkih efekata, još uvijek je aktuelno pitanje u naučnoj zajednici.

Izlaganje jonizirajućem zračenju može prouzrokovati i zakasnele efekte. Primjer su maligna oboljenja koja se pojavljuju nakon određenog perioda latencije. Smatra se da se ovi efekti mogu pojaviti na svim dozama - da ne postoji prag na kojima se oni pojavljuju. Stohastički efekti (*engl.* stochastic - proces koji se bazira na slučajnosti) kao što su mutacije,

nasljedne promjene, tumori, vidljivi su tek nakon određenog vremena latenacije. Njihova je pojava neredovna, nasumične prirode i nema definisan prag doze. Ovi efekti mogu nastati u somatskim ali i u polnim ćelijama, te se promjene mogu prenijeti na potomstvo (nasljedne promjene, leukemija, mentalna retardacija, malformacije, smrt ploda). Vjerovatnoća nastanka ovih efekta varira linearno s apsorbovanom dozom, dati efekti su nezavisni od jačine doze, a sve doze su kumulativne.

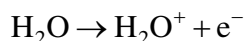
3.1 Direktno i indirektno djelovanje zračenja

Kada se ćelije izlože jonizirajućem zračenju, prvo se pojavljuju standardni fizički efekti između zračenja i atoma ili molekula ćelija, a kasnije uslijede moguća biološka oštećenja. Kada se energija jonizirajućih zračenja apsorbuje u ćeliji, oštećenja u ćeliji mogu nastati usljed direktnog ili indirektnog djelovanja zračenja.

Ukoliko je bilo koji oblik zračenja, X ili gama zraci, naelektrisana ili nanaelektrisana čestica, apsorbovana u biološkom materijalu, postoji određena vjerovatnoća da će ono interagovati direktno s kritičnim metama u ćelijama. Zračenje unosi višak energije u energetski stabilan sistem ćelija odnosno u organizam. Pri tome atomi ili molekuli ćelija mogu biti jonizovani ili eksitovani (dva primarna načina prijenosa energije zračenja na materiju), što inicira niz događaja koji vode ka biološkom oštećenju. Ovo su dominantni procesi kada je u pitanju zračenje s visokim LET (*linearni transfer energije*), kao što su neutroni ili alfa čestice.

Dakle, molekuli u nekom biološkom sistemu mogu primiti energiju direktno od zračenja, pri čemu bivaju jonizovani (ili eksitovani), ali mogu je primiti i indirektno, prijenosom sa drugih molekula (pri čemu se ne isključuje istovremena pojava oba dejstva).

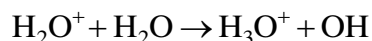
Živi organizam sastavljen je od neogranske komponente - molekula vode i minerala, kao i od organskih molekula - proteina, lipida, ugljenih hidrata, nukleinskih kiselina i međuproizvoda u metabolizmu. Kako u sastavu ćelija voda učestvuje sa najvećim procentom (najčešće od 60 do 80 %), pri interakciji s fotonima X ili gama zraka, ili naelektrisanim česticama, kao što su protoni ili elektroni, molekuli vode mogu se jonizovati na sljedeći način:



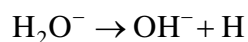
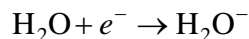
Molekul H_2O^+ je jonski radikal. Molekularni fragment s nesparenim elektronom zove se slobodni radikal. Slobodni radikal sadrži nespareni elektron u spoljašnjoj ljusci, tako da je visoko reaktivan.

Radikal H_2O^+ je i naelektrisan a ima i nesparen elektron, zbog toga je i jon a takođe i slobodni radikal. Bitna karakteristika jonskih radikala je što imaju veoma kratko vrijeme poluživota, reda 10^{-10} sekundi. Oni raspadom formiraju slobodne radikale, koji nisu

naelektrisani ali još uvijek imaju nespareni elektron. U slučaju vode, jonski radikali reaguju sa drugim molekulama vode i formiraju visoko reaktivne hidroksilne radikale (OH):

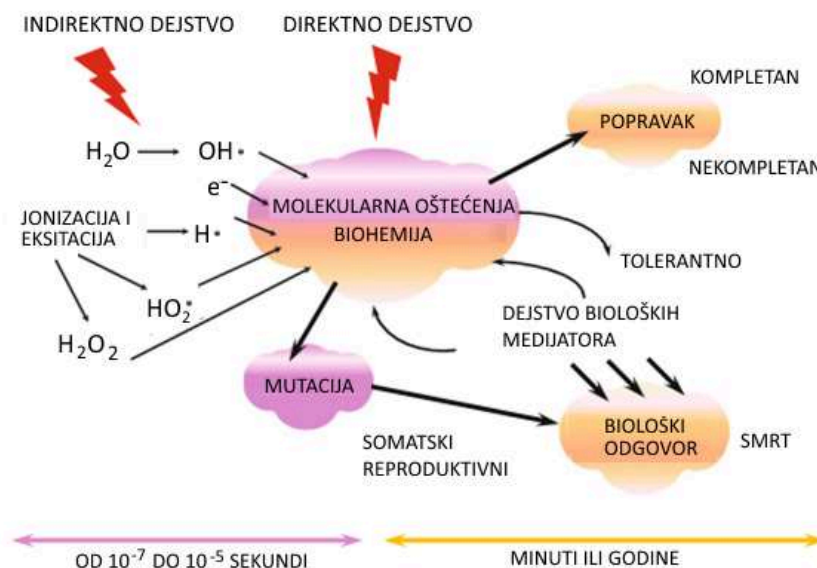


Hidroksilni radikal posjeduje devet elektrona, takođe, jedan od njih je nesparen. To je veoma reaktivan slobodni radikal i može difuzno preći određenu udaljenost i dostići kritičnu metu u ćeliji. Na primjer, izračunato je da oko dvije trećine oštećenja DNA uzrokovanih X-zracima u ćelijama sisara potiče od hidroksilnih radikala. Elektron koji se oslobodio u procesu ozračivanja molekule vode, kreće se među molekulama vode i kad izgubi dio kinetičke energije, ući će u jednu od tih molekula i u njoj se zaustaviti. Vežući se za molekulu vode, elektron je čini nestabilnom, zbog čega se molekula vode raspada:



U ovom dijelu reakcije takođe će nastati jedan OH^- jon koji će se vezati u metaboličkim reakcijama. Osim njega nastao je slobodni radikal, vodonikov atom sa slobodnom valencom, koji ima veliku hemijsku aktivnost poput hidroksilnog radikala iz prvog dijela reakcije radiolize. Slobodni radikali ne mogu opstati samostalni u ćelijskom miljeu, jer se u nekoliko mikrosekundi vežu za okolne molekule. Kao rezultat radiolitičkog raspadanja vode jonizacijom i ekscitacijom, vodonik i hidroksilni radikali mogu se kombinovati i formirati reaktivna jedinjenja kao što je vodonik peroksid (H_2O_2). Radikali H, OH, HO_2 i H_2O_2 , reaguju s drugim molekulima koji su prisutni u biološkom sistemu. Radikal H je vrlo snažan redukujući agens, a radikali OH i HO_2 snažni oksidati, kao što je i vodonik peroksid. Ove reakcije dovode do obrazovanja novih tipova molekula u biološkim sistemima.

Reakcija slobodnih radikala s drugim molekulima u biološkom sistemu zavisi od koncentracije ovih molekula i od njihove veličine, brojnosti i reaktivnosti. Neorganski molekuli (npr. minerali), koji se u organizmu nalaze u obliku anjona i katjona, bivaju redukovani u reakciji sa H, a oksidovani u reakciji sa OH i HO_2 kao i sa molekulima H_2O_2 . Međutim, u prisustvu molekularnog kiseonika, radikali H prelaze u radikale HO_2 , koji će vršiti oksidaciju, tako da je ukupni efekat zračenja na neorganske molekule u tom slučaju njihova oksidacija. Na slici 7 ilustrovani su efekti direktnog djelovanja energije radijacije, uzrokujući jonizaciju bioloških molekula, i indirektnog djelovanja preko slobodnih radikala, generisanih u procesu jonizacije molekula vode koji okružuju ćeliju.



Slika 7. Fizički, biohemijski i biološki mehanizmi odgovora [47].

Slobodni radikali, koji su nastali u vodenom rastvoru, ukoliko nisu u potpunosti inaktivisani od strane popravljачkih mehanizama u ćeliji, reaguju sa molekulima ćelije, s organskim molekulima, tako što odvajaju iz njih atome H ili djelove makromolekula (preostali dio molekula naziva se organski radikal), odnosno kidaju molekulske veze [48].

Za biološke efekte zračenja od posebnog značaja su organski radikali, koji obično stupaju u reakciju s drugim radikalima ili s molekularnim kiseonikom, usljed čega nastaju novi molekuli. U procesu jonizacije, proteini mogu izgubiti funkcionalnost svojih amino grupa, ugljeni hidrati se razlažu na sastavne djelove, lipidi će trpjeti peroksidaciju, enzimi doživljavaju deaktivaciju ili modifikuju svoje ponašanje [49]. Međutim, jonizirajuće zračenje pravi najveći udar na najosjetljivije strukture ćelije, hromosome, u kojima ima najviše molekula DNK, koje imaju informacije o funkcionisanju i reprodukciji ćelija, koje su ključne za preživljavanje ćelija.

Jedan od pionira u zaštiti od jonizirajućeg zračenja, Švedski radiolog Rolf Sievert, koji je 1926. godine na Karolinskom institutu u Stockholmu nadzirao terapiju zračenjem, istakao je na međunarodnom sastanku 1950. god. da "nema poznatih nivoa tolerancije za zračenje" [14]. Nivo tolerancije je nivo ispod kojeg ne postoji oštećenje (često se označava kao prag). Nivo sigurnosti obično iznosi deseti dio od nivoa tolerancije [14].

3.2. Citogenetički efekti zračenja

Genotoksični efekti predstavljaju sve promjene u strukturi i funkcionisanju genetičkog materijala koje izazivaju genotoksični faktori. Pod tim promjenama najčešće se podrazumjevaju mutacije koje se odnose ne samo na promjene u genetičkom materijalu, već i

na sam proces koji dovodi do tih promjena. Generalno, mutacije su kvalitativne ili kvantitativne promjene u nasljednom materijalu koje imaju za posljedicu mijenjanje određenih fenotipskih osobina [50].

Proces nastajanja mutacija (mutageneza), bilo da je nastao indukcijom ili spontano, izazvan je različitim fizičkim, hemijskim i biološkim faktorima spoljašnje ili unutrašnje sredine s postojećim genetičkim materijalom, i moguće je na različitim nivoima organizacije genetičkog materijala. Za razliku od spontanih mutacija, koje nastaju slučajno u organizmu bez uočljivog djelovanja nekog mutagenog faktora, indukovane (izazvane) mutacije su posljedica dejstva poznatih ili nepoznatih fizičkih, hemijskih ili bioloških agenasa na eksponirani genetički materijal.

Klasifikaciju mutacija moguće je izvršiti na osnovu većeg broja kriterijuma. U zavisnosti da li mutacije zahvataju tjelesne ili polne ćelije, dijele se na somatske (tjelesne) i germinativne mutacije. Polne mutacije se sukcesivno prenose na potomstvo, dok se somatske mutacije mogu fenotipski ispoljiti, ali se ne prenose u naredne generacije. Prema jačini dejstva genotoksičnih agenasa na fenotip, mutacije mogu biti: tihe, neutralne, štetne i letalne. Tihe mutacije se fenotipski ne ispoljavaju i većina mutacija je takva. Neutralne mutacije ne izazivaju nikakav štetan efekat već dovode do obrazovanja različitih dominantnih i recesivnih alela koji daju razlike u npr. boji očiju ili kose. Štetne mutacije dovode do razvoja nasljednih bolesti, dok letalne izazivaju smrt u embrionalnom i fetalnom razviću ili u različitim periodima poslije rođenja [51].

Na osnovu količine zahvaćenog genetičkog materijala, mutacije mogu uzrokovati promjene redoslijeda i sastava nukleotida u molekuli DNA koje zahvataju samo pojedine gene (genske mutacije), mogu zahvatiti hromosome i izazvati strukturne ili numeričke promjene (hromozomske aberacije), ali i cijele genome - genomske mutacije. Osim ovih mutacija postoje i plazmatske mutacije (plazmamutacije, ekstranuklearne mutacije), kao posebna kategorija mutacija, koje se događaju u citoplazmatskim nosiocima genetičkog materijala (npr. u mitohondrijalnoj i plastidnoj DNK) [52].

3.2.1. Genske mutacije

Genske mutacije zahvataju pojedinačne gene, a nastaju promjenom u hemijskoj strukturi funkcionalne sekvence DNK, koja zauzima određeni genski lokus i kontroliše odgovarajuće funkcije, odnosno osobine organizma. Genske mutacije nastaju supstitucijom, insercijom ili delecijom nukleotida. U istom organizmu, u nekim genima su mutacije češće i ti geni s visokim stopama mutacija nazivaju se nestabilnim ili mutabilnim (stopa mutacija održava ukupnu proporciju određenih gena u populaciji koji mutiraju po jednoj generaciji). Iako nisu dovoljno poznati mehanizmi nastanka mnogih mutacija, tri mehanizma se navode kao presudno značajna: preciznost replikativne mašinerije, efikasnost brojnih mehanizama

reparacije oštećene DNA molekule i stepen izloženosti mutagenim agensima [51]. Promjene na molekulu DNK mogu biti:

➤ Supstitucije (tačkaste mutacije) su zamjene jednog nukleotida i njegovog para u komplementarnom lancu DNA molekule. Dije se na tranzicije i transverzije. Tranzicije predstavljaju supstitucije pri kojima se jedan pirimidinski nukleotid zamjenjuje drugim pirimidinskim nukleotidom (C u T ili T u C) ili jedan purinski drugim purinskim nukleotidom (A u G ili G u A), dok se kod transverzija pirimidinski nukleotid zamjenjuje purinskim (A>C, G>C, A>T ili G>T) ili obrnuto. Posljedice tačkastih mutacija unutar strukturnih gena mogu izazvati različite promjene u aminokiselinskim sekvencama proteina, i prema tim efektima razlikuju se:

- a) Tihe (eng. *silent*) ili sinonimne mutacije – koje ne dovode do promjena u značenju kodona (degenerativnost genetičkog koda),
- b) Nesinonimne ili mutacije pogrešnog smisla (eng. *missense*) – uzrokuju promjenu kodona koji kodira drugačiju aminokiselinu i
- c) Besmislene (eng. *nonsense*) mutacije – mijenjanju određeni kodon u neki od stop kodona što izaziva prijevremeni završetak translacije pa se obrazuje previše kratak najčešće nefunkcionalan protein [53].

➤ Insercije predstavljaju umetanje jednog ili više nukleotida, a delecije gubitak jednog ili više nukleotida u molekuli DNA. Nukleotidi koji se gube ili insertuju za posljedicu imaju promjenu otvorenog okvira čitanja (eng. ORF-open reading frame) genetičkog koda od mjesta nastanka mutacije (eng. frameshift mutation). Na taj način nastaje protein čiji je redosljed aminokiselina nepovezan i izmjenjen [54].

3.2.2. Hromozomske aberacije

Hromozomske aberacije (mutacije) su promjene u količini i rasporedu nasljednog materijala, koje su po pravilu primjetne pri odgovarajućem mikroskopskom posmatranju i predstavljaju odstupanja od normalne strukture ili broja hromozoma [50]. Hromozomske aberacije mogu nastati spontano ili pod uticajem različitih genotoksičnih agenasa (jonizirajuća zračenja, hemijski agensi, virusi, itd.), a otkrivaju se klasičnim citogenetičkim analizama hromozoma u mitozu i mejozi. S citogenetičkog stanovišta, posebno su interesantni hromozomski mutageni efekti pošto se mogu citološki posmatrati [55]. Hromozomske aberacije predstavljaju pouzdane biomarkere ekspozicije, efekta i osjetljivosti primljenih doza jonizirajućih zračenja.

Svaka hromozomska aberacija najčešće ispoljava negativan efekt na funkcionalnu aktivnost ćelije, rast i razvoj organizma, te ima važnu ulogu u humanoj patologiji. Nepovoljni učinak hromozomske aberacije zavisi od vrste aberacije, veličini i specifičnoj funkciji aberacijom pogođenog hromozoma. Istraživanja hromozomskih aberacija i savremena saznanja iz oblasti citogenetike, našla su veliku primjenu u biomedicinskim eksperimentalnim

naukama [53]. U citogenetičkim istraživanjima, u zavisnosti od toga da li predstavljaju promjene u građi ili broju hromozoma, hromozomske aberacije klasifikovane su u dva osnovna tipa: strukturne i numeričke hromozomske aberacije.

3.2.2.1. Strukturne hromozomske aberacije

Strukturne hromozomske aberacije su anomalije hromozoma gdje postoji rearanžman u genetskom materijalu unutar hromozoma. Strukturne aberacije hromozoma nastaju zbog manjka, viška ili prestruktuiranja određenih dijelova hromozoma primarno uzrokovanim poprečnim lomom (prekidom), i često su praćene promjenom morfološkog izgleda hromozoma. Mutageni koji indukuju strukturne aberacije hromozoma označeni su kao klastogeni ili izohromatidni lomovi, odnosno aberacije hromozomskog tipa (chr) jer se odražavaju na obje sestrinske hromatide. U slučaju da se lom dogodi nakon replikacije DNA molekule u S ili G₂ fazi ćelijskog ciklusa, nastaju aberacije hromatidnog tipa (cht) [56].

Najjednostavnije oštećenje hromozomske strukture je gap, koji se manifestuje kao ahromatična lezija jedne hromatide ili zahvata jednake lokuse na obje hromatide istog hromozoma. Gapove obično uzrokuju promjene u suptilnoj strukturi DNA, koje utiču na sposobnost kondenzacije DNA i formiranje metafaznih hromozoma. Za razliku od gapa, hromatidni (chtb) i hromozomski lom (chrb) predstavljaju jasan prekid kontinuiteta hromatide, odnosno hromozoma. Lomovi su najučestalije strukturne aberacije hromozoma. Hromozomski lom rezultira acentričnim fragmentom (ace) i abnormalnom monocentričnim hromozomom. Minuta fragment (min) je acentrični fragment manji od širine jedne hromatide i može biti hromatidni ili hromozomski [56].

Razlikuju se nekoliko tipova intrahromozomskih strukturnih aberacija: delecije (del), inverzije (inv), duplikacije (dup), izohromozomske i intrahromozomske translokacije (t).

➤ Delecije nastaju kao posljedica loma, pri čemu se acentrični fragment od hromozoma odvaja i gubi. Posljedice delecije zavise od veličine izgubljenog fragmenta, kao i broja i funkcije na njemu lociranih gena [56]. Ako su delecije lokalizovane u terminalnim regijama hromozoma, onda se nazivaju terminalnim delecijama. Terminalna delecija oba kraka može rezultirati stvaranjem prstenastog ili ring (r) hromozoma koji posjeduje centromeru, a deletirani terminalni acentrični dijelovi se kasnijim diobama izgube. Intersticijalna delecija je gubitak dijela hromozoma između dva loma u središnjem dijelu [57]. Najčešće dovodi, uz dvostruki lom i njegovu reparaciju, obično do spoja mjesta hromozomskog loma, ali i do gubitka acentrične hromozomske regije zahvaćene lomovima.

➤ Inverzije predstavljaju dvostruki lom uz okret od 180° fragmenta hromozoma koji su zahvaćeni lomom. Ako se lom desi na oba kraka, jedan ispod, a jedan iznad centromere, pa intervalni dio obuhvata i centromeru, inverzija je pericentrična (per inv). U slučaju kada su oba loma na istom hromozomskom kraku, pa invertirani dio nije zahvatio centromeru, inverzija je paracentrična (para inv) [58].

➤ Duplikacija je hromozomska mutacija u kojoj je dio hromozoma prisutan u duplikatu, te funkcionalno predstavlja trisomično stanje za duplicirane genetske lokuse. Ako su duplicirani segmenti jedan uz drugi, onda se to označava kao tandem duplikacija.

➤ Izohromozom (i) je tip nebalansirane strukture aberacije koja nastaje poprečnom diobom centromere. Kraci p i q tada obrazuju telocentrične hromozome. U sljedećoj replikaciji od telocentričnih nastaju metacentrični hromozomi (izohromozomi) s identičnim genetičkim materijalom u oba kraka.

➤ Intrahromozomska translokacija-pomak nastaje usljed tri loma na jednom hromozomu, kada se dio hromozoma, segment između dva loma, premješta iz svog normalnog položaja i ponovo uključuje u isti hromozom na mjestu trećeg loma (transpozicija). Interhromozomske aberacije nastaju premještanjem (translokacijom) ili razmjenom segmenata između dva ili više hromozoma, zavisno od broja lomova i zahvaćenih hromozoma [56]. Razlikuje se nekoliko tipova interhromozomskih aberacija: translokacije (t), dicentrični hromozomi (dic), marker hromozomi (mar), insercije (ins).

➤ Translokacija je najčešći primjer interhromozomske promjene. Ona može biti posljedica premještanja nasljednog materijala jednog homolognog hromozoma na drugi [57]. Translokacije su recipročne ili simetrične kada ne dolazi do gubitka genetičkog materijala. U morfološkom smislu translokacije mogu biti simetrične, kada su translocirani segmenti jednake veličine. Kod asimetričnih translokacija translocirani segmenti su nejednake dužine, pa je morfološka promjena hromozoma evidentna.

➤ Translokacije-insercije nastaju kao posljedica tri loma, dva na jednom hromozomu između kojih se odvaja fragment i insertuje se na mjestu loma drugog hromozoma. Nastaje hromozom sa delecijom i derivat hromozom (der) sa insertovanim dijelom drugog nehomolognog hromozoma. Recipročne translokacije nastaju kao posljedica međusobne razmjene hromozomskih segmenata između nehomolognih hromozoma [59]. U zavisnosti od mjesta ugradnje fragmenata jednog u drugi hromozom mogu biti terminalne i intersticijske. Rezultat razmjene su dva monocentrična derivat hromozoma. Robertsonova translokacija ili centrična fuzija je najčešći oblik interhromozomskih rearanžmana u humanoj populaciji. Prilikom ove translokacije najčešće dolazi do istovremenog prekida na jednom hromozomu iznad, a na drugom ispod centromere. Spajanjem dugih krakova ovih hromozoma nastaje jedan veći metacentrični ili submetacentrični hromozom, a ako se spoje kratki kraci, nastaje jedan mali minutni hromozom koji je nestabilan i najčešće se dezintegriše, a gubitak kratkih krakova ne ostavlja posljedice na fenotip.

➤ Dicentrični hromozom nastaje kao posljedica lomova i spajanja dva hromozoma od kojih svaki sadrži centromeru. Dicentrik mogu formirati dva različita hromozoma ili može nastati spajanjem homolognih hromatida, pri čemu nastaje izohromozom. Marker hromozom je abnormalan, strukturno rearanžiran hromozom drugačiji od drugih hromozoma genoma koji se analizira. Može nastati nakon lomova s gubitkom acentričnog fragmenta. Markeri mogu

biti i izohromozomi ili normalni hromozomi s heteromorfim varijantama [56]. Dicentrični hromozom je glavna aberacija koja se koristi u biodozimetriji.

3.2.2.2. Numeričke aberacije hromozoma

Varijacije u broju hromozoma kreću se od gubitka jednog ili više hromozoma u kariotipu, do umnožavanja kompletnih garnitura hromozoma. Stanja hromozomskog komplementa s viškom ili manjkom jednog ili više hromozoma označena su kao aneuploidije. Aneuploidije su rezultat nerazdvajanja hromozoma u mitozu ili mejozi. Nerazdvajanje može biti primarno, ako je zametna ćelija euploidna, ili sekundarno, ako je zametna ćelija već heteroploidna, odnosno aneuploidna. Nastanak aneuploidije relativno rano u embriogenezi vodi ka stvaranju više ćelijskih linija sa različitom konstitucijom hromozoma porijeklom od istog zigota u istom organizmu i ova pojava se naziva mozaicizam [60].

Nedostatak jednog hromozoma u diploidnom genomu naziva se monosomija ($2n-1$), a uvećanje broja hromozoma za jedan predstavlja trisomiju ($2n+1$). Dalja terminologija se bazira na eventualnim promjenama broja hromozoma u svakom paru homologa (nulsomija $2n-2$, tetrasomija $2n+2$, pentasomija $2n+3$, itd.). Stanje kariotipa u kojem je prisutan jedan ili veći broj kompletnih setova hromozoma, karakterističan za određenu vrstu, naziva se euploidija [51].

Endoreduplikacija (end) je poseban tip nuklearne poliploidizacije koji se manifestuje multiplim, uniformnim kopijama hromozoma. Ovaj fenomen je zajednički za animalne i biljne ćelije, mada je rjeđi u animalnim ćelijama, a posebno je prisutan u tkivima sa visoko izraženom metaboličkom aktivnošću [61]. Ciklus endoreduplikacije uključuje dva sukcesivna sintetska perioda DNA (ES_1 i ES_2) bez mitotskog procesa, te rezultira formiranjem diplohromozoma u sljedećoj metafazi mitoze. Diplohromozomi su vidljive mitotičke manifestacije ovog fenomena i sastoje se od četiri hromatide, umjesto dvije, jer nakon dva ciklusa replikacije DNA nije došlo do njihovog odvajanja [62].

3.2.3. Genomske mutacije

Genomske mutacije imaju za posljedicu izmjenu normalnog euploidnog broja hromozoma za n tj. za jedan ili više haploidnih setova hromozoma. Prema porijeklu dodatnih hromozomskih garnitura, poliploidija može biti autopoliploidija (dupliranje ili udvostručavanje sopstvenog genoma) ili alopoliploidija (heteroploidija, amfipoliploidija: dodavanje stranih genoma putem hibridizacije) [63]. U humanom genomu su opisane triploidija, $3n = 69$ hromozoma i tetraploidija, $4n = 92$ hromozoma. Mehanizmi nastanka triploidije su najčešće poremećaj mitoze u gonijama (pri čemu nastanu neredukovani, diploidni gameti), i dispermija (oplodnja haploidne oocyte s dva haploidna spermatozoida). Tetraploidija nastaje uglavnom u postzigotnom stadiju supresijom diobe zigota poslije

udvostručavanja hromozoma i razdvajanja hromatida, nakon čega izostane citokineza, pa u istoj ćeliji ostanu svi ($2 \times 2n$) hromozomi, ili pak fuzijom dva diploidna zigota. Tetraploidne ćelije u kulturi su obično artefakti procesa kultiviranja.

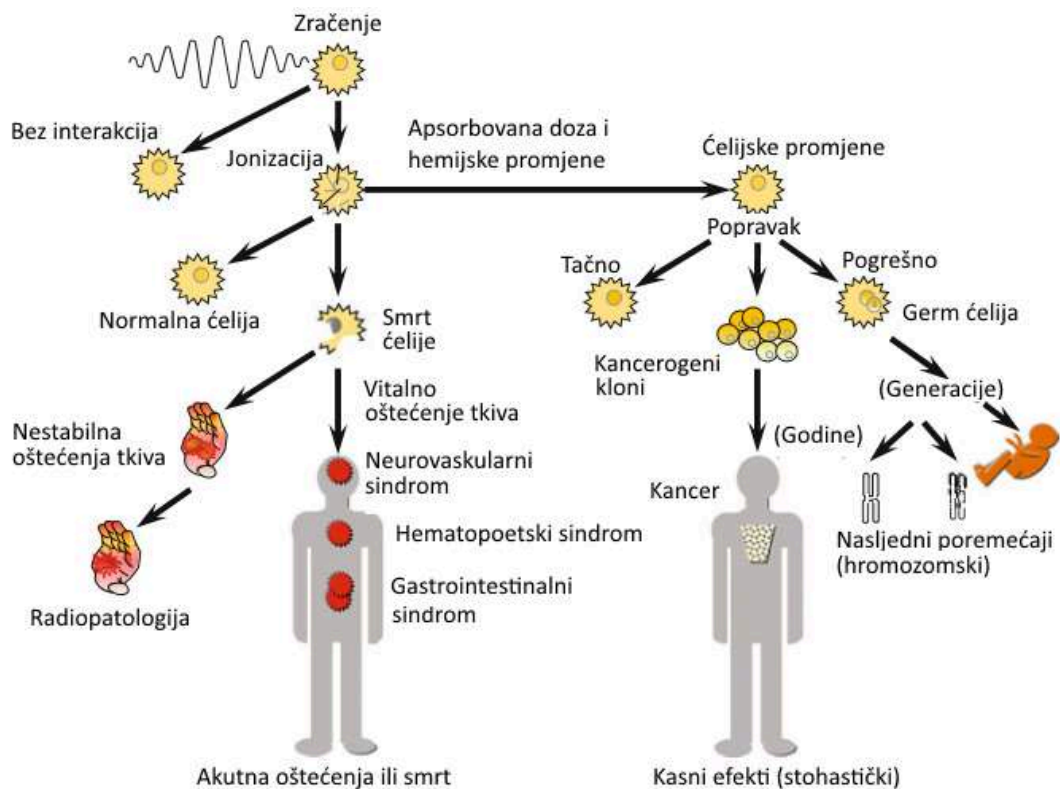
3.2.4 Apoptoza i nekroza kao parametri citotoksičnosti

Svaka ćelija posjeduje znatne mogućnosti adaptacije na uticaj sredine mijenjajući svoju strukturu i funkciju. Ukoliko je uticaj spoljašnje sredine i suviše jak i prelazi granice fiziološke adaptacije, ćelija se neće moći adaptirati i umire. Adaptira se uvećanjem ili smanjenjem svoje aktivnosti, a u ekstremnim uslovima čak i promjenom građe diferenciranih ćelija. Smanjenje ćelijske aktivnosti ogleda se u smanjenju njene veličine i broja. Tako smanjenje broja ćelija dovodi do atrofije tkiva ili organa, a posljedica je smanjenje ćelijskih metaboličkih funkcija.

Nekroza nastaje kao posljedica spoljašnje povrede celularnih organela ili bolesti koje se mogu morfološki uočiti, i dovodi do niza nereguliranih, regresivnih morfoloških promjena, koje variraju od lize do koagulacije celularnih proteina. Nekrotične ćelije mijenjaju tkivni ambijent, oslobađajući citokine i otpočinjući procese upale i zarastanja. U procesu nekroze najprije dolazi do ranih promjena na plazma membrani. Ove promjene rezultuju gubljenjem ravnoteže između natrijuma i kalcijuma. Proces se dalje razvija tako što dolazi do gubljenja oksidativne fosforilacije i pada ATP produkcije, što se zatim ogleda u zaustavljanju svih sintetskih procesa u ćeliji.

Apoptoza (grč. apoptosis - opadanje) je programirana ćelijska smrt i smatra se da je pod genetskom kontrolom, javlja se u fiziološkim i patološkim procesima u organizmu. Otpočinje djelovanjem specifičnih regulatornih signala, i napreduje preko preciznih i kontrolisanih promjena organela. U ozlijeđenom tkivu ovi procesi se često odvijaju zajedno; apoptoza nastaje kasnije, radi uklanjanja teško oštećenih ćelija, koje bi mogle dovesti do bioloških poremećaja [64]. Uprkos razlikama između nekroze i apoptoze, ti procesi dijele nekoliko zajedničkih metaboličkih i morfoloških promjena – procesa koji su reverzibilni ali, ako nisu kontrolisani, brzo dovode do ćelijske smrti. Te rane promjene u ćeliji, koje su zajedničke za oba puta, nekrozu i apoptozu, uključuju: nestanak ATP (energetske rezerve), acidifikaciju (pad pH) citoplazme, porast koncentracije Ca^{2+} u citoplazmi i aktivaciju litičkih enzima.

Pouzdana procjena genetskog rizika povezanog s izloženošću čovjeka jonizirajućem zračenju, suočava se sa brojnim nesigurnostima, dijelom zbog činjenice što nije moguće direktno potvrditi mutacije u ljudskoj populaciji izazvane radijacijama. Procjene se stoga u osnovi zasnivaju na opštem znanju iz područja ljudske genetike, i na ekstrapolacijama rezultata dobivenih iz eksperimenata na životinjama. Na slici 8 prikazane su dvije moguće putanje na kojima jonizirajuće zračenje utiče na cijelo tijelo.



Slika 8. Uticaj zračenja na cijelo tijelo [47].

Pored odbrambenog mehanizma reparacije postoje eksperimentalni dokazi i za stimulativni proces adaptacije pokrenut slabim prethodnim kondicioniranim dozama zračenja, koji su otkriveni u humanim limfocitima i nekim ćelijama kod miševa. Ovakvi ćelijski odbrambeni odgovori su prolazni i podložni individualnim varijacijama. Pošto je ustanovljeno da efikasnost reparacije DNK nije apsolutna, drugi odbrambeni proces ćelijske adaptacije se vjerovatno odvija uporedo s procesima mutacije DNK i predstavlja naknadni efekat. Odnos između stimulisanoć ćelijskog oporavka i rezidualnog oštećenja još uvijek nije sasvim jasan.

3.3. Biološki efekti radona

Visoka smrtnost rudara centralne Evrope bila je zapažena još u 16 vijeku, ali se došlo do zaključka tek krajem 19 vijeka da je rak pluća uzrok ove pojave. Mjerenja koncentracije aktivnosti radona u rudnicima Schneeberg i rudnicima Jachymov (iznosi su bili u intervalu od 70 - 120 kBq/m³), tridesetih i četrdesetih godina 20 vijeka, ukazala su da je kancer pluća rudara u tim rudnicima, uzrokovan visokim nivoima radioaktivnog gasa radona. Time je konačno, poslije skoro 500 godina, odgonetnut uzrok misteriozne smrti u ovim rudnicima, nazvane “Bergsucht” ili “Mountain Sickness”. Uslijedila su mjerenja koncentracije aktivnosti radona u rudnicima vodećih industrijskih zemalja svijeta. Ova mjerenja su potvrđivala

štetnost radona na ljudsko zdravlje, svijest o riziku od raka pluća kod rudara polako ali uprono je sazrijevala. To je konačno potaklo motivaciju za profesionalni odnos prema radioaktivnom gasu radonu, dalo nove i efikasnije smjernice zaštite u podzemnim rudnicima, posebno rudnicima urana [20].

Na temelju značajnog iskustva stečenog kroz mnogobrojna istraživanja zdravstvenog uticaja radona u rudnicima urana, kao i u ostalim rudnicima, radon i radioaktivni radonovi potomci su identifikovani kao uzročnici plućnog karcinoma [9, 65, 66, 67]. Epidemiološke studije o nivoima aktivnosti radona u podzemnim rudnicima, postale su glavna osnova za procjenu kvantitativnih rizika od raka pluća, povezanih s izloženosti radonu i radonovim produktima raspada. Začudjuće je da prostor gdje čovjek boravi i do 70% vremena u toku svog života, stambeni prostor, nije bio prioritet u početnim fazama istraživanja koncentracija radona. Mjerenja koncentracije aktivnosti radona u vazduhu u zatvorenom stambenom prostoru, izvršena su prvi put u 225 kuća u Švedskoj, čiji rezultati su zvanično objavljeni 1956. godine. Inicijativu za ova istraživanja dao je Rolf Sivert, a pokazala se kao opravdana, jer je u određeni broj kuća koje su bile izgrađene od poroznog betona s povećanim sadržajem ^{226}Ra , koncentracija radona bila upadljivo veća od ostalih kuća. Ova istraživanja nisu pobudila pažnju međunarodne stručne javnosti, jer se smatralo da imaju lokalni značaj, pa su pala u zaborav [20].

Povratak interesovanja za ovaj radioaktivni gas bio je tek 20 godina kasnije, opet u Švedskoj, povodom štednje energije zbog naftne krize. Komisija Švedske Vlade tom prilikom ukazuje da je problem radona opšti problem, i da on postoji i van Švedske. UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation), ubrzo reaguje time što u Izvještaju iz 1982. godine [9], po prvi put uzima u obzir i doprinos radona prosječnom izlaganju zračenju u prirodnim uslovima. Isto tako, 1983. godine ICRP (International Commission on Radiological Protection), u svojoj publikaciji ICRP-39, Principles for Limiting Exposure of the Public to Natural Sources of Radiation, daje prve preporuke za ovaj prirodni specifični radionuklid [68].

Istraživanja u Švedskoj dala su motiv za sistematska mjerenja koncentracije radona u stambenim i radnim prostorima širom svijeta. Koncentracije unutrašnjeg radona u zgradama, školama i uredima, na lokacijama u svijetu, variraju u rasponu od 10 - 10,000 Bq/m³ [69]. Dok nisu izvršena sistematska mjerenja, rizici izloženosti radonu u domovima su prvobitno procjenjeni ekstrapolacijama iz rudarskih studija. Sada postoje više od 20 studija, Evropskih, Sjevernoameričkih i Kineskih, koje daju jasan dokaz, da povećana učestalost raka pluća je značajno povezana s koncentracijom aktivnosti radona.

Primarni put izlaganja čovjeka radonu je inhalacija preko respiratornog trakta. Disajni putevi čovjeka čine kompleksan labirint cijevi, koje se granaju od traheje u stotine hiljada manjih uzastopnih cjevčica (bronhiola). Bronhiole se dalje granaju u milione sićušnih puteva, čiji se krajevi završavaju sićušnim vrećicama ili alveolama. Radioaktivni aerosoli većih poluprečnika u udahnutom vazduhu ne dopijevaju daleko, mnogi se filtriraju dlačicama u

nosnoj duplji, manje čestice se odlažu kako prolaze kroz trakt, neke se u sudarnim procesima zaustavljaju. Frakcija čestica koje su određenog poluprečnika, stići će u alveolarni prostor.

Ranije se pretpostavljalo da su produkti dezintegracije radona zaostaju na mjestu raspada i da je se emitovana energija apsorbuje u rizičitim tkivima. Kasnije je uzeta u obzir apsorpcija jedne količine alfa energije u mukusu disajnih puteva i odstranjivanje čestica kroz transport u mukusu nazad do usta, odakle se gutaju ili izbacuju van. Neki produkti raspada radona mogu biti apsorbirani od strane makrofaga (pokretnih ćelija) i preneseni dalje obično do limfnih čvorića, a neki produkti mogu ostati na istom mjestu dezintegracije za dug vremenski period.

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) je identifikovala hroničnu izloženost stanovništva radonu i njegovim produktima raspada, kao drugi uzrok raka pluća kod pušača duvana, i najčešći uzrok raka pluća kod nepušača. Procjenjena prosječna godišnja efektivna doza od inhalacije ^{220}Rn i njegovih potomaka iznosi $70 \mu\text{Sv}$, a usljed inhalacije ^{222}Rn i njegovih potomaka je oko 1.2 mSv [9, 70]. Izloženost radonu pri inhalaciji u zatvorenim prostorijama uzrok je oko 10% svih smrtnih slučajeva uslovljenih kancerom pluća [71]. Iz tog razloga se problem nivoa radona u životnoj sredini tretira sa posebnom pažnjom.

Referentni nivo Svjetske zdravstvene organizacije za unutarašnju koncentraciju radona iznosi 100 Bq/m^3 . Ako se taj nivo ne može postići zbog realnih specifičnih uslova, preporuka WHO je da taj nivo ne smije biti veći od 300 Bq/m^3 , što odgovara godišnjoj efektivnoj dozi od 10 mSv . Ova je preporuka u skladu s osnovnim Međunarodnim sigurnosnim standardima i najnovijim preporukama krovne svjetske organizacije za zaštitu od zračenja, ICRP-a [72].

Opservirani karcinom pluća kod određenog pojedinca, ne može nedvosmisleno biti pripisat isključivo izloženosti radonu. Do sada ne postoji jasan način razlikovanja indukovanog raka pluća od radona, i onoga koji se javlja od drugih uzroka, naročito od pušenja. Međutim, postoje dokazi o sinergističkoj interakciji između pušenja i radona, slika 8. Drugim riječima, broj karcinoma izazvanih radonom kod svih pušača, veći je od očekivanih aditivnih učinaka samog pušenja i samog radona. Prema procjenama US EPA, radon je uzrok broj jedan raka pluća među nepušačima, a drugi vodeći uzrok raka pluća poslije pušenja [6].

Tabela 8. Polazni i procjenjeni životni rizik od raka pluća od izloženosti radonu: date su vrijednosti zasebno za muškarce i žene, u zavisnosti od toga da li puše ili ne [73].

^{222}Rn koncentracija (Bq/m^3)	Povećan rizik	Zaključno o životnom riziku od karcinoma pluća (%)			
		Muškarci koji puše	Muškarci koji ne puše	Žene koje puše	Žene koje ne puše
Nulti nivo	0%	12	0.9	6.8	0.6
100	16%	14	1.0	7.9	0.7
150	24%	15	1.1	8.4	0.7
300	48%	18	1.3	10	0.9
400	64%	20	1.5	11	1.0

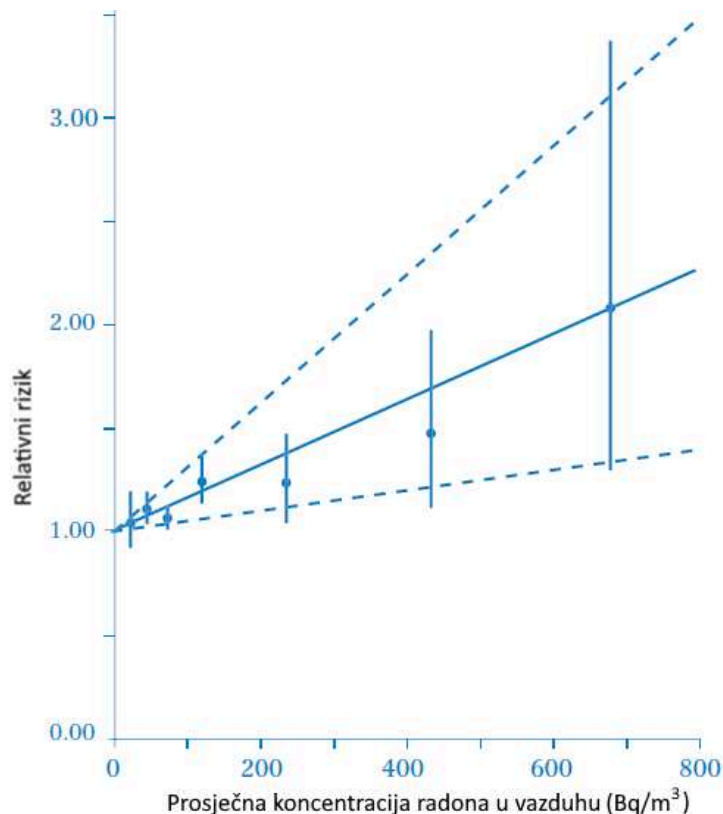
Značajnu ulogu u ukupnom ozračivanju stanovništva ima sadržaj radona u vodi za piće, ali i vodi koja se koristi i za druge svrhe. To se prvenstveno odnosi na vodu koja se koristi u bazenima za kupanje, kao i kadama i kupatilima za inhalaciju rekreaciono-liječilišnih centara. Najopsežnija istraživanja vezana za rizik od radona u vodi, data su u Izvještaju naučnog odbora SAD za procjenu rizika od radona u vodi za piće [74]. Podzemne vode se često kreću kroz stijene koja sadrže radijum, koji u procesu dezintegracije otpušta radon u vodu.

Doza ozračivanja organizma od radona unijetog vodom za piće, zavisi od njegove koncentracije aktivnosti u vodi, metabolizma i kinetike radona u organizmu. Godišnja efektivna doza koju primi stanovništvo usljed ingestije radona, računa se po formuli [75]:

$$H_E = K V C t \quad (14)$$

gdje je H_E godišnja efektivna doza usljed ingestije ^{222}Rn (Sv), K je ingestioni dozni konverzioni faktor, koji za ^{222}Rn iznosi $8.4 \cdot 10^{-8}$ Sv/Bq, V je dnevna zapremina vode koja se popije po stanovniku (1 L/dan), C je koncentracija ^{222}Rn (Bq/L), t je vrijeme trajanja konzumacije vode (365 dana).

Složenost sagledavanja dozimetrijskog uticaja radona na biotičke sisteme ogleda se i činjenici, što su radon i njegovi kratko i dugo živeći produkti raspada alfa, beta i gama emiteri. Ovi razni oblici jonizirajućih zračenja, s raznim energijama i fizičko-hemijskim tendencijama, daju čitave lepeze bioloških efekata na putu transporta radona kroz tkiva organizama. Pošto se radon rastvara u vodi, tijelu i krvi, zračenje koje emituje radon i njegovi produkti radioaktivnog raspada, atakuje na osjetljive ćelije u želucu i drugim organima, nakon što se apsorbuje u krvotok. Lako se apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta i distribuira među tkivima, dijelom zbog velikog koeficijenta emanacije, kao i zbog njegove relativne rastvorljivosti u krvi i tkivima. Ovaj proces dezintegracije radona mora se ozbiljno uzeti u obzir kod procjene bioloških efekata radona, jer brzo dovodi do visokotoksičnih α aktivnih izotopa ^{218}Po , ^{214}Po , ^{210}Po i dugoživećeg izotopa olova ^{210}Pb ($T_{1/2}=22.3$ g), koji je jedan od najdominantnijih radiotoksičnih beta-aktivnih prirodnih radionuklida, slika 9.



Slika 9. Relativni rizik od raka pluća u zavisnosti od višegodišnje prosječne koncentracije unutrašnjeg radona, prema podacima Evropske udružne studije [76].

Američka agencija za zaštitu okoline (Environmental Protection Agency) predložila je referentnu vrijednost za radon u vodi, pod nazivom "Maksimalnu nivo kontaminacije" (MCL), koji u vodi za piće iznosi 300 pCi/L (11.1 Bq/L). Zbog realnih okolnosti, ova vrijednost je ubrzo revidirana, uvođenjem "Alternativnog maksimalnog nivoa kontaminacije" koji iznosi 146 Bq/L [77]. Evropska unija 2001. godine predložila je da referentni nivo koncentracije aktivnosti radona u vodi bude 100 Bq/L, iznad kojeg se preporučuje pojačani nadzor nad izvorima vode, dok se iznos od 1000 Bq/L je akcioni nivo, koji se uzima za granicu, kada je nužno uspostaviti mjere za zaštitu javnog zdravlja [78]. Koncentracija aktivnosti radona u zatvorenom prostoru od 200 Bq/m³, i koncentracija aktivnosti radona u vodi od 1000 Bq/L, daju ekvivalentni doprinos godišnjoj efektivnoj dozi.

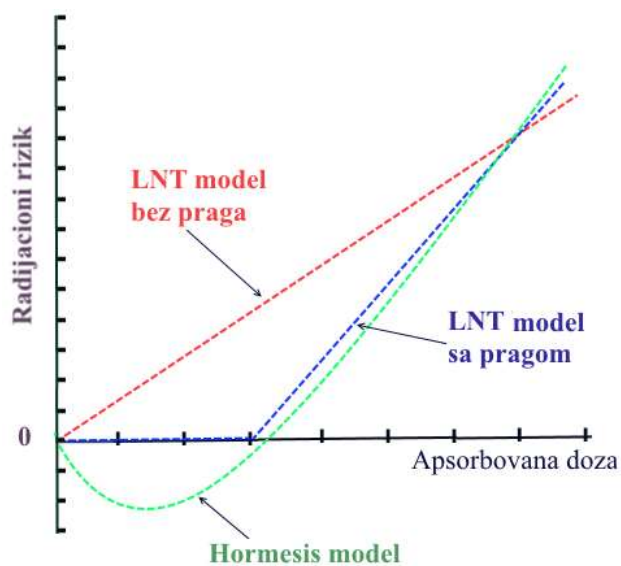
Bez obzira što je radon jedan od najopsežnije istraženih ljudskih karcinogena, koji je najuvjerljivije dokazan u epidemiološkim istraživanjima kancera pluća kod podzemnih rudara, efekat malih doza još nije dovoljno razriješen. Razvojem novih dozimetrijskih modela i novih mjernih sistema, koji su prilagođeni realnim mjernim uslovima, upotpunjavaće se saznanja o biološkim efektima radona i njegovih produktima raspada [20].

3.4. Radijacioni hormezis

U mnogim istraživanjima uticaja zračenja na širu populaciju, ili na populaciju radnika koji se bave ozračivanjem, politika različitih svjetskih regulatornih agencija je bila da se usvoji LNT model (linearni, bez praga), zasnovan na visokoj doznoj ekspoziciji, koji je prihvaćen za primjenu na radijacionu sigurnost i efekte doze. Izloženost jonizirajućem zračenju je sveprisutna, i pouzdano je utvrđeno da umjerene i visoke doze uzrokuju loše zdravlje i mogu biti smrtonosne. Ekstremno stanovište LNT hipoteze je da nulta doza ne postoji, pa i ne postoji nulta vjerovatnoća nastanka radijacionih efekata.

U području istraživanja uticaja jonizirajućeg zračenja na biološke sisteme, postoji veći broj eksperimentalnih i epidemioloških dokaza koji ne podržavaju upotrebu modela LNT za procjenu rizika pri izlaganju malim dozama zračenja. Prvenstveno treba imati u vidu činjenicu, da biološki procesi zavise od više faktora, da traju dugo, da se ne mogu isključiti efekti prilagođavanja ćelija i hormesis efekti, što je suprotno LNT - tvrdnji. Ove činjenice predstavljaju polazne tačke za kritiku LNT modela. U januaru 2015. godine, u SAD je prihvaćeno pokretanje postupka moguće zamjene trenutno važećeg LNT modela u zaštiti od zračenja, Hormesis modelom [79].

Hormesis se definiše kao proces u kojem male doze hemijskog agensa ili sredinskog faktora, koje imaju oštećujuće efekte pri velikim dozama, ostvaruju stimulišući efekat na organizam, integrišući fundamentalne koncepte adaptacije i klimatizacije [80]. Radijaciona hormeza je teorija, koncept, da biološki sistemi mogu pozitivno reagovati na izlaganje malim dozama jonizirajućeg zračenja, koje je toksično u velikim iznosima [81]. Na slici 10, dat je kvalitativni prikaz zavisnosti veličine radijacionog rizika od doze zračenja u polju malih doza na osnovu tri modela.



Slika 10. Kvalitativni prikaz zavisnosti veličine radijacionog rizika od doze zračenja u polju malih doza na osnovu tri modela.

Razlika između ovih modela je u tome, što prema prvom, svaka dodatna izloženost zračenju bez obzira na nivo, je opasna, dok prema drugom je suprotno - ne samo da nije opasna, već može biti i korisna, ako je dovoljno niska. Sa slike 10 se vidi, da model hormesis daje U-zavisnost, u kojoj je radijacioni rizik negativan ili da efekat zračenja na tom nivou izloženosti ne samo da nije štetan, već je koristan za organizam. Samo kada doza izloženosti postane veća od određenog nivoa, radijacioni rizik ponovo raste. Za razliku od modela LNT, Hormezis model pretpostavlja da postoje adaptivni/zaštitni mehanizmi stimulirani niskim dozama zračenja, koji mogu spriječiti negativne efekte po zdravlje [82, 83]. Velike i male radijacione doze izazivaju suprotne reakcije na organizme. Radijaciona doza koja izaziva odgovor koji odvaja pozitivne od negativnih efekata je granična doza, tzv. "nula ekvivalentna tačka" (engl. zero equivalent point, ZEP). Niska doza je svaka doza ispod ZEP-a [83]. Veći broj naučnih radova je pokazao da male doze i iznosi doze niskog (LET) zračenja, aktivira sistem zaštitnih procesa u organizmu, koji su odgovorni za stimulaciju intracelularnih i međucelijskih signalnih puteva, koji dovode do aktiviranja prirodne zaštite protiv genomske nestabilnosti.

Ključne komponente zračenja izazvanog hormetskog odgovora su eliminacija preneoplastičnih i drugih nenormalnih ćelija apoptoze, indukuju puteve popravke DNA, aktiviraju imunološke funkcije organizma, neutraniliziraju slobodne radikale, aktiviraju membranske receptore. Niske doze zračenja (gama ili X-zračenja) su označene da aktiviraju zaštitnu epigenetičku signalizaciju među normalnim ćelijama, koja olakšava upravljanje opasnošću za gene koja može uslijediti u budućnosti [83, 84, ...] Na taj način, niske doze zračenja mogu stimulirati imunitet i protiv raka [85, 86,...]. Postojanje zaštitnog adaptivnog odgovora (definisan je kao privremena modulacija odbrambenih mehanizama aktiviranih malim dozama), prvenstveno je u funkciji odgovora na naknadne visoke doze izlaganja [87].

Najdugotrajna i najobimnija istraživanja vezana za efekte radijacije, vršena su na populaciji preživjelih u Hirošimi i Nagasakiju, u razdoblju od 1950. do 1982. godine, a obuhvatala su 91,231 preživjela stanovnika ovih gradova, potvrdila su efekte radijacione hormeze. U ovoj studiji utvrđeno je da se kod stanovnika koji su bili ozračeni dozama većim od 50 mSv, registrovane su povećane učestalosti raka, dok se u stanovništvu, koji je bilo ozračeno dozama od 5 mSv do 50 mSv (ove doze uzimaju se za male doze), uočeno je smanjenje učestalosti raka [88].

Kada se radi o izloženosti stanovništva radioaktivnom gasu radonu, pozitivno sagledavanje radijacione hormeze dobija više na značaju. Poznata je činjenica da liječenje radonom je jedna od najstarijih terapija kojom su se ljudi koristili i kojom se i danas koriste. Inhalacija se zasniva na udisanju kontrolisanih koncentracija aktivnosti gasa radona ili raspršenih čestica potomaka radona u vazduhu [89]. Poznate su radonske banje u Njemačkoj, Austriji, Francuskoj, Češkoj, Italiji, Srbiji (Niška Banja), Japanu, itd. Terapija radonom u ovim banjama se koristi pri liječenju mnogih bolesti, primjenjuje se kod akutnog i hroničnog reumatizma, povoljno djeluje na neke kožne, endokrine, respiratorne i alergijske bolesti.

Kroz epidemiološke studije svakim danom se sve više potencira značaj primjene radijacione hormeze kod biljaka, bakterija, gljiva i sisara. Mnogobrojna istraživanja širom svijeta su pokazala, da se niskim dozama jonizirajućeg zračenja može povećati prinos poljoprivrednih usjeva, smanjiti vrijeme klijanja, ubrzati rast sadnica i generisati nove sorte pojedinih biljnih vrsta. I iz drugih mnogobrojnih razloga koji su nedosmisleno dokazani, Nuklearna regulatorna Komisija SAD prihvatila je prijedlog XLNT grupe za pokretanje postupaka zamjene LNT-a sa Hormesis modelom, i predložila je sljedeća ograničenja za primjenu u praksi rada s izvorima zračenja i u poljima zračenja:

- 1) 50 mSv/g, granica doze za profesionalce sa dopuštenjem do 100 mSv/g efektivne doze ako je izloženost hronična;
- 2) ALARA potpuno odbaciti, jer nema smisla smanjivati dozu zračenja, koje ne samo da su bezopasne, već mogu biti i hormetične (korisne);
- 3) Doze za stanovništvo izjednačiti sa dozama za profesionalce. Ako su male doze hormetične, zašto lišiti stanovništvo ove vrste pogodnosti;
- 4) Ne uvoditi posebne granične doze za trudnice, embrione i fetuse, kao i za djecu mlađu od 18 godina.

Niske doze u rasponu mGy izazivaju dvostruki učinak na ćelijsku DNK. Jedan efekat se odnosi na relativno malu vjerovatnoću oštećenja DNK po jednom događaju deponovanja energije, sa mogućim prolaznim efektima. Drugi efekat donosi lako opažljivu adaptivnu zaštitu od oštećenja DNK iz bilo kojih, uglavnom endogenih izvora, u zavisnosti od tipa ćelije, vrste i metabolizma. Adaptivna zaštita funkcioniše u smislu prevencije i popravljivanja oštećenja DNK, aktivira imunološke stimulacije, a razvija se sa zakašnjenjem od nekoliko sati, a može trajati i mjesecima, ali obično nestaje u dozama iznad 100 do 200 mGy [90].

U savremenoj dozimetriji koristi se Rizik kao osnova za zaštitu od zračenja. Očito je da poteškoće u smanjenju nesigurnosti i smanjenju intervala pouzdanosti procjene rizika i danas postoje, i drastično rastu u režimu niskih doza. To se prije svega odnosi na sagledavanje pragova niskih doza, razumijevanje bioloških odgovora na niske doze izloženosti zračenju, odnosu zračenja i endogene oksidacione štete. Savremena radijaciona biologija nam pokazuje da je biološki odgovor na zračenje veoma složen proces, kao što su popravka DNK, apoptoza ćelije, nadzor imunološkog sistema. Isto tako, ova naučna disciplina danas uspješno dolazi do kvalitativno različitih odgovora na molekularnom nivou, niskih doza zračenja u odnosu na izlaganja visokim dozama zračenja, pri čemu se misli na činjenice da neki biološki procesi izazvani niskim dozama zračenja imaju zaštitnu i korisnu ulogu.

4. BIOINDIKATORI JONIZIRAJUĆIH ZRAČENJA

Biomonitoring je dio ekološkog monitoringa - praćenja stanja životne sredine na osnovu fizičkih, hemijskih i bioloških pokazatelja. Bioindikatori su biljni ili životinjski organizmi koji akumuliraju hemijske elemente ili jedinjenja iz životne sredine i ukazuju na izloženost i kvalitet biote. Bioindikacija je ocjena bioloških efekata na osnovu reakcije organizama usljed raznih izloženosti u životnoj sredini, kako od toksičnih jedinjenja tako i od drugih stresora. Bioindikaciju je moguće izvoditi na svim nivoima organizacije živih sistema, počevši od molekularnog nivoa, preko biohemijsko-fiziološkog, celularnog nivoa, individualnog, populacionog, biocenološkog (ekosistemskog), završno sa biosfernim.

Živi svijet suočava se sa naglim promjenama i sa sve većim brojem zagađujućih materija, koje mogu ugroziti gotovo sve ekosisteme. Zato su nužni intenzivniji naponi da se obezbijede integrisane informacije o stanju i razvoju kvaliteta životne sredine. Biomonitoringom se omogućava otkrivanje ranih bioloških promjena koje mogu dovesti do dugoročnih fizioloških poremećaja. Za razliku od hemijskog monitoringa, kojim se za procjenu prisustva zagađujućih materija u ćelijama i tkivima koriste hemijske analize, biomonitoringom se procjenjuje ne samo prisustvo, nego i ono što je značajnije, odgovor organizama na polutanate, kao i procjena uticaja efekata polutanata na molekule, ćelije, tkiva/organe i organizam. Danas postoje različite nuklearne metode praćenja koncentracija radiopolutanata u životnoj sredini. U razvijenim zemljama EU, razrađena je i biološka metoda praćenja kvaliteta životne sredine - biomonitoring.

Za procjenu dugoročnog uticaja jonizirajućih zračenja na životnu sredinu, potreban je ogroman broj podataka o: količini rasutog radioaktivnog materijala, hemijskom obliku - jedinjenju, fizičkom vremenu poluraspada i biološkom vremenu polueliminacije, aktivnosti, odnosno procijenjenoj dozi, načinima ekspozicije, putevima kontaminacije, kretanju izotopa u prirodi. Bez obzira što se metoda bioindikatorskih organizama, razvila i primjenjuje od kasnih šezdesetih godina prošlog vijeka u detekciji zračenja, još uvijek ne postoji visoki stepen standardizacije u nacionalnim i međunarodnim strategijama upravljanja kvalitetom životnom sredinom. To se smatra najvažnijom preprekom ugradnji biomonitoringa u obavezujuće zakonske propise, a time i glavnim ograničavajućim faktorom njegovog intenzivnijeg korištenja u detekciji zračenja, koji bi otvorili nove inovativne pristupe za napredak u toj oblasti. Naravno, različite metode bioindikacije nikako ne isključuju standardne nuklearne analitičke instrumentalne metode, nisu njima konkurentne već komplementarne metode u cjelovitom praćenju stanja i trendova radiološkog opterećenja životne sredine.

Na organizame, populacije, biocenoze i na kraju cjelokupne ekosisteme prirodno utiču brojni biotički i abiotički faktori stresa, među kojima jonizirajuća i nejonizirajuća zračenja imaju posebnu ulogu. Pri normalnim varijacijama kvaliteta i kvantiteta zračenja, biološke vrste sa različitim uspjehom izlaze nekako u kraj tim neizbježnim promjenljivim uslovima u

životnoj sredini. Međutim, nivoi tolerancije organizama pri ekstremnim varijacijama jonizirajućih zračenja naglo opadaju (deterministički efekti), u zavisnosti od vrste organizama. Informacije o radiosenzitivnosti bioindikatora i specifičnosti njihovih reakcija na jonizirajuća zračenja, daju dragocjenu osnovu za procjenu bioloških efekata jonizirajućih zračenja na čovjeka (usljed izloženosti zračenju iz prirodnih izvora, akcidentalnih događaja, medicinskih aplikacija, itd.).

Laboratorijski rad na bioindikatorima u velikoj mjeri zavisi od instrumentalne mjerne opreme, kako bi se dobile pouzdane informacije od bioindikatora. Kada se postavlja pitanje "bioindikacija ili direktno instrumentalno mjerenje" parametara u životnoj sredini, čini se da ovaj odnos nije u potpunosti razumio. Praktični laboratorijski problemi koji se susreću u biomonitoringu, često su isti kao i u instrumentalnim analizama. S obzirom na najčešće nespecifične stresne reakcije organizama, primarni zadatak bioindikatora je opšte određivanje fizioloških efekata, a ne direktno mjerenje koncentracije stresora u životnoj sredini [91].

Razlog zašto su bioindikator i biomonitor pouzdani i prikladni za dobijanje ključnih informacija o kvalitetu životne sredine jeste taj, što organizmi nastanjuju okoliš i odražavaju promjene u okolišu kao cjelini, na vrlo integriranom nivou. Jedna od prednosti bioindikacije leži u niskim troškovima, jer oprema u većini slučajeva ne sadrži sofisticirane elemente visoke tehnologije [92]. Za razliku od tih pozitivnih aspekata korištenja bioindikata, bitna nepovoljnost njihove primjene leži u činjenici, što dobijene informacije mogu biti uzrokovane mnoštvom prisutnih stresora, što dovodi do poteškoća u upoređivanju podataka specifičnih doprinosa.

Bioindikator se danas sa velikim uspjehom koriste kao indikatori radioaktivne kontaminacije životne sredine. Upotrebom bioindikatora može se verifikovati pojava povišenja koncentracija radionuklida u raznim ambijentalnim sredinama, odrediti njihova prostorna i vremenska distribucija, pratiti lokalne, regionalne i supraregionalne nivoe zagađenja, detektirati „hot spots“ zagađenja. Zbog svih ovih prednosti, očekuje se da će u skoroj budućnosti ova biološka metoda postati obavezna kao dopuna radiomonitoringu koji se provodi pomoću nuklearnih mjernih metoda.

Za realizaciju ove doktorske disertacije, kao testni organizam - bioindikator, koristio se *Allium cepa* L. koji ima niz prednosti u odnosu na druge kratkoročne test sisteme.

4.1. *Allium cepa* L. kao test organizam

Zbog opšte važnosti za procjenu rizika, otkrivanje genotoksičnih supstanci i sagledavanje njihovih efekata na organizme u životnoj sredini je prioritetan zadatak. Genotoksični stresori se mogu citološki otkriti celularnom inhibicijom, poremećajem u metafazi, indukcijom hromozomskih aberacija, numeričkih i strukturnih, u rasponu od hromozomske fragmentacije do dezorganizacije mitotskog vretena, a samim tim i svih sljedećih zavisnih mitoznih faza [7]. Više biljke prepoznate su kao izvrsni genetički modeli za otkrivanje mutagena u životnoj sredini, i često se koriste za praćenje radioaktivnog opterećenja. Te funkcije sa velikom pouzdanošću i efikasnošću vrši bioindikatorski sistem, vaskularna biljka *Allium cepa* L.

Bioindikator *Allium cepa* usvojen je od strane Međunarodnog programa za biološka istraživanja bilja (IPPB), za praćenje ili testiranje zagađivača životne sredine [93, 94]. *Allium cepa* je jedna od najpogodnijih biljaka za otkrivanje različitih vrsta ksenobiotika, i danas je referentan genetski model za procjenu zagađujućih materija u okolini. Ovaj bioindikator zadovoljava većinu bitnih zahtjeva koji su potrebni u biomonitoringu [94], među kojima su najvažniji:

- a) dinamika rasta korijena je veoma osjetljiva na zagađivače;
- b) postojanja jasnog i brzog odgovora na genotoksične stresore;
- c) postojanja jasnih mitotskih faza;
- d) postojanja stabilnog broja hromozoma i stabilnog kariotipa;
- e) postojanja raznolikosti u morfologiji hromozoma;
- f) rijetkog javljanja spontanog hromozomskih oštećenja.

Bioindikator *Allium cepa* omogućava procjenu široke lepeze citogenetičkih efekata, kao što su hromozomske aberacije i poremećaji u mitotičkom ciklusu, čime se mogu predvidjeti oštećenja DNK i u humanim hromozomima kada su izloženi sličnim agensima. Analiza hromozomskih promjena služi kao test mutagenosti i jedna je od rijetkih direktnih metoda za mjerenje oštećenja u sistemima izloženim mogućim mutagenima ili karcinogenima. Ove analize daju osnovu za brze i osjetljive metode biomonitoringa zagađenja i procjene efekata toksičnih i mutagenih supstanci u prirodnom okruženju [95, 96]. Za pouzdanu procjenu učinaka ili oštećenja koje uzrokuju mutageni agensi, nužno je da uzorak bude u stalnoj mitotičkoj podjeli tokom ćelijskog ciklusa. Za tu svrhu se sa velikim uspjehom koristi bioindikator *Allium cepa* [97]. Isto tako, mitotički indeks i indeks replikacije koriste se kao indikatori adekvatne proliferacije ćelija, a koji se pouzdano mjere pomoću biljnog *Allium* test sistema.

Veoma su slične informacije i o citotoksičnosti, koje su dobijene ispitivanjem pomoću biljnog sistema *Allium cepa*, *in vivo*, što je potvrđeno od velikog broja istraživača [98, 99]. Izuzetna senzitivnost i dobre korelacije bioindikatorskog sistema *Allium cepa* L. i testova na sisarima, od suštinskog značaja su za pouzdanu procjenu rizika po životnu sredinu [100].

Tako se rezultati mogu ekstrapolirati i na čovjeka. Analizama genotoksičnosti i mutagenosti u meristematičkim i F₁ ćelijama *Allium cepa*, danas se uspješno prati efikasnost procesa biorazgradnje štetnih jedinjenja, u cilju njihovog prevođenja u netoksične metabolite u ćelijama.

Koristeći citostatik kolhicin moguće je modifikovati osnovne namjene *Allium* testa u tri nivoa: (a) *Allium* test opšte toksičnosti-ispitivanje izduženja ili inhibicije i malformacije korijena lukovica; (b) *Allium* anafaze-telofaze test koji uključuje aberacije u ćelijskoj podjeli; i (c) *Allium* metafazni test koji se koristi za ispitivanje specifične morfologije (strukture) metafaznih hromatida i oštećenja hromozoma. Meristemske ćelije *Allium* korijena tretirane sa citostatičkim kolhicinom pokazuju mnogo jasniju sliku metafaznih hromozoma.

4.2. Karakteristike crnog luka (*Allium cepa* L.)

Smatra se da se rod *Allium* sastoji od oko 780 vrsta, što ga čini jednim od najvećih rodova monokotiledonih biljaka [101]. Biljke ovog roda, gajene ili samonikle, uvijek su imale važnu ulogu u ljudskoj ishrani, ali i u oficijelnoj, a naročito u tradicionalnoj medicini [102]. Najpoznatije vrste ovog roda su bijeli luk (*Allium sativum* L.) i crni luk (*Allium cepa* L.).

Vrsta *Allium cepa* L., slika 11, je višegodišnja biljka visine 60-120 cm, spljošteno ovalne ili ovalno duguljaste lukovice, čija veličina i oblik variraju u zavisnosti od sorte. Lukovica je obavijena crnomrkom tunikom, sa ili bez bočnih lukovica. Stablo i lišće joj je sivoplavičasto, stablo je ispod polovine obično prošireno, trbušasto neduveno, šuplje. Vrlo krupna cvast, sa ili bez rasplodnih lukovica. Cvjetne drške su do 3 cm dugačke, mnogo duže (do 8 puta) od cvjetova.



Slika 11. Izgled cvasti *Allium cepa* L.

(Preuzeto sa: http://jcautran.free.fr/archives_familiales/loisirs/)

Listići perigona su duguljasti, tupi, zelenkastobeli. Prašnici skoro duplo duži od listića perigona, međusobno pri osnovi i sa listićima perigona srasli pri osnovi, dok su unutrašnji pri osnovi izrazito prošireni, sa strane sa po dva uočljiva zupca, rjeđe bez njih ili sa slabo razvijenim zupcima. Stubić neznatno viri iznad listića perigona [103]. Plod je skoro loptast, širok. Seme je crno, naborano, po površini sa tri rebra [103]. Vrh korijena luka čini korijenova kapa, koja štiti osjetljivo meristemske tkivo, tzv. zonu diobe. Zatim slijede zona izduživanja, zona usvajanja ili zona apsorpcije i zona provođenja.

Pretpostavlja se da *Allium cepa* L. vodi porijeklo iz regiona koji se nalazi između rijeka Eufrata i Tigra, danas nije poznata u divljem stanju, ali se gaji u čitavom svijetu. Crni luk sadrži u velikim količinama različite klase primarnih i sekundarnih biomolekula, među kojima su najvažnija organosumporna i fenolna jedinjenja, koja su odgovorna za većinu njegovih bioloških aktivnosti i osobina [104, 105, 106]. Prvenstveno zbog sadržaja tih jedinjenja, crni luk ima visoku antioksidantnu, antidijabetsku, antiinflamatornu, antimikrobnu, hipotenzivnu, antikancerogenu, bronhodilatatornu, diuretsku, kao i antitrombotsku aktivnost, kako su i pokazala mnogobrojna istraživanja zadnjih desetak godina [107, 108, 109, 110, ...].

5. METODE ISTRAŽIVANJA I INSTRUMENTALIZACIJA

Za detekciju jonizirajućeg zračenja, u akutnom ozračivanju visokim dozama i u hroničnoj ekspoziciji niskim dozama, danas postoje različite savremene metode i tehnike mjerenja. Za praćenje efekata niskih doza jonizirajućeg zračenja na organizme, potrebni su osjetljivi, višeparametarski mjerni sistemi. Za realizaciju ove doktorske disertacije koristile su se najsavremenije istraživačke metode i najsavremeniji sistemi za detekciju i dozimetriju jonizirajućeg zračenja.

Pouzdana određena koncentracija aktivnosti radona u uzorcima vode, predstavljala je neophodan uslov uspješnosti aktuelne doktorske disertacije. Određivanje nivoa koncentracije aktivnosti radona u vodi do prije 20 godina, bio je veliki naučni problem, iz razloga što su hemijske analitičke metode i većina nuklearnih metoda bile veoma nepouzdanе [20]. Za potrebe ove doktorske disertacije koristio se vodeći svjetski radon multiparametarski monitoring sistem, čiji se rad zasniva na principu jonizacije. Jonizacione komore i proporcionalni brojači su danas najšire korištene tehnike mjerenja zračenja, kojima se određuje koncentracija radona u vodi.

Pošto su kratko živeći potomci radona (^{214}Bi , ^{214}Po i ^{214}Pb) i dugoživeći potomak radona (^{210}Pb) glavni izvori gama zračenja, koji dolazi od dominantog radioaktivnog niza ^{238}U u prirodi, u aktuelnoj doktorskoj disertaciji uporedo sa mjerenjem koncentracije aktivnosti radona, vršena su i mjerenja jačine doze gama zračenja tokom svake serije mjerenja.

Da bi se izvršila pouzdana procjena uticaja koncentracije aktivnosti radona na tretirane meristemske ćelije luka, nužno je bilo istražiti sadržaj radionuklida u u niskoradonskoj vodi. Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu radionuklida (izuzev radona) koji su prisutni u uzorcima vode, koriste se razne analitičke metode. Koja će metoda biti primijenjena zavisi od niza faktora, a odlučujući su njena osjetljivost, pouzdanost, tačnost i efikasnost. Ove zahtjeve sa promjenljivim uspjehom danas ispunjavaju više analitičkih metoda: atomska spektrometrija, masena spektrometrija, fluorimetrija, rentgeno-radiometrijska analiza, neutronska aktivaciona analiza i zadnjih trideset godina gama spektrometrija. Za potrebe ove doktorske disertacije koristila se niskofonska visokorezoluciona gama spektrometrija.

Za citogenetičku analizu i za ispitivanje uticaja radona u vodi na meristemske ćelije luka *in vivo*, koristili su se testovi citotoksičnosti i genotoksičnosti: *Allium cepa* test i mikronukleus (MN) test. Ove metode koriste mnogi istraživači u vodećim naučnim institucijama, i to uglavnom kao bioindikatore onečišćenja životne sredine. Osjetljivost, efikasnost i ekonomičnost ovih testova u praćenju citotoksičnosti i genotoksičnosti, bili su glavni razlozi za njihovu primjenu u ovoj doktorskoj disertaciji.

5.1 Metode i instrumentalizacija za detekciju radona u vodi i jačine doze gama zračenja

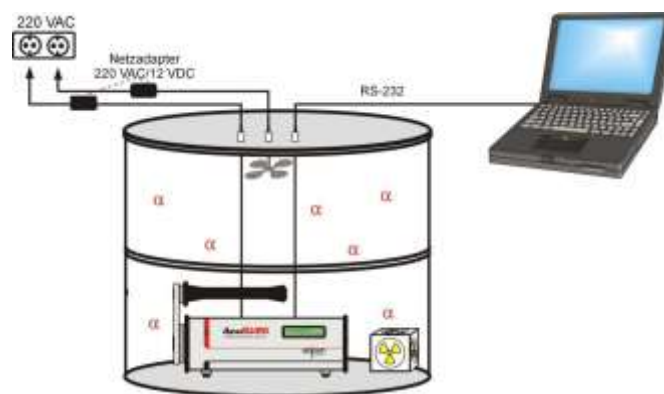
Za potrebe eksperimentalnog istraživanja ove doktorske disertacije, za detekciju nivoa aktivnosti radona koristio se AlphaGUARD PQ 2000 PRO, vodeći sistem u svijetu za detekciju radioaktivnog gasa radona u svim ambijentalnim sredinama. Osim ovog sistema za detekciju radona u vazduhu istraživačke laboratorije koristio se i uređaj AlphaE, najnoviji profesionalni sofisticirani mjerni sistem za radon, proizveden 2017. godine.

Za mjerenje jačine doze gama zračenja koristili su se sistemi Gamma Tracer i MiniTRACE γ , koji γ - radijacione doze kontinualno registruju u izabranim vremenskim intervalima. Ovi mjerni sistemi su najnoviji proizvodi renomiranog Francusko-Njemačkog koncerna za nuklearnu tehnologiju, Genitron instruments-Saphymo-Betrin.

5.1.1 Osnovne karakteristike sistema AlphaGUARD PQ 2000 PRO i procedura mjerenja koncentracije aktivnosti radona u vodi

Alpha GUARD radon profesionalni mjerni sistem Bertin Instruments korporacije (razvijen u Genitron Instruments-Frankfurt), dizajniran je za trenutno ili kontinuirano mjerenje koncentracije aktivnosti radona u vazduhu, vodi, zemljištu ili materijalima. Isto tako, Alpha GUARD uživa međunarodnu reputaciju kao standardni uređaj za kalibraciju aktivnih i pasivnih detektora radona. To je impulsna jonizaciona komora, aktivne zapremine 0,56 dm³, namijenjena za alfa spektrometriju sa digitalnim procesiranjem signala [111]. Veliki filter od staklenih vlakana dozvoljava da u komoru difuzijom uđe gas radon, dok produkti raspada i aerosoli bivaju zadržani na filteru.

Alfa čestice nastale raspadom radioaktivnog gasa radona jonizuju zrak u jonizacionoj komori. Katoda privlači pozitivno naelektrisane čestice, a anoda negativno naelektrisane. Tada kroz cijelo strujno kolo protiče jonizaciona struja koja je proporcionalna količini raspadnutih atoma radona. Mjerni opseg ovog sistema je od $2 - 2 \cdot 10^6$ Bq/m³, dok je temperaturni opseg od -10 do 50°C. Kalibraciona greška sistema za ²²²Rn je ± 3 %. Pomoću integriranih senzora ovaj sistem pored radona, silmutano mjeri temperaturu vazduha, atmosferski pritisak i relativnu vlažnost vazduha, dakle, one meteorološke parametre koji su u dubokoj korelaciji sa distribucijom radona. Pomoću ovog mjernog sistema, poteškoće vezane za detekciju radona u vodi su minimizirane. Za potrebe eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije, u cilju pouzdanosti mjerenja, blagovremeno je izvršena kalibracija ovog sistema.



Slika 12. Emanaciona mjerenja uzorka sa AlphaGUARD sistemom.



Slika 13. AlphaGUARD 2000 PRO za mjerenje koncentracije aktivnosti radona u vodi.

Ovaj sistem je efikasno prevazišao probleme pasivnih detektora sa jednim očitavanjem koncentracije radona, i sada se koristi u mnogim modernim svjetskim laboratorijama za detekciju radona i njegovih potomaka u svim ambijentalnim sredinama. Ovaj sistem je podržan profesionalnim Alpha EXPERT softverskim paketom za multiparametarsku analizu kao i grafičku vizuelizaciju dobijenih podataka i njihovo arhiviranje.

Pouzdana detekcija radona u vodi, zahtijeva složenu i osjetljivu eksperimentalnu procedu, koja se zbog migrativnih osobina gasa radona mora odvijati po strogim pravilima. U sastav aparature pored mjernog sistema AlphaGUARD PQ 2000 PRO, nalaze se AquaKIT i AlphaPUMP. AquaKIT je specijalni set staklenih sudova za degaziranje radona iz vode i sigurnosnog suda za optimizaciju rada aparature[112]. Staklene posude aparature AquaKIT, obezbjeđuju hermetički ograđen prostor izbačenog radona iz uzorka vode, kao i brzu izmjenu uzoraka, što spriječava nekorektna mjerenja kao posljedicu curenja radona iz opreme.

U zatvorenoj gasnoj cirkulaciji staklenih sudova AquaKIT, radon je izbačen iz uzorka vode pomoću sistema AlphaPUMP [113]. Ova pumpa sadrži elektronsko podešavanje brzine pumpe (0.03 L/min, 0.05 L/min, 1 L/min), a takođe posjeduje i unutrašnji aqua-stop filter koji sprječava nastanak štete prilikom prodiranja vode u mjerni sistem. Spojne cijevi trasiraju put gasu radonu između degasnog suda, sigurnosnog suda, AlphaPUMP, kutije aktivnog ugljenog filtera, do centralnog sistema AlphaGUARD. Ove cijevi su napravljene od materijala koji ima visoku izdržljivost na difuziju radona, nasuprot ranije korištenim materijalima za cijevi na bazi silikona. Kutija aktivnog ugljenog filtera je služila za separaciju ekshaliranog radona iz ispitivanih uzoraka vode.

Osnovni uslov za korektnost i egzaktnost mjerenja koncentracije aktivnosti radona u vodi je proces uzorkovanja vode. U ovoj doktorskoj disertaciji gubitak radona u procesu uzorkovanja vode i početka mjerenja je minimiziran, zahvaljujući inoviranom postupku u radu sistema AquaKIT. Isto tako, uzimanje potrebnog uzorka vode iz osnovnog suda moralo se odmah vršiti nakon skidanja poklopca, radi minimiziranja gubitka radona u okolni vazduh.

Očitane vrijednosti koncentracije aktivnosti radona na displeju AlphaGUARD-a nisu koncentracije radona u mjernim uzorcima, iz razloga zato što je ekshalirani radon razblažen u vazduhu u mjernoj opremi, a određeni mali dio radona ostaje razblažen u tečnoj fazi. Zato se za kvantifikaciju efekta razblaženja zahtijeva tačno određenje unutrašnje zapremine mjerne opreme (V_{sistema}). Količina zaostalog radona u uzorku određena je uvođenjem distributivnog koeficijenta k . U ovoj doktorskoj disertaciji, jednačina koja je korištena za određivanje koncentracije aktivnosti radona u uzorcima vode, uključuje pomenute parametre:

$$C_{\text{vode}} = \frac{C_{\text{vazduha}} \cdot \left(\frac{V_{\text{sistema}} - V_{\text{uzorka}}}{V_{\text{uzorka}}} + k \right) - C_0}{1000} \quad (15)$$

gdje je C_{vode} je koncentracija aktivnosti radona u uzorku vode [Bq/m^3], C_{vazduha} je koncentracija radona izražena u Bq/m^3 poslije istiskivanja radona iz uzorka, C_0 je koncentracija radona u mjernoj opremi prije stavljanja uzorka vode u mjerni sistem [Bq/m^3], V_{sistema} je unutrašnja zapremina mjerne opreme (ml), V_{uzorka} je zapremina uzorka vode (ml), k je koeficijent distribucije radona kako je ranije naglašeno.

Unutrašnja zapremina opreme rezultat je sume unutrašnjih zapremina komponenata integrisanih u mjernoj opremi. U tabeli 9 date su unutrašnje zapremine pojedinih komponeneta mjernog sistema.

Tabela 9. Zapremine AquaKIT komponenati.

Komponente sistema	Zapremina (ml)
Jonizaciona komora AlphaGUARD uređaja	680
AlphaPUMP	18
Degazirani sud (iznad 100 ml uzorka vode)	201
Sigurnosni sud	202
Spojne cijevi (1.8 m)	21
Ukupna zapremina	1122

Uticaj radonovog difuznog koeficijenta k je mali na temperaturnom opsegu od 10°C do 30°C. Difuzni koeficijent iznosio je približno $k = 0.26$ na sobnoj temperaturi od 20°C, na kojoj su vršena eksperimentalna mjerenja. Pri ovim iznosima difuzionog koeficijenta, dolazi do mjerne nesigurnosti od $\leq 2\%$. Poslije svakog pojedinačnog mjerenja koncentracije radona u uzorcima vode, vršeno je ispiranje radona i njegovih produkata raspada iz opreme, sve dok se koncentracija radona u njoj ne smanji do sobne koncentracije radona. Nakon toga sljedeća mjerna procedura mogla je početi.

U toku cjelokupnog eksperimentalnog istraživanja, kontinuirano su praćeni i nivoi radona u vazduhu u istraživačkoj laboratoriji. Mjerenja su vršena uporedo pomoću dva sistema: AlphaGUARD-a i AlphaE sistema (slika 14).



Slika 14. AlphaE uređaj za mjerenje koncentracije aktivnosti radona u vazduhu [114].

AlphaE je najnoviji profesionalni mjerni sistem za detekciju aktivnosti radona u vazduhu, ličnu izloženost i doze zračenja. To je ultra mali kontinuirani radonski monitor, koji zbog male težine (165 g) i malih dimenzija (108x68x30mm) može se savršeno koristiti za mjerenje lične izloženosti radonu i za upravljanje ličnim dozama. Radi na principu difuzione komore sa silikonskom diodom, mjernog opsega od 20 Bq/m³ do 10 MBq/m³. Stoga se pomoću njega i radni nivoi radona ispod 100 Bq/m³ mogu mjeriti, kao što je navedeno u najnovijim preporukama WHO.

Zbog uticaja varijacije prirodnog fona na eksperimentalna istraživanja, gdje radon daje primaran doprinos, za mjerenje koncentracije radona u vazduhu primijenjena je i integralna metoda nuklearnih trag detektora (SS-NTD). Ova metoda zasniva se na registraciji tragova α čestica iz raspada radona u dielektričnom detektoru [115]. Detekcija naelektrisanih α čestica pomoću ovih detektora izvodi se preko tragova koji nastaju njihovim prodorom kroz detektor. To su zapravo oštećenja koja α čestice izazivaju u strukturi detektora duž pravca kretanja. Teške naelektrisane čestice (od protona naviše) ostavljaju tragove u dielektričnom medijumu, što nije slučaj sa β česticama i γ kvantima.

Ovom pasivnom metodom mjerila se koncentracija aktivnosti radona isključivo u vazduhu istraživačke laboratorije i služila je kao komparativna metoda. Na slici 15 prikazan je RadoMeter 2000, sistem za dozimetriju i detekciju radona pomoću nuklearnih trag detektora.



Slika 15. RadoMeter 2000 za detekciju radona pomoću nuklearnih trag detektora [116].

5.1.2 Priprema uzoraka vode sa različitim koncentracijama aktivnosti radona

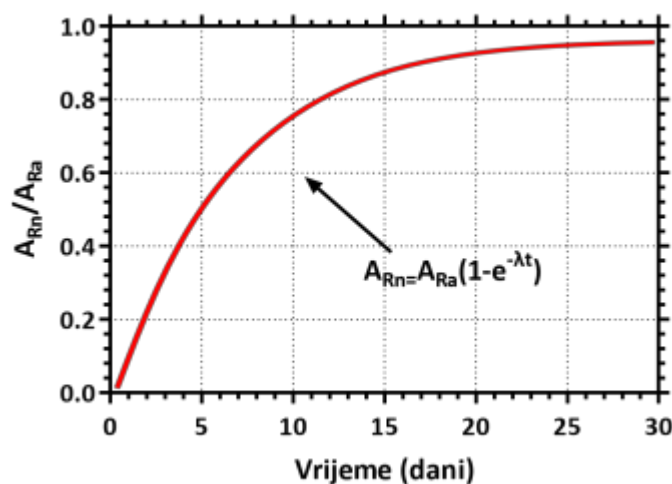
Temeljni preduslov uspješne realizacije postavljenih zadataka u aktuelnoj doktorskoj disertaciji, direktno je zavisio od pripreme uzoraka vode sa pouzdano određenim koncentracijama aktivnosti radona. Do uzoraka vode sa različitim koncentracijama aktivnosti radona moglo se doći na tri načina:

- 1) Odrediti koncentraciju aktivnosti radona raznih izvorskih radonskih voda, prema potrebi miksovati njihove koncentracije aktivnosti u cilju dobijanja određenih koncentracija aktivnosti radona.
- 2) Koristiti uzorak jedne izvorske nisko radioaktivne vode i standardni izvor radona dovoljne aktivnosti, za pravljenje uzorka vode sa potrebnim koncentracijama aktivnosti radona.
- 3) Koristiti uzorak destilovane vode i standardni izvor radona dovoljne aktivnosti, za pravljenje uzorka vode sa potrebnim koncentracijama aktivnosti radona.

Gore pomenuta prva opcija za pravljenje uzoraka vode sa raznim koncentracijama radona, iako desetostruko jeftinija, nije dolazila u obzir, prvenstveno zbog izotopskih sastava različitih izvorskih voda. Za potrebe eksperimentalnih istraživanja u ovoj dokorskoj disertaciji, potrebni su bili uzorci vode u kojima je koncentracija aktivnosti radona jedina varijabla. Kada se uzmu u vidu oblici generisanja i distribucije radona, njegove fizičko-hemijske osobine, prvenstveno migrativne sposobnosti, onda se još odlučnije odustalo od ovog načina pripreme uzorka vode.

Iz pomenutih razloga, za pripremu uzorka vode odabranih koncentracija aktivnosti radona, korišteni su gore pomenuti drugi i treći drugi način. Koristili su se uzorci jedne izvorske nisko radioaktivne vode, istih zapremina, u kojima su dodavani određeni iznosi standarda ^{226}Ra kao direktnog izvora izotopa radona ^{222}Rn . Ista procedura vršena je i za pripremu uzorcima sa destilovanom vodom. Ideja je bila da se uoče biološki efekti radona i njegovih produkata raspada, kada su moguće njihove interakcije sa jonima i atomima elemenata u realnoj izvorskoj vodi, i kada nisu moguće u destilovanoj vodi.

Tako pripremljeni uzorci vode, smješteni su u originalno dizajniranoj staklenoj ambalaži, hermetički zatvoreni u eksikatorima identičnih zapremina. Ovaj originalni postupak imao je za cilj da opimizuje uticaj date koncentracije aktivnosti radona na tretirane lukovice. Da bi se uspostavila radioaktivna ravnoteža između izotopa ^{226}Ra i njegovih kratkoživećih potomaka (slika 16), uzorci vode su odležali 30 dana u dobro hermitizovanim eksikatorima. Nakon tog perioda, u toku 48 h, pristupilo se izlaganju setova lukovica koncentracijama aktivnosti radona. Eksikatori su savljeni na stabilno postolje, da ne bi došlo do uzburkivanja vode i iznuđene ekshalacije radona iz vode, koja bi dovela do narušavanja radioaktivne ravnoteže. Iz istih razloga, lukovice su maksimalno oprezno stavljane u dodir sa površinama uzoraka vode različitih koncentracija.



Slika 17. Brzina emanacije ^{222}Rn izražena preko aktivnosti ^{226}Ra .

Spravljeno je 10 uzoraka izvorske i destilovane vode, sa širokim opsegom koncentracija aktivnosti radona, od 100.62 – 1,006.25 Bq/L (100.62; 201.25; 301.87; 402.50; 503.12; 603.75; 704.37; 805.00; 905.62 i 1,006.25 Bq/L). Ovaj opseg koncentracija aktivnosti radona

u vodi je realan u prirodi, i njima potencijalno mogu biti izloženi biološki sistemi. Kako su svi ostali fizičko-hemijski parametri u pripremljenim uzorcima vode bili identični, koncentracija aktivnosti radona bila je jedina varijabla. Zbog aktuelnog naučnog problema-dileme, vezanog za sagledavanje efekta niskih doza zračenja na biološke sisteme, uzorci lukovica *Allium cepa* L., ciljano su tretirani ovako širokim vrijednostima koncentracija aktivnosti radona u vodi. Na taj način optimizovane su pretpostavke za detekciju potencijalno mogućeg hormetičkog odgovora *Allium cepa* ćelija. U dostupnoj naučnoj literaturi, nisu zapažena istraživanja koja su slična istraživanjima u ovoj doktorskoj disertaciji, a koja se odnose na efekte koncentracije aktivnosti radona u vodi, na bioindikatorske organizme.

5.1.3. Mjerenje jačine doze gama zračenja

Kako je ranije naglašeno, potomci radona ^{222}Rn su glavni izvori doze gama zračenja, koja dolazi od dominantnog prirodnog radioaktivnog uranovog ^{238}U niza. Iz tog razloga uporedo sa mjerenjem koncentracije aktivnosti radona, kontinuirano su vršena i mjerenja jačine doza gama zračenja tokom trajanja cjelokupnog eksperimentalnog istraživanja. Mjerenja su obavljena na Gamma Tracer sistemu i MiniTrace γ . Gamma Tracer čine dvije spregnute Geiger-Muller-a cijevi mjernog opsega od 10 nSv/h - 10 mSv/h [117]. Kompletna elektronika i napon napajanja, smješteni su u hermetičkom kućištu (slika 17).



Slika 17. Gamma Tracer i Data EXPERT profesionalni softver.

Nivoi gama zračenja mjereni su i pomoću MiniTrace γ uređaja, koji je kalibrisan na jačinu efektivne doze u $\mu\text{Sv/h}$.



Slika 18. MiniTRACE γ uređaj [118].

Gama Data EXPERT profesionalni softverski program za upotrebnu komunikaciju, kao i softver za analiziranje, kojima su podržana oba sistema, omogućili su jednostavan, brz i siguran pristup akumuliranim podacima kao i njihovoj vizuelizaciji.

5.2 Gama spektrometrijska metoda

Za identifikaciju radionuklida u uzorcima vode koristila se gama spektrometrijska metoda. Danas gama spektrometrija predstavlja najrasprostranjeniju nuklearnu analitičku tehniku u raznim oblastima istraživanja: radioekologiji, monitoringu nuklearnih postrojenja, geologiji, medicinskoj fizici, nuklearnoj medicini, biofizici, poljoprivredi, itd. Razlozi su u njenoj jednostavnosti, velikoj osjetljivosti i tačnosti. U ovoj metodi se struktura i prirodni sastav uzorka ne dovode u pitanje, nije potrebno hemijsko ili neko drugo agresivno tretiranje uzorka. Dok se kod drugih analitičkih metoda koriste miligramske ili čak mikrogramske količine uzorka, u gamaspektrometriji se mogu koristiti i kilogramski uzorci, da bi se očekivani element našao iznad granice osjetljivosti metode.

Osnova kvalitativne gama spektrometrijske analize sastoji se u sljedećem: linija totalne apsorpcije se indentifikuje, odnosno korespondira sa karakterističnim γ - prijelazom nekog radionuklida, određivanjem njenog položaja u spektru. Položaj linije određuje se direktnim očitavanjem rednog broja kanala nad kojim je njen centroid. Svakom kanalu pridružena je odgovarajuća energija posredstvom energijske kalibracije. Na taj način vrši se indentifikacija pojedinih radionuklida u uzorku.

Cilj kvantitativne gama spektrometrijske analize je određivanje specifične aktivnosti, mase i koncentracije radionuklida u ispitivanom uzorku. Za kvantitativno određivanje elementa na osnovu snimljenog γ - spektra, pretežno se koriste linije što većeg inteziteta, izdvojene i čiste (bez superponiranja i bez interferentnih linija) i koje se nalaze na što je moguće nižem, po mogućnosti linearnom fonu. Specifična aktivnost radioizotopa, preko linije na energiji E_γ , izražava se pomoću formule:

$$A = \frac{I(E_\gamma)}{m \ t \ P_\gamma \ E_d} \quad (16)$$

gdje je

A - specifična aktivnost datog elementa,

m - masa mjerenog uzorka,

t - vrijeme snimanja (mjerenja) radijacionog spektra uzorka,

P_γ - apsolutni intezitet γ - prijelaza date energije, tj. broj emitovanih fotona te energije na 100 raspada (u procentima), odnosno predstavlja vjerovatnoću tog energetskog prijelaza u šemi raspada datog radionuklida,

E_d - predstavlja efikasnost detektora za datu energiju zračenja,

$I(E_\gamma)$ - intezitet linije u spektru (korigovan na fon).

U laboratorijskim eksperimentima s radionuklidima, poznavanje mase radioaktivnih materija je vrlo važno. Znajući specifičnu aktivnost radionuklida, odnosno koncentraciju aktivnosti u ispitivanom uzorku, masa radioaktivnih atoma može se izračunati iz njihovog broja N i njihove aktivnosti A korištenjem poznatih relacija:

$$A = \lambda N \quad (17)$$

$$m = \frac{N \cdot M}{N_{Av}} = \frac{A \cdot M}{N_{Av} \cdot \lambda} = \frac{A \cdot M}{N_{Av} \cdot \ln 2} \cdot T_{1/2} \quad (18)$$

gdje je: A - aktivnost radionuklida,

N - broj neraspadnutih jezgara datog radionuklida,

N_A - Avogardov broj, M - atomska masa,

λ - konstanta radioaktivnog raspada,

$T_{1/2}$ -vrijeme poluraspada radionuklida.

Gama spektrometrijska mjerenja uzoraka vode za potrebe ove doktorske disertacije, vršena su na niskofonskom, visokorezolucionom, germanijumskom koaksijalnom detektorskom sistemu HPGe, u Laboratoriji za dozimetriju, detekciju i zaštitu od zračenja, Univerziteta u Tuzli, slika 19. Ovaj detektor je detektor sa obrnutim elektrodama n-tipa, energetskog opsega: 3 keV-10 MeV, relativne efikasnosti na 1.33 MeV: 70 %, energetske rezolucije na 5.9 keV: 1100 eV FWHM, energetske rezolucije na 1.33 MeV ^{60}Co : 2.30 keV FWHM.



Slika 19. Gama spektrometrijski sistem u LDDZZ (Laboratorija za dozimetriju, detekciju i zaštitu od zračenja) Univerziteta u Tuzli.

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu γ - spektra uzoraka vode, potrebno je bilo izvršiti dvije vrste kalibracije γ - spektrometra: energetska kalibraciju spektrometra i kalibraciju na efikasnost. Cilj energetske kalibracije je da se dobije veza između položaja vrhova totalne apsorpcije u spektru i odgovarajućih energija γ -zraka. Kalibracija detektora na efikasnost ima za cilj da predstavi vjerovatnoću detekcije γ - kvanta u funkciji njihove energije. Poznavanje efikasnosti detektora E_d za datu geometriju mjerenja, pored poznavanja tačnih vrijednosti apsolutnih inteziteta P_γ , najvažniji su zahtjevi za uspješnu gama spektrometrijsku analizu uzoraka.

Za kvalitativnu i kvantitativnu γ - spektrometrijsku analizu uzoraka vode, od posebne važnosti je bio izbor najpogodnijih spektralnih linija γ - zračenja, što većeg inteziteta i spektralne čistoće. Upotrebom o programskog paketa, Genie 2000 Gamma Analysis Software (Canberra Industries), izvršena je cjelokupna kontrola rada spektrometrijskog sistema, analiza dobivenih spektra i određivanje sadržaja radionuklida u ispitivanim uzorcima.

Specifična aktivnost ^{226}Ra određena je preko fotopikova plova ^{214}Pb na 295.09 keV ($P_\gamma = 19.2\%$) i 351.87 keV ($P_\gamma = 37.1\%$), kao i linija ^{214}Bi na 609 keV ($P_\gamma = 46.1\%$) i 1120 keV ($P_\gamma = 15.0\%$). Specifična aktivnost radionuklida ^{232}Th određena je na osnovu linija u spektru ^{228}Ac na 911.07 keV ($P_\gamma = 29\%$) i na 338.42 keV ($P_\gamma = 12.4\%$). Specifična aktivnost ^{235}U određena je na energiji 143.79 keV ($P_\gamma = 10.5\%$) i pomoću složene linije na 185.74 keV ($P_\gamma = 53\%$). Mjerenje koncentracije ^{238}U vršeno je preko potomka Th-234 na linijama 63.28 keV, 1001.03 keV. Aktivnost ^{40}K određena je preko njegovog jedinog gama prijelaza na energiji od 1460,85 keV. Aktivnost ^{210}Pb određena je na osnovu njegove gama linije na 46.539 keV. Vrijeme brojanja iznosilo je 86,000 sekundi. Nesigurnost mjerenja izražena je kao kombinovana standardna nesigurnost prema Eurachem/Citac Guide 2000.

5.2.1 Softver za spektralnu analizu gama spektara

Spektrometrijski softver za gama spektrometrijsku analizu uključuje niz osnovnih analiza algoritama za obradu gama spektra. U LDDZZ Univerziteta u Tuzli, gdje su vršena gama spektrometrijska mjerenja za potrebe ove doktorske disertacije, korišten je Softverski paket Genie 2000. Ovaj program koristio se za prikupljanje i analizu spektra sa višekanalnog analizatora gama spektrometara. Pomoću ovog programa može se vršiti manipulacija spektra, dobiti pregledan prikaz i osnovni parametri spektara. U okviru ovog programa moguće je izvršiti kompletnu kalibraciju efikasnosti spektrometra, pod uslovom da se izvrši snimanje spektra standarda.

5.3 *Allium cepa* test

Primjena fizičkih i bioloških metoda kao komplementarnih dozimetrijskih metoda, imala je za cilj poboljšanje percepcije bioloških efekata koncentracije aktivnosti radona, koji je dominantan prirodni izvor jonizirajućeg zračenja u životnoj sredini. Fizička dozimetrija se obično izvodi pomoću instrumenta koji su osjetljivi na fizičke efekte jonizirajućeg zračenja, dok biološka procjena doze u biodozimetriji zasnovana je na analizi biomarkera koji odražavaju oštećenje uzrokovano jonizirajućim zračenjem. Više biljke prepoznate su kao izvrsni genetički modeli za otkrivanje mutagena u životnoj sredini i danas su nezaobilazni bioindikator u praćenju studija citogenetičnosti [119]. Jedna od primarnih prednosti citogenetičke biodozimetrije je ta, što se njene metode mogu koristiti za retrospektivno procjenjivanje doze zračenja, pod uslovom da se dobijeni rezultati pažljivo analiziraju.

Upotreba *Allium cepa* kao test sistema za otkrivanje mutagena, datira još iz četrdesetih godina prošlog vijeka. Za praćenje ili ispitivanje zagađivača životne sredine *Allium* test je usvojen od strane Međunarodnog programa za biološke procese biljaka [120, 121]. Luk je pogodan za genotoksične studije iz sljedećih razloga: (a) dinamika rasta korijena je veoma osjetljiva na široku lepezu agenasa; (b) postoji jasan i brz odgovor na genotoksične agense (c) mitotske faze u luku su vrlo jasno izražene; (d) postoji dovoljna raznolikost u morfologiji hromozoma; (e) spontana hromozomska oštećenja se rijetko javljaju, što je posebno važno za pouzdanost mjerenja.

Allium cepa L. ima 16 monocentričnih hromozoma ($2n = 16$) sa osnovnim brojem $x = 8$. Njegov kariotip sadrži šest metacentričnih (m), osam submetacentričnih (sm) i dva subtelocentrična (st) hromozoma. Hromozomi ćelija luka su relativno veliki hromozomi, što omogućava lako otkrivanje mogućih oštećenja hromozoma. Veoma dobro razjašnjene citogenetičke osobine crnog luka, te mali broj hromozoma u diploidnoj hromozomskoj garnituri, su prednosti *Allium cepa* metafaznog testa, koji se pokazao kao pouzdan modelni sistem za mjerenje uticaja citogenetskog potencijala zagađivača u ambijentalnoj sredini [122].

Allium cepa test karakteriše se niskom cijenom i jednostavnom realizacijom. Ima prednosti nad drugim kratkotrajnim testovima jer ne zahtijeva prethodne pripreme testiranih uzoraka, kao i dodavanje egzogenog metaboličkog sistema. Danas se pouzdano zna da se mutageni mogu citološki manifestovati ćelijskom inhibicijom, poremećajem u metafazi, indukcijom hromozomskih aberacija, numeričkih i strukturnih. Testovi za ljudsko zdravlje se izvode pomoću različitih testnih sistema, a među njima i testa *Allium cepa*. Posebna odlika ovog testa što je primjenljiv na veliki broj ćelijskih tipova. Metafazne hromozomske anomalije, koje se detektuju u postupku testa *Allium cepa*, nisu isključene da se ne javljaju i u humanim hromozomima kada su izloženi sličnim agensima. Postoji veliki broj izvještaja o izvrsnoj korelaciji ovog biljnog sistema sa sistemom sisara [123]. 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

hromozomskih aberacija koje su lako vidljive na metafaznim hromozomima bioindikatora [124, 125]. Brojni eksperimenti su pokazali da je broj mutacija koji je uzrokovan zračenjem, proporcionalan upotrebnoj dozi, pa i najmanje doze zračenja mogu izazvati mutacije [55].

Kod *Allium cepa* testa, koristi se mitotički indeks i određene nuklearne abnormalnosti za procjenu citotoksičnosti i analizu mikronukleusa, kako bi se provjerila mutagenost različitih agenasa. Analiza hromozomskih promjena služi kao test mutagenosti, i jedna je od rijetkih direktnih metoda za mjerenje oštećenja u sistemima izloženim mogućim mutagenima ili karcinogenima. Mitotički indeks i indeks replikacije koriste se kao indikatori adekvatne proliferacije ćelija [126], koji se može mjeriti pomoću biljnog testnog sistema *Allium cepa*. Definisan je kao odnos broja ćelija u mitozu i ukupnog broja analiziranih ćelija [127]. Već dugo je smatran za veoma bitan kriterijum rasta i multiplikacije tkiva. Pod pretpostavkom da se mitoz dešava u nasumičnim intervalima, mitotski indeks i izmjereno trajanje mitoze, su korišteni za izračunavanje dužine interfaze. Ova vrijednost pokazuje kako je određena supstanca uticala na ćelijsku diobu, bilo proliferativno ili inhibitorno.

U različitim fazama mitoze promatrane su hromozomske abnormalnosti, izračunat mitotički indeksi, fazni indeksi i indeksi hromozomskih aberacija, pomoću sljedećih izraza:

$$MI(\%) = \frac{TDC \times 100}{TC} \quad (19)$$

$$PI(\%) = \frac{TC \times 100}{TDC} \quad (20)$$

$$CAI(\%) = \frac{TC_{Abn} \times 100}{TDC} \quad (21)$$

gdje je:

MI – mitotski indeks;

PI – fazni indeks;

CAI – aberacijski indeks;

TDC – ukupan broj diferenciranih ćelija;

TC – ukupano broj diferenciranih i ne diferenciranih ćelija.

Za sagledavanje efekta trajanja tretmana na vrijednosti mitotskog indeksa ćelija korijena *Allium cepa* L., podaci su podvrgnuti statističkoj analizi koristeći Friedmanov test

$$(\chi_R^2) = \frac{12}{NK} \sum_{j=1}^k (R_j)^2 - 3N(k+1) \quad (22)$$

N- broj redova (koncentracija);

K- broj kolona (uslovi, trajanja tretmana);

R_j- zbir redova u *j*-toj koloni.

Tumačenje rezultata mitotskog indeksa vršeno je u odnosu na mitotski indeks kontrolnih ćelija *Allium cepa*. Treba posebno naglasiti vrijednosti znanja iz biljnih citogenetskih tehnika, koje omogućavaju dalji razvoj *Allium cepa* testa. Studije senzitivnosti i korelacije sistema *Allium cepa* testa i drugih testnih sistema, su od suštinskog značaja za pouzdanu procjenu rizika, kao i ekstrapolaciju podataka na drugim organizmima, prvenstveno na čovjeka.

Analizama genotoksičnosti i mutagenosti u meristematičkim i F₁ ćelijama *Allium cepa*, danas se uspješno prati i efikasnost procesa biorazgradnje štetnih jedinjenja, koji se vrše raznim hemijskim sredstvima, posebno bakterijama, u cilju njihovog prevođenja u netoksične metabolite u ćelijama.

5.3.1 Metodologija *Allium cepa* testa

Za potrebe eksperimentalnih istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji, izabrane su mlade, zdrave lukovice (*Allium cepa* L.), oslobođene labavih spoljašnjih ljuspica, uniformne veličine i mase od 4 do 5.99 g, za pripremu uzorka sa izvorskom i sa destilovanom vodom. Lukovice su nabavljene od proizvođača organske hrane, koji u njihovom uzgajanju nije primjenjivao herbicide ili fungicide.

Izlaganje odabranih setova lukovica određenim koncentracijama radona u vodi, vršeno je u dvije serije. U prvoj seriji mjerenja, lukovice su fiksirane u originalnoj dizajniranoj staklenoj ambalaži sa odabranim koncentracijama radona u vodi, i smještene u eksikatorima uniformne zapremine na proklijavanje, slika 20.



Slika 20. Eksponiranje lukovica na odabranim koncentracijama radona u vodi.

Eksikatorima su bili dovoljne zapremine da se ne bi narušili uslovi za klijanje lukovica, a hermetički su zatvoreni u cilju sprječavanja migracije odnosno ekshalacije radona iz posuda. U eksikatorima tretirane su po 10 skupina odabranih lukovica *Allium cepa* L., na različitim

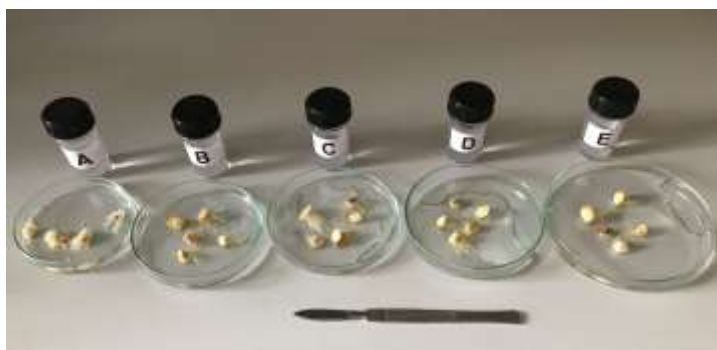
koncentracijama aktivnosti radona u realnoj izvorskoj i desilovanoj vodi, pri čemu je po jedna negativna kontrola tretirana u uzorku nisko radioaktivne vode. Izlaganje lukovica na apliciranim koncentracijama aktivnosti radona, u svim uzorcima izvorske i destilovane vode, trajalo je 48 sati.

Na jednoj polovini lukovica tretiranih na odabranim koncentracijama radona u vodi, pristupilo se makroskopskom i mikroskopskom istraživanju morfologije tkiva korijenčića luka. Druga polovina odabranih proklijalih lukovica, koje su tretirane na odabranim koncentracijama radona u vodi, nakon mjerenja dužine korijenčića, prenijete su na pororastanje u druge posude sa izvorskom vodom, kao i posude sa destilovanom vodom, koje su korišćene za komparativna mjerenja, u cilju sagledavanja bioloških efekata (slika 21).



Slika 21. Morfološka analiza lukovica prije i nakon eksponiranja na različitim koncentracijama aktivnosti radona u vodi.

Da bi se uočili citogenetički efekti zračenja na niskim dozama, nužno je bilo sagledati i svaku promjenu na uzorcima. Iz tog razloga mjen je broj korjenčića i dužina svih korijenčića lukovica, koje su tretirane na različitim koncentracijama radona u vodi. Zbir dužina svih korijenčića se onda dijelio sa ukupnim brojem korijenčića za određenu koncentraciju, da bi se dobila srednja vrijednost dužine korijenčića lukovice na datoj koncentraciji. Nakon izvršenih tretmana, korijenčići su odrezani i stavljeni u epruvete sa fiksativom. Fiksativ se sastojao iz tri dijela etanola i jednog dijela glacijalne sirćetne kiseline. Zatim su korijenčići sa fiksativom ostavljeni na temperaturi od 4 °C u toku 24 h.



Slika 22. Priprema za pravljenje privremenih citogenetičkih preparata.

Sljedeći korak bio je hidroliziranje u 1N (normalnom) HCl-u pet minuta na 60 °C. Rastvor HCl hidrolizira ćelijski zid i korijenčići postaju mekši što olakšava pripremu preparata. Nakon toga se korijenčići stavljaju u destilovanu vodu, spremni za pripremu privremenih citogenetičkih preparata.

Priprema preparata odvijala se sljedećim redom: na predmetno staklo stavljaju se 2-3 korijenčića i odreže im se otprilike 2-3 mm vršnog dijela (meristemske ćelije). Na njih se stavlja kapljica boje (laktopropionski orsein) i maceriraju se metalnim štapićem. Preko izmaceriranih vrhova korijenčića se stavlja pokrovno stakalce i pritiska filter papirom da bi upio višak boje. Poslije toga se preparati parafiniraju. Time je završena priprema privremenih preparata, koji su ostavljeni 24 h na sušenje na sobnoj temperaturi.

Privremeni preparati inače traju dva do tri dana, zato je bilo potrebno napraviti trajne preparate. Trajni preparati se prave odvajanjem pokrovnog stakalca od predmetnog stakla privremenih preparata. To se radi tretiranjem 45% sirćetnom kiselinom da bi se odvojio vosak. Nakon čega preparat odstoji na zraku 30 minuta. Završni korak je dodavanje kanada balsama na preparat predmetnog stakala, koji se preklapa pokrovnim staklom. Nakon toga preparati su bili spremni za posmatranje.

U sljedećoj fazi eksperimentalnog rada, pristupilo se analizi pripremljenih slajdova. Na svakoj od 10 odabranih koncentracija aktivnosti radona, u uzorcima izvorske i destilovane vode, analizirane su hromozomske aberacije na 500 diobnih ćelija, sa 10 najuspješnijih preparata. Hromozomi su posmatrani pod savremenim biološkim mikroskopima BS-2063T i KERN OBE 104C825, i slikani pomoću visoko-rezolucionih kamera (BUC2D-500C, resolution 5MP, proizvođač: Sony Japan, i kamera ODC 832, resolution 5.1MP, proizvođač: KERN Optics Germany).



Slika 23. Mikroskopska analiza meristemskih ćelija *Allium cepa* L., analizirana na savremenom biološkom mikroskopu BestScope.

5.4 Mikronukleus (MN) test

Šezdesetih i sedamdesetih godina prošlog vijeka, razvijeni su brojni biljni testovi genotoksičnosti, koji su korišteni za otkrivanje individualnih genotoksina u životnoj sredini. Da bi se procijenilo individualno zračenje kao mutageni agens, brze i pouzdane procjene apsorbirane doze su ključne za sagledavanje rizika. U individualnoj procjeni, biodozimetrija u velikom broju slučajeva, može doprinijeti više od komplementarne fizičke dozimetrije. Ni jedan aplicirani test ne može otkriti sve genotoksične agense, s različitim načinima djelovanja, koji su prisutni u životnoj sredini. Danas najrašireniji biljni biološki test za otkrivanje genotoksina u životnoj sredini je mikronukleus (MN) test, koje se izvodi pomoću mitotičkih ćelija korijenčića luka *Allium cepa* [128]. Meristematske mitotske ćelije korijena biljaka su adekvatni i efikasni citogenetski materijali za otkrivanje klastogenosti zagađujućih materija. MN test kao i druge biološke analize zasnovane na biljkama, su veoma osjetljive prema efektima teških metala i radionuklida.

Najefikasniji i najjednostavniji indikator citogenetskih oštećenja je formiranje mikronukleusa. Za procjenu mitotičke abnormalnosti i indukcije mikronukleusa u međufaznim ćelijama, najčešće se koristi *in vivo* ispitivanje mikronukleusa, koji se pokazao kao najpouzdaniji test, ne samo za identifikaciju opasnosti već i na procjenu rizika. Svrha MN testa je identifikacija agenasa koje uzrokuju citogenetsku štetu, koja rezultira stvaranjem mikronukleusa, koji sadrže fragmente ili cijele hromosome. Analiza prisutnosti mikronukleusa, vrši se bilo vizualizacijom pomoću mikroskopa, analizom slike, protočnom citometrijom ili laserskom skenirajućom citometrijom. U ovoj doktorskoj disertaciji, analiza prisutnosti mikronukleusa u tretiranim ćelijama vršena je vizualizacijom pomoću mikroskopa.

Naučni napredak u molekularnoj biologiji, kao i razvoj novih mjernih tehnika u radijacionoj fizici, otvorili su mogućnost korelacije intracelularnih promjena sa individualnom apsorbiranom dozom jonizirajućeg zračenja. Jonizirajuće zračenje može izazvati stvaranje fragmenta acentričnog hromozoma i malsegregaciju cijelih hromozoma. Acentrični fragmenti hromozoma i cijeli hromozomi koji nisu u mogućnosti da komuniciraju sa vretenom (zbog oštećenja mitotskog vretena) zaostaju u anafazi, i kao rezultat toga nisu uključeni u glavna jezgra kćerke. Zaostali hromozomski fragment ili cjelokupni hromozom, formira se u malo odvojeno jezgro, koji je nazvan mikronukleus. Zbog toga se obično vide kao izrazito odvojeni objekti unutar citoplazme ćelije kćerke.

Mikronukleusi su hromatini citoplazme, koji nastaju iz centričnih ili acentričnih oštećenih kromosoma, neki nestabilni nusprodukti hromozomskih aberacija [129]. Za određivanje nestabilnih hromozomskih aberacija, koristila se druga citogenetska metoda: Mikronukleus(MN) test *in vivo* ispitivanja mikronukleusa. Što se tiče nestabilnih hromozomskih aberacija, da bi se interpretirala ocjena MN u smislu efekata doze zračenja, dobijeni nakon *in vitro* zračenja, potrebna bi bila kalibracijska kriva (frekvencija MN prema dozi) za procjenu efekata *in vivo* zračenja [130]. Prečnik mikronukleusa obično varira između

1/16 i 1/3 srednjeg prečnika glavnih jezgara. MN obično nisu povezani sa glavnim jezgrima, mogu ga dodirivati ali ne i preklopiti. MN su nerefraktilni, obično imaju isti intenzitet bojenja kao i glavno jezgro, ali povremeno njihovo bojenje može biti intenzivno.

Mikronukleus (MN) test ima potencijal da otkrije aktivnosti klastogenih (hromosomski prelom) i aneugenih (gubitak hromozoma) genotoksičnih agensa. Prisutnost mikronukleusa u ćeliji pokazatelj je postojanja aberacija u genetičkom materijalu ćelije.

5.5 Statistička obrada podataka

Analiza varijance (ANOVA) korištena je za ispitivanje značajnih razlika svih procijenjenih parametara u korijenima *Allium cepa* L. izloženih odgovarajućim koncentracijama aktivnosti radona. Jednosmjerna ANOVA i multivarijantna analiza podataka izvedena je pomoću programa GraphPad Prism 9. Rezultati koji su se razlikovali na razini $p < 0.05$ smatrani su statistički značajnim. Takođe, izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije za promatrane parametre. Istraživanje je provedeno u Laboratoriji za detekciju, dozimetriju i zaštitu od zračenja i Laboratoriji za genetiku Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Tuzli.

6. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA

6.1. Rezultati gama spektrometrijske analize

Gama spektrometrijska analiza vršena je na uzorcima niskoradonske prirodne izvorske vode, koji su korišteni za pripremu uzoraka različitih koncentracija radona. Voda je uparavana radi redukcije zapremine u cilju koncentrovanja potencijalno prisutnih radionuklida. Da bi se dobila veća pouzdanost podataka za nivoe osnovne aktivnosti, analiza je vršena na niskofonskom visokorezolucionom gama spektrometrskom sistemu. Rezultati ovih gama spektrometrijskih analiza prikazani su u tabeli 10.

Tabela 10. Koncentracije aktivnosti radionuklida u uzorku izvorske vode (mBq/L).

Koncentracije aktivnosti radionuklida u uzorku izvorske vode (mBq/L)						
^{226}Ra	^{232}Th	^{40}K	^{238}U	^{235}U	^{137}Cs	^7Be
1.8 ± 0.2	< 1	18.0 ± 4.2	119.0 ± 52.1	0.9 ± 0.3	-	-

Iz gornje tabela 7 se uočava, da specifične aktivnosti radionuklida u analiziranim uzorcima vode, imaju niske vrijednosti. U uzorcima izvorske vode nije detektovan izotop ^{137}Cs , antropogeni radionuklid, koji je dospio u atmosferu kao rezultat testiranja termonuklearnih bombi, i havarije nuklearne elektrane u Černobilju aprila 1986. godine. Takođe nije detektovan prirodni kosmogenički radionuklid berilijum ^7Be , prvenstveno zbog kratkog vremena poluraspada (53.3 dana).

6.2. Rezultati mjerenja jačine apsorbovane doze gama zračenja u vazduhu

Ukupnoj apsorbavanoj dozi gama zračenja u istraživačkoj laboratoriji, pored fluksa kosmičkog i kosmogenog γ zračenja, daju doprinos i potomci radona ^{222}Rn . Kako su kratko živeći potomci radona ^{222}Rn (^{214}Bi , ^{214}Po i ^{214}Pb) i dugoživeći potomak radona (^{210}Pb) glavni izvori gama zračenja, uporedo sa mjerenjem koncentracije aktivnosti radona, vršena su i mjerenja jačine doze gama zračenja tokom svake serije mjerenja. Iz tog razloga nužno je bilo sagledati te doprinose izloženosti uzoraka *Allium cepa* L. Za mjerenje jačine doze gama zračenja u vazduhu, korišteni su sistemi ADL Gamma Tracer i MiniTRACE γ . Mjerni sistemi postavljeni su bili na 1 m iznad patosa laboratorije, i 1 m od njenih zidova.

Na slici 24, prikazane su kontinuirane 10-to minutne vrijednosti jačine doza gama zračenja u vazduhu [nSv/h] radne laboratorije, koje su registrovane u toku cjelokupnog vremena izlaganja lukovica *Allium cepa* koncentracijama aktivnosti radona.



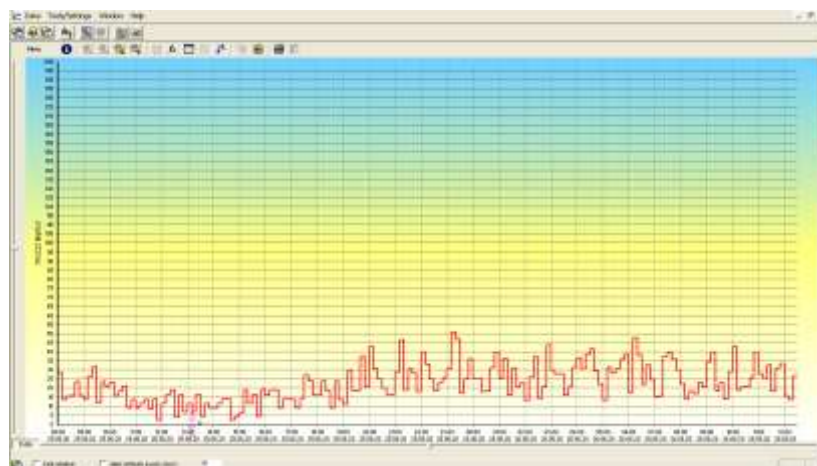
Slika 24. Spektar jačine apsorbovane doze gama zračenja u vazduhu istraživačke laboratorije.

Iz prikazanog spektra na slici 24, vidi se da su vrijednosti jačine doze gama zračenja u radnoj laboratoriji, za vrijeme istraživanja bile u opsegu varijacije osnovnog fona. Srednje vrijednosti doze gama zračenja u vazduhu do 100 nSv/h, smatraju se normalnim nivoima.

6.3. Rezultati mjerenja koncentracije aktivnosti radona u vazduhu laboratorije

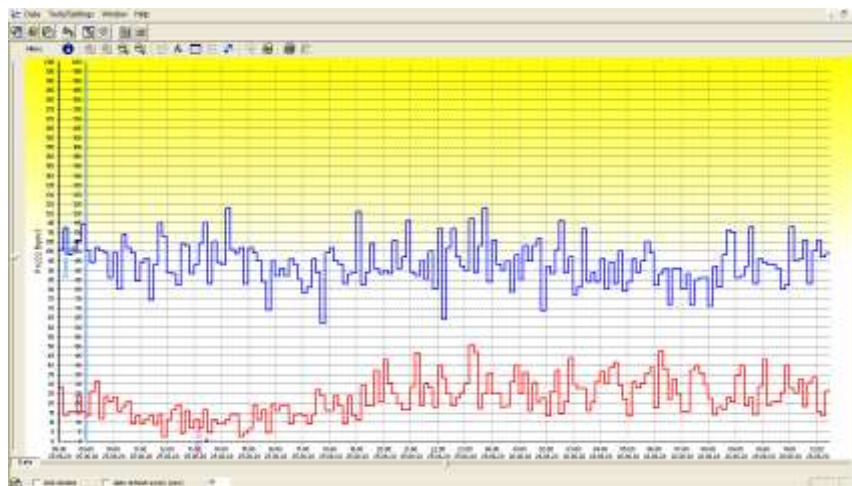
Pomoću modernog sistema AlphaGuard pro, mjerenja koncentracije aktivnosti radona u vazduhu istraživačke laboratorije, vršena su kontinuirano tokom trajanja ukupne procedure izlaganja *Allium cepa* L. koncentracijama aktivnosti radona. Na slici 25 prikazane su 10-to minutne vrijednosti koncentracije aktivnosti radona u vazduhu laboratorije [Bq/m³].

Sa slike 25 vidi se da nivoi koncentracije radona u vazduhu radne laboratorije nemaju velike oscilacije, i nalaze se u granicama varijacije prirodnog fona. Ovi nivoi su u saglasnosti sa ranijim podacima koji su dobijeni u ovoj laboratoriji, u kojoj se koncentracija radona u vazduhu prati kontinuirano. To znači da se sa pripremanjem uzoraka vode sa različitim koncentracijama radona pažljivo radilo, da su hermetizirani eksikatori dobro obavili svoju namjenu, u ovom originalno koncipiranom eksperimentu.



Slika 25. Koncentracija aktivnosti radona u vazduhu istraživačke laboratorije

Na slici 26, prikazani su uporedno spektri jačine doze gama zračenja i koncentracije aktivnosti radona u vazduhu radne laboratorije. Ta mogućnost upoređivanja ovih fizičkih dozimetrijskih veličina, od velikog je značaja za detekciju zračenja, i pouzdanost procjene uticaja jonizirajućih zračenja na čovjeka, jer istraživačima daje jedinstvenu priliku da neposredno i na očigledan način, sagledavaju nivoe korelacije jačine doze gama zračenja i koncentracije aktivnosti gasa radona u ambijentalnim sredinama.

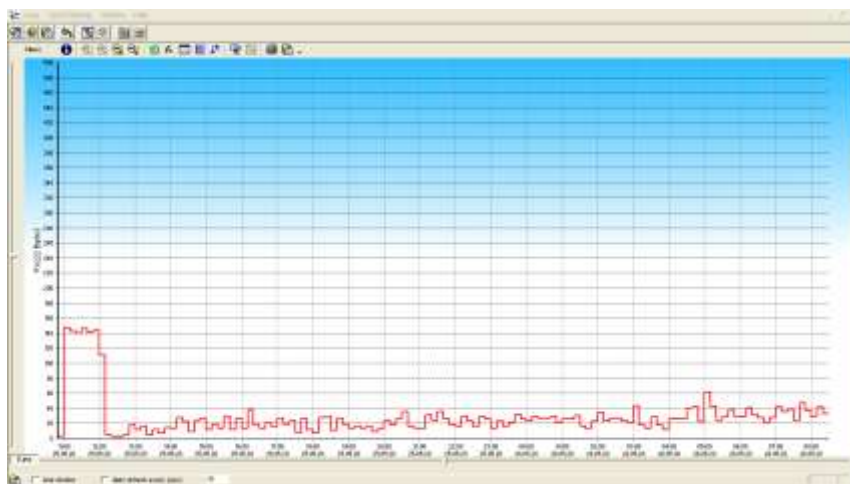


Slika 26. Uporedni prikaz spektara jačine doze gama zračenja i koncentracije aktivnosti radona u vazduhu istraživačke laboratorije

Kao što se vidi na slici 26, izmjerene vrijednosti jačine doza gama zračenja, tokom cijelog vremena snimanja spektara, nalaze se u dobroj korelaciji sa izmjerenim nivoima koncentracije aktivnosti radona. Ovo je ne od malog značaja za pouzdanost mjerenja jačine doze gama zračenja u vazduhu, obzirom na dominantan udio gama kvanta koji potiču od izotopa ^{214}Bi i ^{214}Pb , koji su produkti raspada atoma izotopa radona ^{222}Rn .

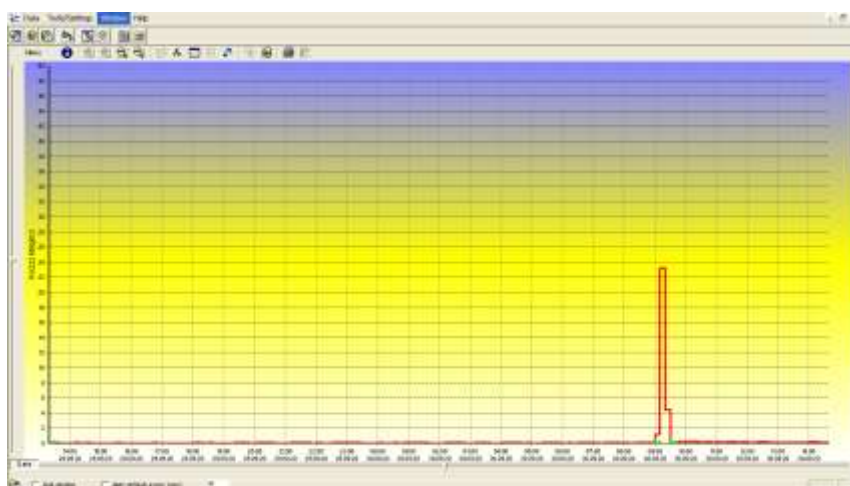
6.4. Rezultati mjerenja koncentracije aktivnosti radona u uzorcima izvorske vode

Da bi se pouzdano sagledao uticaj koncentracije aktivnosti radona na ćelije tkiva luka u realno mogućim uslovima, korištena je prirodna izvorska voda. Koristili su se uzorci izvorske nisko radioaktivne vode, istih zapremina (0.4 L). Za eksperimentalna istraživanja u ovoj disertaciji, korištena je izvorska voda čiji radiološki i hemijski sastav je praćen dugi niz godina, i pouzdano je određen savremenim nuklearnim i hemijskim metodama. Sve te analize pokazale su da ova voda ima stabilan izoptopski sastav, niske aktivnosti radionuklida koji si prisutni u tragovima, što je posebno važno za kvalitet i kontinuitet istraživanja. Na slici 27 prikazan je spektar koncentracije aktivnosti radona u uzorku korištene vode, izmjeren pomoću AlphaGUARD sistema.



Slika 27. Koncentracija aktivnosti radona u korištenoj izvorskoj vodi.

Uspjeh ostvarivanja postavljenih ciljeva u ovoj doktorskoj disertaciji, direktno je zavisio od pouzdanog određivanja koncentracije aktivnosti radona u izvorskoj vodi. Iz tih razloga, nakon deponovanja standarda izotopa ^{226}Ra kao izvora radona ^{222}Rn , povremeno je praćen proces uspostavljanja sekularne radioaktivne ravnoteže ovih izotopa, koja se mogla narušiti u toku izvođenja eksperimenta. Na slici 28 prikazana je koncentracije aktivnosti radona u jednom trenutku vremena, na putu ka uspostavljanju sekularne radioaktivne ravnoteže.



Slika 28. Koncentracija aktivnosti radona u uzorku izvorske vode, čija je vrijednost na putu uspostavljanja sekularne radioaktivne ravnoteže dostigla 100 kBq/m³.

Postupak određivanja koncentracije aktivnosti radona u vodi, zahtijevao je strogu definisanu proceduru za uzorke u kojima je uspostavljena radioaktivna ravnoteža. U cilju dobijanja pouzdanih rezultata, u AlphaGuad sistemu, sniman je kontinuirani spektar 10-to minutnih vrijednosti koncentracija aktivnosti radona u normalnom režimu rada. U zatvorenoj gasnoj cirkulaciji staklenih sudova sistema AquaKIT, negdje na sredini mjernog intervala od 24 sata, radon je izbačen iz uzorka vode pomoću sistema AlphaPUMP [121], sa brzinom

protoka vazduha od 0.05 L/min, u toku 20 min. Nakon tog prinudnog istiskivanja radona iz vode, pumpa je isključena, a sa mjerenjem koncentracije aktivnosti radona u vodi, nastavljeno je do okončanja vremenskog intervala od 24 sata. Na taj način mogao se jasno sagledati efekat, na kojem se zasniva ova dominantna metoda za detekciju radona u vodi. Pik u spektru na slici 28, koji je nastao u datom mjernom trenutku, pokazao je maksimalnu vrijednost generisane koncentracije aktivnosti radona od 23.46 kBq/m³.

6.5. Rezultati makroskopskog i mikroskopskog istraživanja morfologije tkiva luka (*Allium cepa* L.)

Kako je ranije naglašeno, temeljni preduslov uspješne realizacije postavljenih zadataka u aktuelnoj doktorskoj disertaciji, direktno je zavisio od pripreme uzoraka vode sa pouzdano određenim koncentracijama aktivnosti radona. Za eksponiranje meristemskih ćelija korijena *Allium cepa* L., u prvom dijelu eksperimentalnih istraživanja, korišteni su uzorci destilovane vode sa određenim koncentracijama aktivnosti radona. U toku istraživanja, sagledavajući neke preliminarne rezultate efekata zračenja, odlučeno je da se koriste i uzorci jedne izvorske nisko radioaktivne vode, dozirani izvorom radona potrebne aktivnosti. Ideja je bila da se identifikuju potencijalni biološki efekti radona i njegovih produkata raspada, u uslovima kada kada su moguće njihove interakcije sa jonima i atomima elemenata koji su prisutni u izvorskoj vodi. U nedostatku sličnih istraživanja u dostupnoj naučnoj literaturi, naučna znatiželja za što pouzdanije sagledavanje efekta zračenja koje uzrokuje radon u vodi na biološke sisteme, zahtijevala je dodatne napore u realizaciji aktuelne doktorske disertacije.

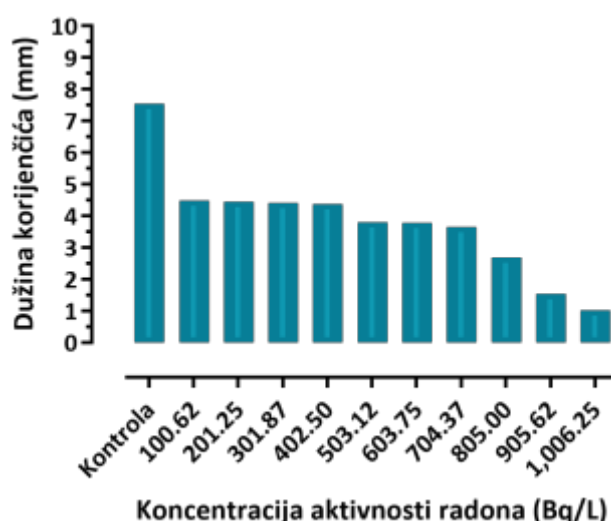
6.5.1 Makroskopski i mikroskopski parametri izlaganja koncentracijama aktivnosti radona u destilovanoj vodi

Prvi makroskopski parametri opservacije u ovoj disertaciji, bili su dužina korijena i broj korijenčića *Allium cepa* L., koji su mjereni nakon izlaganja na raznim koncentracijama aktivnosti radona u toku 48 h. U tabeli 11 i slici 29, prikazan je rast i broj korijena u svakoj grupi lukovica, izražen kao srednja vrijednost izmjerenih dužina prorastanja pojedinačnih korijenčića, koji su bili izloženi koncentracijama aktivnosti radona u destilovanoj vodi.

Dobijeni rezultati mjerenja dužine prirasta korijenčića, pokazuju inhibiciju rasta korijenčića na svim apliciranim koncentracijama aktivnosti radona u vodi. Sa povećanjem koncentracija aktivnosti radona u vodi, inhibicija rasta korijena se povećavala. Iz tabele 11 se vidi, da je zabilježen maksimalan rast korijena na kontrolnoj skupini lukovica, 7.54 mm, a najmanji, 1.01 mm, na lukovicama koje su tretirane na najvećoj koncentraciji aktivnosti radona od 1,006.25 Bq/L. Manja prosječna dužina korijenčića na tretiranim lukovicama u odnosu na kontrolnu seriju lukovica, nesumnjivo je odraz toksičnog djelovanja koncentracije aktivnosti radona, kao dominante varijable u ovom eksperimentu.

Tabela 11. Srednja dužina korijena *Allium cepa* i citološki efekti indukovani na različitim koncentracijama aktivnosti radona u destilovanoj vodi.

Koncentracija aktivnosti radona (Bq/L)	Srednja vrijednost dužine korijena (mm)	Ukupan broj korijenčića luka	% rasta korijena u odnosu na kontrolu
100.62	4.49	168	59.55
201.25	4.44	141	58.90
301.87	4.41	161	58.49
402.50	4.37	149	58.00
503.12	3.80	136	50.40
603.75	3.77	137	50.00
704.37	3.64	135	48.28
805.00	2.68	136	35.54
905.62	1.54	133	20.42
1,006.25	1.01	140	13.40
0 (NK)	7.54	208	100



Slika 29. Dužina korijenčića u zavisnosti od koncentracija aktivnosti radona u destilovanoj vodi.

Smanjeni mitotski indeks, u odnosu na negativnu kontrolu, upućuje na promjene nastale hemijskim djelovanjem tokom rasta i razvoja korijenčića luka [22], što uzrokuje zaostajanje ćelija u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa. Potomci raspada radona ^{222}Rn , su kratkoživeći izotopi ^{218}Po , ^{218}As , ^{214}Pb , ^{214}Bi , ^{214}Po i ^{210}Tl , koji imaju vrijeme poluraspada 3.05 min, 1.5 s, 26.8 min, 19.7 min, 164 ms i 1.32 min, respektivno. Ovi izotopi koji su alfa (α), beta (β) i gama (γ) emiteri, direktno efektom mete, ili indirektno mehanizmom formiranih slobodnih radikala, interaguju sa molekulima meristemskih ćelija *Allium cepa* L. Razumljivo je onda da sa povećanjem koncentracije aktivnosti ovih izotopa u vodi, povećava se intezitet njihovog uticaja na biološke efekte.

U kontroli vrijednost mitotskog indeksa (*MI*) iznosila je 13.78 %. Sa povećanjem koncentracija aktivnosti radona u vodi, konstantovano je smanjenje mitotskog indeksa, u rasponu od 11.77 do 9.84 %, na koncentracijama aktivnosti radona u vodi od 100.62 do 1,006.25 Bq/L, respektivno. Efekti koncentracija aktivnosti radona u destilovanoj vodi, na mitotski indeks (*MI*) i frekvenciju mitotskih faza dati su u tabeli 12.

Tabela 12. Prikaz različitih mitotskih i faznih indeksa meristemskih ćelija *Allium cepa* L., eksponiranih na različitim koncentracijama aktivnosti radona u destilovanoj vodi.

Koncentracija aktivnosti radona (Bq/L)	Broj ćelija	Diobne ćelije	Aberantne ćelije (%)	Deformisane nediobne ćelije (%)	<i>MI</i> (%)	<i>PI</i> (%)			
						Pro	Meta	Ana	Telo
100.62	4,885	560	17.86	6.16	11.46±0.69**	38.95	26.32	13.68	21.05
201.25	4,860	535	30.84	7.82	11.01±0.98**	36.26	26.37	16.48	20.89
301.87	4,825	525	40.00	9.00	10.88±0.71**	38.64	21.59	18.18	21.59
402.50	4,730	499	46.70	11.21	10.55±0.73**	30.09	29.13	17.48	23.30
503.12	4,835	501	57.88	15.00	10.36±0.53***	33.23	24.26	20.41	22.10
603.75	4,770	490	71.02	18.10	10.27±0.45***	36.63	20.13	12.12	31.12
704.37	4,925	491	79.43	18.58	9.97±0.62***	34.67	23.44	14.42	26.18
805.00	4,855	446	84.10	20.80	9.19±0.43***	39.43	20.22	15.24	25.11
905.62	4,875	372	87.36	23.90	7.63±0.50****	28.75	22.33	18.99	29.93
1,006.25	4,675	319	92.48	27.00	6.82±0.45****	27.26	19.85	22.31	30.58
0 (NC)	4,970	685	8.03	1.21	13.78±0.53	31.39	28.47	16.79	23.35

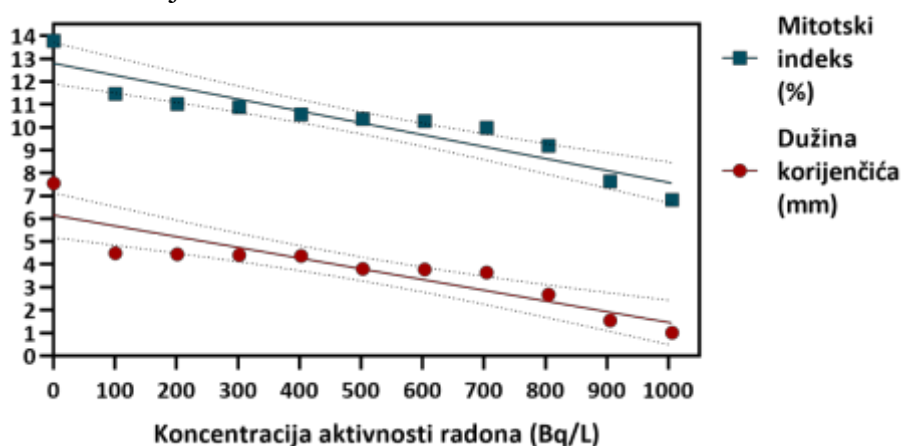
MI: mitotski indeks; *PI*: fazni indeks; Pro: profaza; Meta: metafaza; Ana: anafaza; Telo: telofaza; NC: negativna kontrola. Statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; Analizirano 5,000 ćelija za svaki tretman i negativnu kontrolu.

Na osnovu vrijednosti faznog indeksa iz tabele 9, može se zaključiti da je najveći broj ćelija zastupljen u profazi, što je dokaz dobre proliferativne aktivnosti. S druge strane, postojanje svih faza mitoze, ukazuje da ćelije uspješno završavaju diobu, te se otklanja mogućnost ekstremnog profaznog indeksa, koji bi bio posljedica abnormalne ćelijske proliferacije.

Smanjenje mitotskog indeksa moglo bi biti posljedica inhibicije sinteze DNA [23], [24] ili blokiranja u G_2 fazi ćelijskog ciklusa, sprečavajući ćeliju da uđe u mitozu [25]. Mitotski indeks je prihvatljiva mjera citotoksičnosti u živim organizmima [26], što je potvrđeno i u ovoj disertaciji. Najniži postotak (8.03 %) aberantnih ćelija primijećen je u negativnoj kontroli, a najveći u uzorcima ćelija *Allium cepa* (93.10 %) koje su eksponirane na koncentraciji aktivnosti radona od 1,006.25 Bq/L. Interesantno je naglasiti da je postotak aberantnih ćelija počeo naglo rasti sa povećanjem koncentracije aktivnosti radona, od uzorka koji je tertiran na koncentraciji aktivnosti radna od 402.50 Bq/L, kada je iznosio 49.10 %. Iz tabele 9 se vidi, da je profaza najčešće bilježena faza ćelijskog ciklusa meristemskih ćelija *Allium cepa*, tj. profazni indeks dominantan na svim koncentracijama aktivnosti radona.

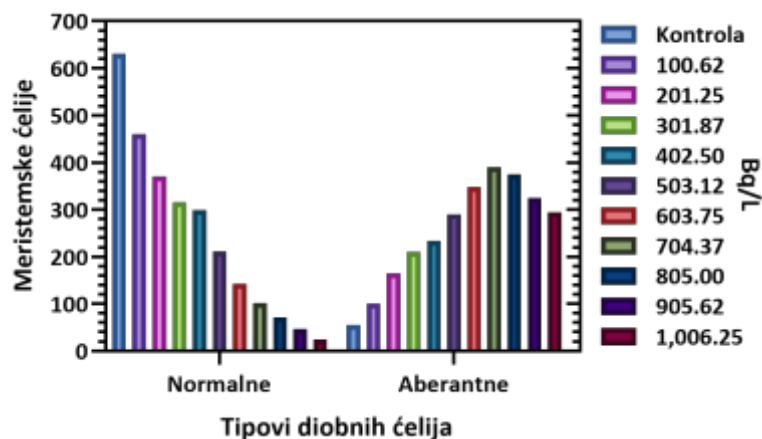
Vrijednosti profaznog indeksa nalazile su se u rasponu od 27.26 do 39.43 %, metafaznog indeksa od 19.85 do 29.13 %, anafaznog indeksa od 12.12 do 22.31 % i telofaznog od 20.89 do 31.12 %.

U cilju sagledavanja citotoksičnosti koncentracije aktivnosti radona u vodi, rast korijena luka i mitotski indeks, korelisani su s koncentracijama aktivnosti radona u destilovanoj vodi, pomoću linearnih Pearsonovih koeficijenta korelacije. U prvom slučaju, slika 30, dobijena je jaka negativna korelacija ($r = -0.78$) rasta korijena i nivoa koncentracija aktivnosti radona u vodi. Takođe i u drugom slučaju, dobijena je jaka negativna korelacija ($r = -0.80$) mitotskog indeksa i različitih koncentracija aktivnosti radona u vodi.



Slika 30. Komparativni prikaz zavisnosti dužine korijena luka i mitotskog indeksa, od nivoa koncentracije aktivnosti radona u destilovanoj vodi.

Odnos normalnih i aberantnih ćelija mijenjao se sa povećanjem koncentracije aktivnosti radona u destilovanoj vodi. Broj normalnih ćelija se skoro linearno smanjivao, dok se broj aberantnih ćelija linearno povećavao sa povećanjem koncentracije aktivnosti radona u uzorcima destilovane vode. Udio aberantnih ćelija u ukupnom broju diobnih ćelija, dostigao je 92.48% na najvećoj, dok je taj udio bio 17.86 % na najmanjoj primijenjenoj koncentraciji aktivnosti radona. Na slici 31. prikazan je odnos normalnih i aberantnih meristemskih ćelija, koje su tretirane koncentracijama aktivnosti radona u uzorcima destilovane vode.



Slika 31. Uporedni prikaz broja normalnih i aberantnih diobnih ćelija, eksponirane na koncentracijama aktivnosti radona u uzorcima destilovane vode.

Udio aberantnih ćelija u ukupnom broju diobnih ćelija negativne kontrole iznosio je 8.03%, što je drastično manje u odnosu na procenat normalnih diobnih ćelija koje su eksponirane na koncentracijama aktivnosti radona u uzorcima destilovane vode. Procenat deformisanih nepodijeljenih ćelija, takođe se povećavao sa porastom koncentracije aktivnosti radona u destilovanoj vodi. Udio deformisanih nepodijeljenih ćelija u ukupnom broju posmatranih ćelija, dostigao je 27.00 % na najvećoj, dok je taj udio bio 6.16 % na najmanjoj primijenjenoj koncentraciji aktivnosti radona. Procenat deformisanih nepodijeljenih ćelija u ukupnom broju posmatranih ćelija negativne kontrole iznosio je 1.21 %, što je pet puta manje u odnosu na procenat deformisanih nepodijeljenih ćelija, koje su eksponirane na najmanjoj primijenjenoj koncentraciji aktivnosti radona od 100.62 Bq/L.

6.5.2 Makroskopski i mikroskopski parametri izlaganja koncentracijama aktivnosti radona u izvorskoj vodi

U tabeli 13, prikazan je rast i broj korijena u svakoj grupi tretiranih lukovica, izražen kao srednja vrijednost izmjerenih dužina prorastanja pojedinačnih korijenčića, koji su bili izloženi odabranim koncentracijama aktivnosti radona u izvorskoj vodi.

Tabela 13. Srednja dužina korijena *Allium cepa* i citološki efekti indukovani na različitim koncentracijama aktivnosti radona u izvorskoj vodi.

Koncentracija aktivnosti radona (Bq/L)	Srednja vrijednost dužine korijena (mm)	Ukupan broj korijenčića luka	% rasta korijena u odnosu na kontrolu
100.77	15.42	177	90.54
201.40	14.58	154	85.61
302.01	13.47	132	79.09
402.65	14.21	151	83.44
503.27	11.38	155	66.82
603.90	10.94	133	64.23
704.51	10.41	126	61.13
805.15	11.02	110	64.70
905.77	7.30	85	42.86
1,006.40	6.45	63	37.87
0.146 (NC)	17.03	181	100

Iz tabele 13 se vidi, da je i u izvorskoj vodi na svim primijenjenim koncentracijama aktivnosti radona, došlo do inhibicije rasta korijenčića *Allium cepa* L. u odnosu na negativnu kontrolu. Međutim, kod izvorske vode za razliku od destilovane vode taj rast je bio neujednačen sa porastom aktivnosti radona u vodi. Ali generalno, sa povećanjem koncentracija aktivnosti radona u vodi, inhibicija rasta korijena se povećavala i u slučaju izvorske vode. Iz tabele 10 se vidi, da je zabilježen maksimalan rast korijena na kontrolnoj skupini lukovica, 17.03 mm, a najmanji, 6.45 mm, na lukovicama koje su tretirane na najvećoj koncentraciji aktivnosti radona od 1,006.40 Bq/L. Manja prosječna dužina

korijenčica na tretiranim lukovicama u odnosu na kontrolnu seriju lukovica, nesumnjivo je dokaz toksičnog djelovanja koncentracije aktivnosti radona u vodi. Efekti koncentracija aktivnosti radona u izvorskoj vodi, na mitotski indeks (*MI*) i frekvenciju mitotskih faza dati su u tabeli 14.

Tabela 14. Prikaz mitotskih i faznih indeksa meristemskih ćelija *Allium cepa*, eksponiranih na različitim koncentracijama aktivnosti radona u izvorskoj vodi.

Koncentracija aktivnosti radona (Bq/L)	Broj ćelija	Diobne ćelije	Aberantne ćelije (%)	Deformisane nediobne ćelije (%)	<i>MI</i> (%)	<i>PI</i> (%)			
						Pro	Meta	Ana	Telo
100.77	956	174	43.10	26.46	18.20±0.00**	32.18	25.86	25.29	16.67
201.40	974	161	48.22	34.98	16.53±0.00**	36.02	24.84	19.87	19.25
302.01	966	155	54.01	39.21	16.04±0.00**	35.48	25.16	18.06	21.29
402.65	987	147	55.23	42.55	14.89±0.00**	40.82	25.85	17.01	16.33
503.27	991	121	62.22	48.34	12.21±0.00**	42.15	29.75	14.88	13.22
603.90	956	118	71.94	55.35	12.34±0.00**	37.29	27.12	20.34	15.25
704.51	947	110	82.11	64.46	11.61±0.00**	52.73	24.54	19.09	12.73
805.15	988	117	89.88	72.61	11.84±0.00**	52.99	17.09	15.38	14.53
905.77	983	86	95.65	88.13	8.75±0.00**	43.02	20.93	22.09	13.95
1,006.40	975	69	97.21	94.22	7.08±0.00**	46.38	27.54	14.49	11.59
0.146 (NC)	993	193	6.22	2.19	19.64±0.00**	35.75	17.10	21.76	25.39

MI: mitotski indeks; *PI*: fazni indeks; Pro: profaza; Meta: metafaza; Ana: anafaza; Telo: telofaza; NC: negativna kontrola. Statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; Analizirano 1,000 ćelija za svaki tretman i negativnu kontrolu.

Iznosi mitotskog indeksa i indeksa replikacije koji se koriste kao pokazatelji adekvatne proliferacije ćelija [126], pokazali su da je na maksimalnim koncentracijama aktivnosti radona u istraživanju, od 905.77 i 1,006.40 Bq/L, došlo skoro do potpune inhibicije rasta korijena *Allium cepa* i drastičnog smanjenja broja mitotičkih faza. Isto kao i kod uzoraka destilovane vode, i u uzorcima izvorske vode, najveći broj ćelija zastupljen je bio u profazi, s tim da je u slučaju uzoraka izvorske vode, razlika između broja zastupljenosti ostalih faza bila znatno manja u odnosu na uzorke destilovane vode.

Najniži postotak (6.12 %) aberantnih ćelija primijećen je u negativnoj kontroli, a najveći u uzorcima meristemskih ćelija korijena *Allium cepa* L. (97.21 %) koje su eksponirane na koncentraciji aktivnosti radona od 1,006.40 Bq/L. Interesantno je naglasiti da je u uzorcima izvorske vode, rast korijena ekponiranih lukovica bio drastično izraženiji.

Iz tabele 14 se vidi, da je profaza najčešće bilježena faza ćelijskog ciklusa meristemskih ćelija *Allium cepa*, tj. profazni indeks dominantan na svim koncentracijama aktivnosti radona, kao i kod uzoraka destilovane vode. Vrijednosti profaznog indeksa nalazile su se u rasponu od 32.18 do 52.99 %, metafaznog od 17.09 do 29.75 %, anafaznog od 14.49 do 25.29 % i telofaznog indeksa od 11.59 do 21.29 %.

U ovoj disertaciji istražene su različite hromozomske aberacije i razna hromatidna oštećenja u meristemskim ćelijama korijena *Allium cepa*, koja predstavljaju pouzdane biomarkere *Allium* test organizma. Analizirano po 5,000 meristemskih ćelija korijena *Allium cepa* L., iz svakog od 10 uzoraka, koji su bili eksponirani različitim koncentracijama aktivnosti radona u destilovanoj vodi, u rasponu od 100.62 do 1,006.25 Bq/L. Isto tako analizirano po 1,000 meristemskih ćelija korijena *Allium cepa* L., iz svakog od 10 tretiranih uzoraka, koji su bili eksponirani koncentracijama aktivnosti radona u izvorskoj vodi, u rasponu od od 100.77 do 1,006.40 Bq/L. Na svakoj od 10 odabranih koncentracija aktivnosti radona u destilovanoj vodi, analizirane su hromozomske aberacije na približno 500 diobnih ćelija, sa 10 najuspješnijih preparata. Iz uzoraka izvorske vode sa koncentracijama aktivnosti radona, analizirane su hromozomske aberacije na 100 diobnih ćelija, sa 5 najuspješnijih preparata.

Sve aplicirane koncentracije aktivnosti radona od 100.62 do 1,006.25 Bq/L u destilovanoj vodi, prouzrokovale su inhibiciju rasta i promjene u mitotskom indeksu ćelija korijena *Allium cepa* L. Sa povećanjem koncentracije aktivnosti radona u destilovanoj vodi, konstantovano je smanjenje mitotskog indeksa, u rasponu od 11.77 do 9.84 %, na koncentracijama aktivnosti radona od 100.62 do 1,006.25 Bq/L, respektivno. Do značajnog smanjenja rasta korijena i mitotskog indeksa meristemskih ćelija *Allium cepa*, došlo je u lukovicama koje su tretirane iznosima koncentracija aktivnosti radona većim od 805.00 Bq/L, što je u blizu vrijednosti 1000 Bq/L koju Evropska unija uzima za granicu, kada je nužno uspostaviti mjere za zaštitu javnog zdravlja. Sa povećanjem koncentracija aktivnosti radona u destilovanoj vodi, progresivno se povećavao aberacijski indeks (CAI), u rasponu od 8.21 do 33.30 %, na koncentracijama aktivnosti radona od 100.62 do 1,006.25 Bq/L, respektivno.

Detektovane aberacije su klasificirane prema Međunarodnom sistemu citogenetičke nomenklature (ISCN) [131], a identifikacija mikronukleusa je vršena na osnovu karakteristika koje su definisali Fenech i saradnici [132]. U tabeli 15, prikazani su hromozomski aberacijski indeksi i fazni indeksi meristemskih ćelija *Allium cepa*, eksponiranih na različitim koncentracijama aktivnosti radona u destilovanoj vodi.

Tabela 15. Hromozomski aberacijski indeksi i fazni indeksi meristemskih ćelija *Allium cepa*, eksponiranih na različitim koncentracijama aktivnosti radona u destilovanoj vodi.

Koncentracija aktivnosti radona (Bq/L)	Broj ćelija	Diobne ćelije	Aberantne ćelije (%)	Deformisane nediobne ćelije (%)	CAI (%)	PI (%)			
						Pro	Meta	Ana	Telo
100.62	4,885	560	17.86	6.16	8.21±0.70*	15.00	65.00	20.00	0.00
201.25	4,860	535	30.84	7.82	11.21±0.98*	12.12	60.61	21.21	6.06
301.87	4,825	525	40.00	9.00	13.35±0.40*	11.90	47.62	33.34	7.14
402.50	4,730	499	46.70	11.21	16.13±0.54*	14.29	42.86	30.61	12.24
503.12	4,835	501	57.88	15.00	21.00±1.80*	12.07	43.10	31.03	13.80
603.75	4,770	490	71.02	18.10	25.40±1.20*	13.00	33.24	32.08	21.68
704.37	4,925	491	79.43	18.58	26.50±0.90*	14.10	32.05	33.34	20.51
805.00	4,855	446	84.10	20.80	28.53±1.05*	13.33	32.00	33.34	21.33
905.62	4,875	372	87.36	23.90	30.56±1.40*	12.31	33.85	30.76	23.08
1,006.25	4,675	319	92.48	27.00	33.30±0.76*	11.86	33.90	32.20	22.04
0 (NC)	4,970	685	8.03	1.21	2.31±0.49	18.18	63.64	18.18	0.00

CAI: hromozomski aberacijski indeks; PI: fazni indeks; Pro: profaza; Meta: metafaza; Ana: anafaza; Telo: telofaza; NC: negativna kontrola. *Statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, $p < 0.05$; Analizirano 5,000 ćelija za svaki tretman i negativnu kontrolu.

Radijacioni genotoksični efekti na hromosome, ozbiljne su posljedice izloženosti bioloških vrsta jonizirajućem zračenju, koje dolazi od radona i njegovih produkata raspada. Budući da je koncentracija aktivnosti radona u vodi dominantna varijabla u ovim eksperimentalnim istraživanjima, uočeni genotoksični efekti na meristemske ćelije korijena *Allium cepa*, su rezultat sinergijskog djelovanja ovih izotopa, koji se serijom nuklearnih raspada transformišu u stabilno olovo ^{206}Pb , emitirajući 5 alfa čestica energije do 7.7 MeV, energija beta zračenja do 2.8 MeV i energija gama zračenja fotona do 2.4 MeV. Iz tabele 44 se vidi, da se vrijednosti hromozomskog aberacijskog indeksa izloženih ćelija u uzorcima destilovane vode, nalaze u opsegu od 8.21% , na koncentraciji od 100.62 Bq/L, do 33.30 % za ćelije koje su zračene na koncentraciji radona od 1,006.25 Bq/L. Indeks hromozomskih aberacija najviše je izražen u metafazi sa frekvencijom pojavljivanja od 32.00 do 65.00 %, zatim, u anafazi od 20.00 do 33.34 %, telofazi od 0.00 do 23.08 % i profazi od 11.86 do 15.00 %. Indeks hromozomskih aberacija meristemskih ćelija korijena *Allium cepa* L. u negativnoj kontroli iznosio je 2.31 %, sa frekvencijom pojavljivanja u profazi 18.18 %, metafazi 63.64 %, anafazi 18.18 % i telofazi 0.00 %.

U tabeli 16, prikazani su hromozomski aberacijski indeksi i fazni indeksi meristemskih ćelija *Allium cepa* L, eksponiranih na različitim koncentracijama aktivnosti radona u izvorskoj vodi. Vrijednosti aberacijskog indeksa eksponiranih ćelija, bile su u opsegu od 17.26 %, na koncentraciji od 100.77 Bq/L do 44.00 % za ćelije koje su tretirane na koncentraciji aktivnosti radona od 1,006.25 Bq/L.

Tabela 16. Hromozomski aberacijski indeksi i fazni indeksi meristemskih ćelija *Allium cepa*, eksponiranih na različitim koncentracijama aktivnosti radona u izvorskoj vodi.

Koncentracija aktivnosti radona (Bq/L)	Broj ćelija	Diobne ćelije	Aberantne ćelije (%)	Deformisane nediobne ćelije (%)	CAI (%)	PI (%)			
						Pro	Meta	Ana	Telo
100.77	956	174	43.10	9.46	17.26±0.00**	14.60	60.03	23.14	2.23
201.40	974	161	48.22	10.98	18.99±0.00**	12.02	58.64	24.22	5.12
302.01	966	155	54.01	13.21	21.94±0.00**	12.34	51.18	30.32	6.16
402.65	987	147	55.23	13.55	21.78±0.00**	13.15	45.37	29.95	11.53
503.27	991	121	62.22	14.34	21.90±0.00**	14.85	39.17	30.88	15.10
603.90	956	118	71.94	16.35	25.10±0.00**	11.98	37.25	31.15	19.62
704.51	947	110	82.11	19.46	28.93±0.00**	10.89	38.11	32.19	18.81
805.15	988	117	89.88	22.61	33.20±0.00**	11.27	35.19	32.42	21.12
905.77	983	86	95.65	29.13	37.84±0.00**	12.23	32.55	31.99	23.23
1,006.40	975	69	97.21	36.90	44.00±0.00**	10.81	31.81	33.86	23.52
0.146 (NC)	993	193	6.22	2.19	3.42±0.00**	19.04	59.61	20.10	1.25

CAI: hromozomski aberacijski indeks; PI: fazni indeks; Pro: profaza; Meta: metafaza; Ana: anafaza; Telo: telofaza; NC: negativna kontrola. *Statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, $p < 0.05$; Analizirano 1,000 ćelija za svaki tretman i negativnu kontrolu.

Kao i u slučaju eksponiranja uzoraka u destilovanoj vodi, u izvorskoj vodi indeks hromozomskih aberacija najviše je izražen u metafazi sa frekvencijom pojavljivanja od 31.81 do 60.03 %, zatim u anafazi od 23.14 do 33.86 %, telofazi od 2.23 do 23.52 % i profazi od 10.81 do 14.85 %. Indeks hromozomskih aberacija meristemskih ćelija korijena *Allium cepa* L. u negativnoj kontroli iznosio je 3.42%, sa frekvencijom pojavljivanja u profazi 19.04 %, metafazi 59.61 %, anafazi 20.10 % i telofazi 1.25 %.

Iz tabela 15 i 16 se vidi, da su koncentracije aktivnosti radona od 805.0 Bq/L, 900.62 Bq/L i 1,005.25 Bq/L u destilovanoj vodi, pokazale su najjači genotoksični efekat u meristemskim ćelijama korijena *Allium cepa*, jer se na ovim koncentracijama uočene najveće frekvencije pojavljivanja aberantnih ćelija, 84.10 %, 87.36 % i 92.48 %, respektivno. Nešto izraženiji hazard na posmatrane ćelije *Allium cepa* L., imale su koncentracije aktivnosti radona od 805.15 Bq/L, 900.77 Bq/L i 1,006.40 Bq/L u izvorskoj vodi, na kojima su frekvencije pojavljivanja aberantnih ćelija iznosile 84.10 %, 87.36 % i 92.48 %, respektivno.

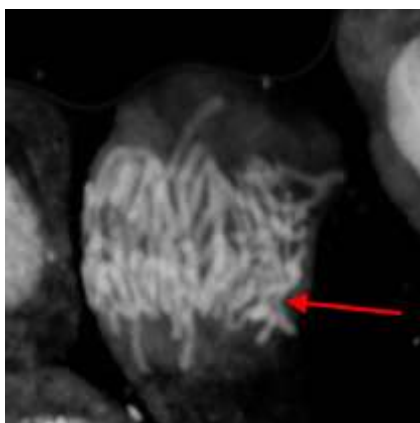
Udio deformisanih nediobnih ćelija u ukupnom broju posmatranih ćelija u izorcima destilovane vode, takođe se uvećavao sa povećanjem koncentracija aktivnosti radona. Na koncentraciji aktivnosti radona od 100.62 Bq/L, taj procenat nepravilnih ćelija iznosio je 6.16 %, dok je na koncentraciji aktivnosti radona od 1,006.40 Bq/L, frekvencija pojavljivanja deformisanih nediobnih ćelija iznosila 36.90 %. U izvorskoj vodi ta tendencija je bila još izraženija, na koncentraciji aktivnosti radona od 100.77 Bq/L, frekvencija deformisanih i nediobnih ćelija iznosila je 9.46 %, a na koncentraciji od 1,006.40 Bq/L njihova frekvencije je bila 36.90 %. U tabeli 17, prikazane su hromozomske aberacije i nuklearne anomalije, koje su indentifikovane u uzorcima destilovane vode.

Table 17. Hromozomske aberacije i nuklearne anomalije (*srednja vrijednost ± SD*) uočene kod meristemskih ćelija *Allium cepa* L. eksponirane na različitim koncentracijama aktivnosti radona u destilovanoj vodi.

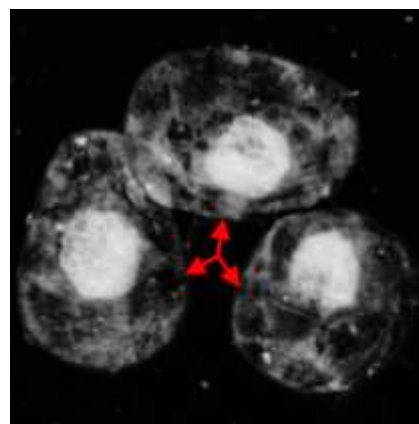
Koncentracija aktivnosti radona (Bq/L)	<i>Mikronukleusi</i>	<i>Ljepljivi hromozomi</i>	<i>Hromozomski mostovi</i>	<i>Lutajući hromozomi</i>	<i>Nepravilna segregacija</i>	<i>Multipolarnost</i>	<i>Apoptoza ćelija</i>	<i>Nekroza ćelija</i>	<i>C-mitoza</i>	<i>Poliploidija</i>	<i>Binuklearne ćelije</i>	<i>Trinuklearne ćelije</i>	<i>Tetranuklearne ćelije</i>	Ukupno
100.62	1 ±0.71	12 ±2.24	4 ±1.23	0 ±0.00	1 ±1.73	0 ±0.00	1 ±1.23	15 ±1.60	1 ±1.00	44 ±3.00	1 ±0.71	0 ±0.00	0 ±0.00	80 ±2.90
201.25	2 ±0.71	17 ±1.60	6 ±1.23	1 ±1.00	2 ±0.71	1 ±0.71	1 ±1.73	13 ±1.60	1 ±1.23	63 ±5.00	2 ±0.71	0 ±0.00	0 ±0.00	109 ±3.10
301.87	2 ±1.00	20 ±2.74	7 ±1.23	1 ±0.71	4 ±0.71	1 ±1.00	1 ±1.23	18 ±4.30	2 ±1.41	71 ±3.40	2 ±0.71	0 ±0.00	1 ±0.71	130 ±7.40
402.50	3 ±1.60	20 ±3.61	5 ±0.71	1 ±1.00	3 ±1.23	3 ±1.00	2 ±0.71	16 ±2.12	5 ±1.41	95 ±9.70	2 ±1.60	0 ±0.00	0 ±0.00	155 ±6.04
503.12	5 ±1.23	22 ±3.32	4 ±1.60	1 ±1.73	4 ±1.60	3 ±2.60	5 ±0.71	17 ±3.40	10 ±1.90	125 ±8.03	4 ±1.23	1 ±1.00	2 ±1.90	203 ±9.57
603.75	5 ±1.90	23 ±4.00	6 ±1.60	2 ±1.60	4 ±1.00	4 ±1.23	5 ±1.60	22 ±3.00	9 ±1.90	156 ±6.70	3 ±1.41	0 ±0.00	0 ±0.00	239 ±7.62
704.37	6 ±1.60	26 ±3.54	7 ±1.60	2 ±1.00	7 ±1.23	6 ±1.60	4 ±1.41	20 ±2.60	8 ±2.35	181 ±8.75	5 ±1.60	1 ±1.73	1 ±0.71	274 ±4.30
805.00	7 ±1.23	27 ±5.24	6 ±1.60	2 ±1.41	5 ±1.90	5 ±1.60	7 ±1.23	25 ±2.60	10 ±2.24	199 ±7.50	4 ±1.00	1 ±1.00	0 ±0.00	298 ±8.50
905.62	7 ±1.90	33 ±2.92	9 ±2.12	3 ±0.71	6 ±1.60	5 ±1.90	8 ±1.23	27 ±2.74	11 ±1.60	222 ±3.54	6 ±1.60	0 ±0.00	1 ±1.00	338 ±5.80
1,006.25	9 ±3.16	36 ±5.43	9 ±1.23	2 ±1.87	7 ±0.71	4 ±1.00	7 ±1.60	33 ±6.04	11 ±1.60	240 ±8.16	6 ±1.41	2 ±0.71	0 ±0.00	366 ±8.16
Negativna kontrola	0 ±0.00	6 ±1.23	0 ±0.00	0 ±0.00	2 ±1.23	1 ±1.00	0 ±0.00	1 ±0.71	0 ±0.00	12 ±2.12	0 ±0.00	0 ±0.00	0 ±0.00	22 ±2.35

Izvršena istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji, pokazala su da je s porastom koncentracije aktivnosti radona u vodi, rastao je i procenat hromozomskih aberacija i nuklearnih anomalija, na svim posmatranim meristemskim ćelijama korijena *Allium cepa* L. Rezultati u tabeli 17, koji su temeljeni na kvantificiranju hromozomskih i nuklearnih aberacija, ukazali su na značajne citotoksične i genotoksične učinke, povezane s prisustvom poliploidija, hromosomskih adherencija, hromozomskih mostova i prekida, C-mitoza, mikronukleusa i drugih nuklearnih anomalija.

Na svim primijenjenim koncentracijama aktivnosti radona, najfrekventnija hromozomska aberacija je bila poliploidija (slika 32), čija je srednja vrijednost frekvencije na tretiranim ćelijama bila 63.6 %. Njen udio u ukupnom broju hromozomskih aberacija, povećavao sa povećanjem koncentracije aktivnosti radona. Na višim koncentracijama aktivnosti radona u vodi, uočen je veliki broj divovskih ćelija, slika 33.



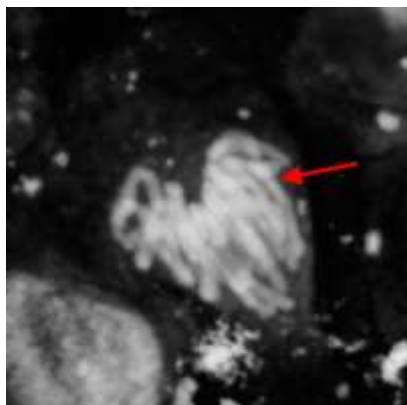
Slika 32. Poremećena anafaza u poliploidnoj ćeliji na koncentraciji od 1,006.25 Bq/L.



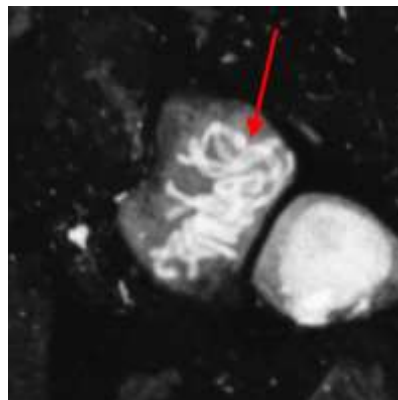
Slika 33. Džinovske ćelije uočene na koncentraciji od 905.62 Bq/L.

Poliploidija se odnosi na numeričku promjenu u cijelom skupu hromozoma [22]. Gigantske ili divovske ćelije su obično poliploidne i nastaju kao posljedica endomitoze ili endoreplikacije [23]. Očito je da su reaktivni kratkoživeći produkti raspada radona, i zračenja koje emituju, djelovali direktno ili indirektno na genetički materijal, i narušili strukturu diobenog vretena i uzrokovali njegovu disfunkciju. Svakako da su posljedice tog djelovanja i genomske mutacije, koje su dovele do pojave aneuploidije ili poliploidije. Poliploidne ćelije nastaju multipliciranjem čitavog genoma. U endoreplikaciji, ćelije sa repliciranim genomom zaobilaze mitozu, a zatim ponovo repliciraju svoju DNK, što rezultira poliploidijom. Sa povećanjem koncentracije aktivnosti radona u vodi, povećavao se potencijal induciranja poliploidija.

Druga najučestalija hromozomska aberacija u eksperimentu, na svim ispitivanim koncentracijama aktivnosti radona u vodi, bila je ljepljivost hromozoma (slike 34 i 35), čija je srednja vrijednost frekvencije na tretiranim ćelijama u destilovanoj iznosila 11 %, a u izvorskoj vodi 13 %.



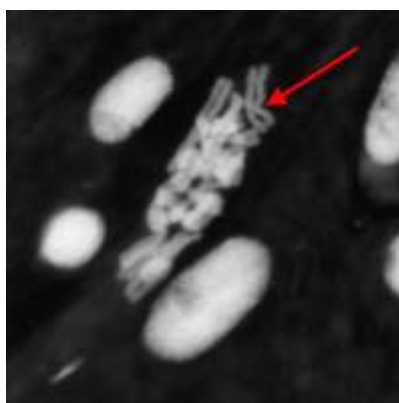
Slika 34. Ljepljiva metafaza uočena na koncentraciji od 704.37 Bq/L.



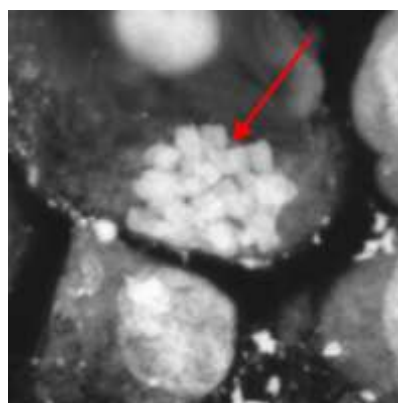
Slika 35. Ljepljiva metafaza uočena na koncentraciji od 805.15 Bq/L.

I udio ljepljivih hromozoma u ukupnom broju hromozomskih aberacija, povećavao sa povećanjem koncentracije aktivnosti radona u vodi. Ljepljivi hromosomi se odnose na tendenciju hromosomskih nosača ili cijelih hromosoma da se drže zajedno, povećavajući šansu za preuređenje događaja. U ovom istraživanju, prisutnost ljepljivih hromozoma bila je velika na svim tretiranim uzorcima u destilovanoj i izvorskoj vodi, a naročito pri višim koncentracijama aktivnosti radona, što ukazuje na toksični učinak radionuklida. Udio ljepljivih hromozoma u ukupnom broju aberantnih ćelija iznosio je 11 % u destilovanoj vodi i 14 % u izvorskoj vodi. Sljepljivanje hromosoma se javlja kao posljedica toksičnosti i uzrokuje smrt ćelije [24].

Radionuklidi kao genotoksične materije, u ćelijama izazivaju aberaciju nazvanu C-mitoza, koja je posljedica oštećenog mitotskog mehanizma diobenog vretena (slike 36 i 37).



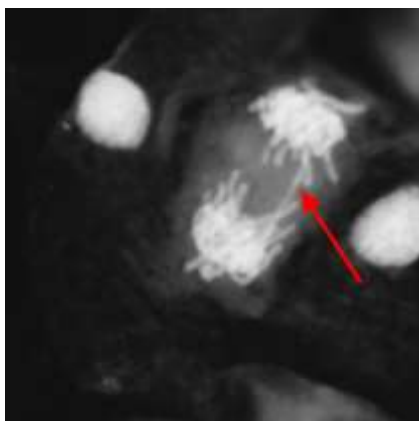
Slika 36. C-mitoza zapažena na koncentraciji od 805.15 Bq/L.



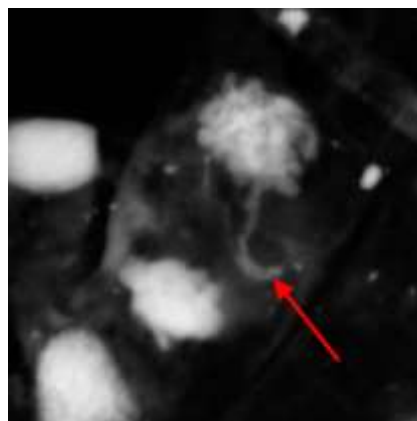
Slika 37. Ljepljiva zvjezdana metafaza na koncentraciji od 704.37 Bq/L.

Pri stvaranju vještačke C-mitoze, dolazi do slobodne raspodjele metafaznih hromozoma u ćeliji. Srednja vrijednost frekvencije C-mitoze na tretiranim ćelijama u destilovanoj vodi iznosila je 3.1 %, a u izvorskoj vodi 3.9 %, i imala je tendenciju progresivnog povećavanja u zavisnosti od koncentracije aktivnosti radona u vodi. Za vrijeme C-mitoze hromozomi su više kontrahirani što pospješuje širenje njihove zapremine. Ukoliko se vještačka mitoza dalje nastavi, dolazi do udvostručavanja hromozoma. Ovakav razvoj događaja uzrokovat će nastanak ćelija sa više jezgara ako se blagovremeno ne formira zaštitni ćelijski zid. Pri tome može doći do stvaranja aneuploidnih ćelija, čiji broj hromozoma odstupa od normalnog broja hromozoma u ćeliji.

Hromozomski mostovi se javljaju u mitozu, kada su telomere sestrinskih hromatida spojene zajedno i ne odvajaju se potpuno u njihovim kćerkama ćelijama, slike 38 i 39. Njihova zastupljenost na svim ispitivanim koncentracijama iznosila je 2.8 % kod uzoraka destilovane vode, i 3.2 % kod uzoraka izvorske vode. Anafazni mostovi mogu uzrokovati strukturne mutacije hromozoma. Najveći broj hromozomskih mostova je zapažen na koncentracijama aktivnosti radona od 905.62 i 1,006.25 Bq/L destilovane vode, i na koncentracijama od 905.77 i 1,006.40 Bq/L uzoraka izvorske vode.

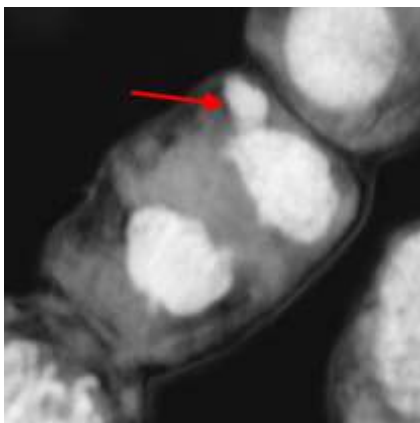


Slika 38. Anafazni most uočen na koncentraciji od 704.37 Bq/L.

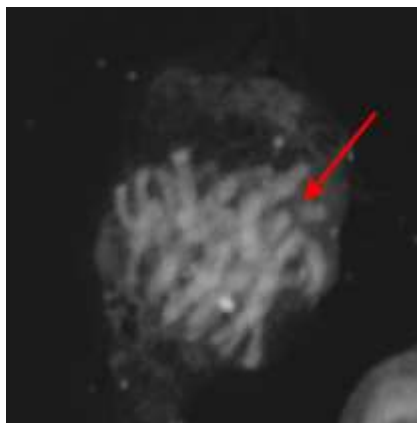


Slika 39. Slomljen telofazni most uočen na koncentraciji od 704.37 Bq/L.

Hromozomske aberacije usko su povezane sa oštećenjem DNK, dok je indukcija mikronukleusa u meristemskom tkivu korijena *Allium cepa* L., manifestacija oštećenja hromozoma i poremećaja u procesu mitoze. Mikronukleus nastaje novom membranom koja se razvija oko hromatinske materije koja se nije uspjela pomaknuti ni na jedan pol tokom anafaze, slika 40. Takva materija hromatina nastaje ili anomalnom disjunkcijom hromozoma uslijed abnormalnosti mikrotubula diobenog vretena ili lomljenjem hromozoma, slika 41, što rezultira stvaranjem acentričnih fragmenata, dicentričnih hromozoma i hromozomskih mostova.



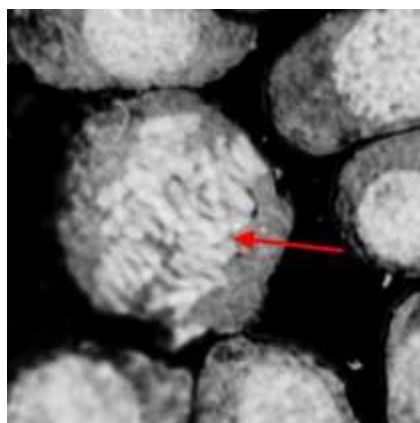
Slika 40. Telofazni mikronukleus uočen na koncentraciji od 603.75 Bq/L.



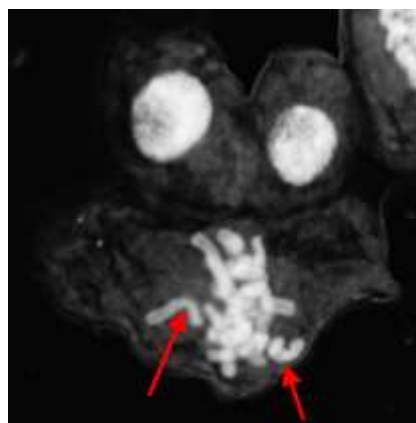
Slika 41. Slomljeni hromozom uočen na koncentraciji od 503.27 Bq/L.

Mikronukleusnim testom potvrđena su očekivanja, da frekvencija mikronukleusa pokazuje jasnu zavisnost od povećanja koncentracije aktivnosti radona u vodi. Ukupna učestalost mikronukleusa bila je 2.1 % u uzorcima destilovane vode, a 2.9 % kod uzoraka izvorske vode. Minimalan broj mikronukleusa u ovom istraživanju je pronađen na najmanjoj koncentraciji aktivnosti radona od 100.62 Bq/L u uzorku destilovane vode i na koncentraciji od 100.77 Bq/L izvorske vode. Najveći broj mikronukleusa uočen je na najvećim koncentracijama aktivnosti radona: 1,006.25 Bq/L u destilovanoj vodi i na 1,006.40 Bq/L u izvorskoj vodi. Indukcija mikronukleusa sugerira da su koncentracije radona u vodi bile inhibitori vretena ili klastogeni.

U istraživanju identifikovani su multipolarni hromozomi, slika 42, čija je frekvencija pojavljivanja iznosila 1.5 % kod uzoraka destilovane vode, 2.1 % kod uzoraka izvorske vode. Frekvencija lutajućih hromozoma u uzorcima destilovane vode, slika 43, iznosila je 0.7 %, dok je kod uzoraka izvorske vode iznosila 1.1 %.

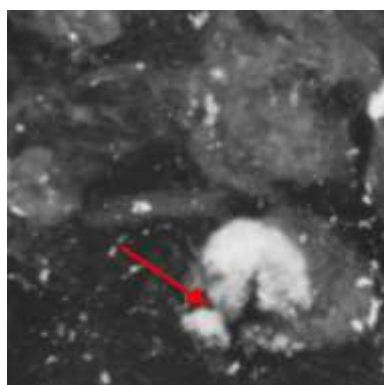


Slika 42. Multipolarna anafaza uočena na koncentraciji od 402.65 Bq/L.

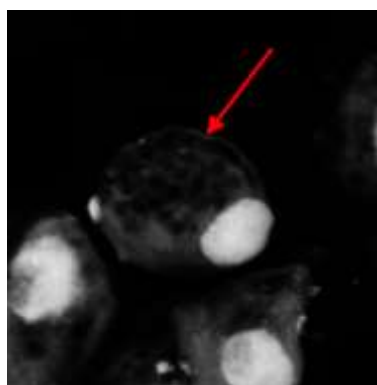


Slika 43. Lutajući hromozomi uočeni na koncentraciji od 301.87 Bq/L.

Apoptoza, slika 44, najizraženiji je i najbolje proučavan oblik programirane ćelijske smrti i igra važnu ulogu u normalnom razvoju organizma, homeostazi tkiva i patogenezi [23]. Čelije nakon zračenja također mogu doživjeti smrt uslijed mitotičke katastrofe, starenja ili nekroze [24, 25]. Čelije koje umiru apoptozom imaju specifična morfološka svojstva, po kojima se značajno razlikuju od ćelija koje umiru nekrozom. Radon je inducirao programiranu ćelijsku smrt, koja je zabilježena u malom iznosu od 1.9 % u destilovanoj vodi, i 1.3 % u izvorskoj vodi, od ukupnog broja promatranih ćelija. Udio nekrotičnih ćelija, slika 45, iznosio je 9.3 % u destilovanoj vodi, a 7.9 % kod uzoraka u izvorskoj vodi, što dokazuje citogenetičke efekte radioaktivnog gasa radona na meristemske ćelije korijena *Allium cepa* L.

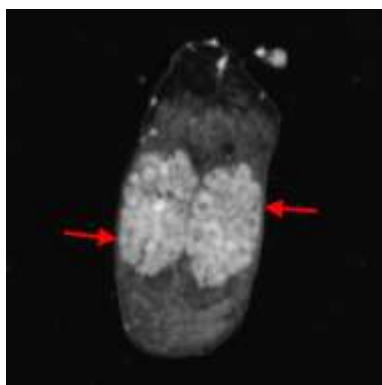


Slika 44. Apoptoza uočena na koncentraciji od 402.65 Bq/L.

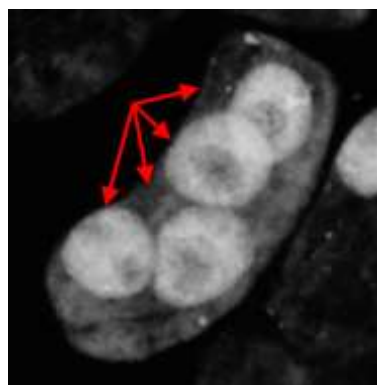


Slika 45. Lutajući hromozomi uočeni na koncentraciji od 301.87 Bq/L.

Posmatranjem citogenetskih preparata kod svih tretiranih uzoraka, sporadično su pronađene binuklearne (1.6 %), slika 46, trinuklearne (0.2 %) i tetranuklearne ćelije (0.2 %), slika 47, kod uzoraka destilovane vode. U ispitivanim uzorcima izvorske vode, takođe su pronađene binuklearne, trinuklearne, i tetranuklearne ćelije, sa frekvencijom pojavljivanja 1.9 %, 0.7 %, 0.3 %, respektivno.

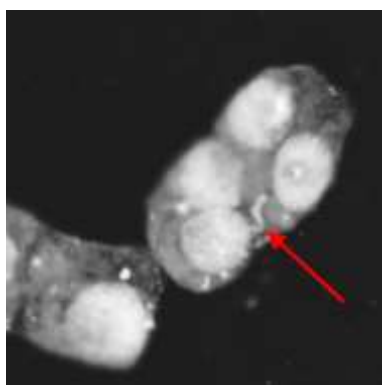


Slika 46. Binuklearna ćelija uočena u profazi na koncentraciji od 402.65 Bq/L.

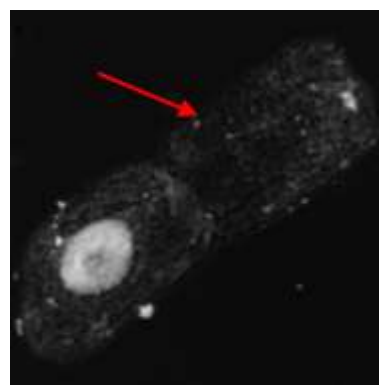


Slika 47. Tetranuklearna ćelija uočena na koncentraciji od 301.87 Bq/L.

Binuklearnih i trinuklearnih ćelija je najviše detektovano na najvećoj koncentraciji od 1,006.25 Bq/L dok su na ovoj koncentraciji izostali tetranukleusi. Tetranuklearne ćelije sa nuklearnim pupom, slika 48, prvi put u toku eksperimenta, uočene su na koncentraciji od 301.88 Bq/L što nam govori o štetnosti vrijednosti ovih koncentracija na genom meristemskih ćelija korijena *Allium cepa* L. Najveći broj ovih nuklearnih anomalija, zabilježen je na koncentraciji od 503.12 Bq/L. Uočene su i ćelije bez nukleusa, slika 49, poznate kao "duh ćelije", koje se javljaju kao specifične pojave karakteristične za mnoge vrste tumorskog tkiva.

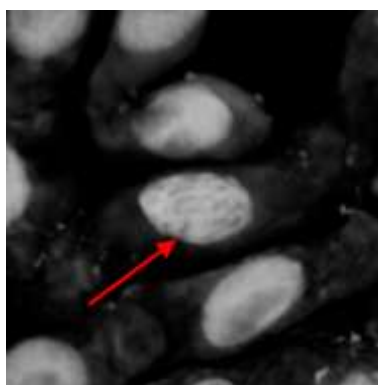


Slika 48. Nuklearni pup u tetranuklearnoj ćeliji na koncentraciji od 503.12 Bq/L.



Slika 49. Duh ćelija bez nukleusa uočeni na koncentraciji od 503.27 Bq/L.

Mikroskopskom analizom izloženih ćelija pri različitim koncentracijama aktivnosti radona, otkrivene su citološke abnormalnosti, poput hiperhromazije ćelijskog nukleusa, slika 50. Normalne ćelije često postaju hiperhromatične kada su oštećene. Neke vrste kancera nastaju gotovo u potpunosti od hiperhromatičnih reaktivnih ćelija, zato se ove ćelije koriste kao markeri za dijagnozu.



Slika 50. Hiperhromazija nukleusa uočena na koncentraciji od 301.87 Bq/L.

Prisustvo ovih anomalija, zajedno hromosomskim aberacijama, koje su identifikovane u uzorcima destilovane i izvorske vode, dovede do zaključka o negativnom uticaju primijenjenih koncentracija aktivnosti radona, na testirane biotičke sisteme.



Slika 51. Rad na pripremi standarda i postavljanje uzoraka u Laboratoriji za detekciju, dozimetriju i zaštitu od zračenje Univerziteta u Tuzli.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih rezultata istraživanja radiobioloških efekata raznih koncentracija aktivnosti radona u vodi, na meristemske ćelije korijena *Allium cepa* L., može se zaključiti:

Sve aplicirane koncentracije aktivnosti radona od 100.62 do 1,006.25 Bq/L, u uzorcima destilovane vode, prouzrokovale su inhibiciju rasta i promjene u mitotskom indeksu ćelija korijena *Allium cepa* L. Takođe, i u uzorcima izvorske vode, sve aplicirane koncentracije aktivnosti radona od 100.77 do 1,006.40 Bq/L, prouzrokovale su inhibiciju rasta i promjene u mitotskom indeksu ćelija korijena *Allium cepa* L. Međutim, u uzorcima izvorske vode, inhibicija rasta korijena bila je manja, a vrijednosti mitotskog indeksu bile su veće, u odnosu na uzorke destilovane vode.

Do značajnog smanjenja rasta korijena i mitotskog indeksa meristemskih ćelija *Allium cepa*, došlo je u lukovicama koje su tretirane iznosima koncentracija aktivnosti radona većim od 100 Bq/L, što potvrđuje opravdanost preporuke Evropske unije iz 2001. godine, za referentni nivo koncentracije aktivnosti radona u vodi od 100 Bq/L.

Opravdanost preporuke Evropske unije iz 2001. godine, za referentni nivo koncentracije aktivnosti radona u vodi od 100 Bq/L, potvrđena je i slučaju hromozomskih aberacija i nuklearnih anomalija, čiji se broj prepoznatljivo uvećavao sa porastom koncentracije aktivnosti radona u vodi.

Najveće smanjenje rasta korijena i mitotskog indeksa, i najveći broj hromozomskih aberacija i nuklearnih anomalija, zabilježen je na primijenjenim koncentracijama aktivnosti radona u vodi većim od 500 Bq/L, što je pola vrijednosti se iznosa od 1000 Bq/L, koji je akcioni nivo, koji se uzima za granicu, kada je nužno uspostaviti mjere za zaštitu javnog zdravlja.

Rezultati u disertaciji, temeljeni na kvantificiranju hromozomskih i nuklearnih aberacija, ukazali su na značajne citotoksične i genotoksične efekte. Na svim primijenjenim koncentracijama aktivnosti radona, najfrekventnija hromozomska aberacija je bila poliploidija. Druga najučestalija hromozomska aberacija na svim ispitivanim koncentracijama aktivnosti radona u vodi, bila je ljepljivost hromozoma. Radionuklidi kao genotoksične materije, indukovali su u ćelijama i veliki broj C-mitoza, hromozomskih mostova, mikronukleusa, i drugih nuklearnih anomalija. Jedan od ciljeva u ovoj doktorskoj disertaciji, bio je definisanje korelacije između citogenetičkih efekata i nivoa koncentracije aktivnosti radona u vodi, koji je ostvaren u ovom detaljnom istraživanju.

Dobijeni rezultati u ovoj disertaciji, predstavljaju dobru osnovu za pouzdano proučavanje uticaja jonizirajućeg zračenja koje dolazi od radona i njegovih produkata raspada u vodi, na biološke sisteme, koji je uzrokovao koncentracijom aktivnosti radona. Detektovana inhibicija rasta korijena, smanjeni mitotski indeks, i značajno povećanje broja aberantnih ćelija, koji su prikazani u rezultatima ovog istraživanja, pokazatelj su toksičnih učinaka svih primijenjenih koncentracija aktivnosti radona.

Na temelju rezultata dobijenim u ovom istraživanju, zaključuje se da je korišteni biljni *Allium* test, osjetljiv i pouzdan biološki test, za utvrđivanje uticaja radioizotopa kao opasnih kontaminatora u životnoj sredini.

Na osnovu uvida u dostupnu naučnu literaturu, ovo istraživanje predstavlja prvu detaljnu analizu uticaja koncentracije aktivnosti radona u vodi, dobijena *in vivo* pomoću biljnog test organizma. Ova inicijalna istraživanja vezana za štetno dejstvo radona u vodi, direktno su primjenljiva u radijacionoj citogenetici, koja otvaraju nove mogućnosti biljnih test organizama, u sagledavanju radijacionih efekata na biotičke sisteme.

8. LITERATURA

- [1] Knoll F.(2000). Radiation detection and measurement, 3rd Edition, New York, p.1.
- [2] UNSCEAR (2012). United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation 2008 Report. Volume I, p.4.
- [3] Rodrigues, A.S, Oliveira N.G, Monteiro, G. O., Leonard, A., Rueff, J. (2005). Use of cytogenetic indicators in radiobiology. Radiation Protection Dosimetry, Vol. 115, No. 1–4, pp. 455–460.
- [4] International Atomic Energy Agency(2010). Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students, Training course, Viena, series No.42, p. 23.
- [5] Marnett, L., James N., Riggins, J. and West J.(2003). Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. Journal of Clinical Investigation, 111(5): 583-593.
- [6] United States Environmental Protection Agency(2012). A Citizen's Guide to Radon: The Guide to Protecting Yourself and Your Family from Radon. EPA402/K-12/002.
- [7] Tedesco, S.B. & Laughinghouse H.D.(2012). Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. In: Srivastava J., editor. Environmental Contamination. IntechOpen; Rijeka, Croatia: pp.137-156.
- [8] Lachman, J., Pronek, D., Hejtmankova, A. (2003). Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties. Horticultural Science, 30, 142-147.
- [9] UNSCEAR (2000). Sources, effects and risks of ionizing radiation United Nations Scientific Committee on Effects of Atomic Radiation. Report to the General Assembly, Volume I: Sources Vol. E.00.IX.3. pp. 1-654. New York. United Nations.
- [10] Domenech, H. (2017). Radiation Safety Management and Programs. Springer International Publishing Switzerland.
- [11] NCRP Report No. 160 (2009). Ionizing Radiation Exposure of the Population of the United States. National Council on Radiation Protection and Measurements.
- [12] UNSCEAR (2008). Effects of Ionizing Radiation. Volume I: Report to the General Assembly, Scientific Annexes A and B. UNSCEAR 2006 Report. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. United Nations, New York.
- [13] Barzilov, P.A., Ivan S. Novikov, S.I. & Phillip C. Womble, C.P. (2012). Material Analysis Using Characteristic Gamma Rays Induced by Neutrons. In: Adrovic F., editor. Gamma radiation. IntechOpen; Rijeka, Croatia: pp. 1-16.

- [14] Ninkovic, M. & Adrovic, F. (2012). Air kerma rate constants for nuclides important to gamma ray dosimetry and practical application. In: Adrovic F., editor. Gamma radiation. IntechOpen; Rijeka, Croatia: pp. 1-16.
- [15] Beer, J., Cracken, K., Steige, R. (2012). Cosmogenic Radionuclides: Theory and Applications in the Terrestrial and Space Environments. Publisher: Springer, Berlin.
- [16] UNSCEAR (1993). Sources and Effects of Ionizing Radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. 1993 Report to the General Assembly, with scientific annexes. United Nations, New York.
- [17] IAEA (International Atomic Energy Agency) (2003). Guidelines for radioelement mapping using gamma ray spectrometry data. TEC DOC - 1363.
- [18] Durrani, S. A. & Ilić, R. (1997). Radon measurements by etched track detectors: Applications in radiation protection. Earth sciences and environment, World Scientific Publishing.
- [19] UNSCEAR (1994). Report to the General Assembly, with scientific annexes, Sources and effects of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, United Nations, New York.
- [20] Adrovic, F. (2017). Introductory Chapter: Radon Phenomenon. In: Adrovic F., editor. Radon. IntechOpen; Rijeka, Croatia: pp. 1-5.
- [21] Official Journal of the European Union (2014). Council Directive 2013/59/ Euratom of 5 December 2013, Section 3, Article 74.
- [22] Gržetić, I. & Jelenković, R. (1995). Prirodni radioaktivni elementi, geološko porijeklo i oblici pojavljivanja i migracije. Monografja: Jonizujuća zračenja iz prirode, JDZZ, Beograd; pp. 1-39.
- [23] World Health Organization (2008). Guidelines for drinking-water quality: incorporating 1st and 2nd addenda, Vol.1, Recommendations. – 3rd ed. Geneva.
- [24] National Research Council (US) (1999). Committee on Risk Assessment of Exposure to Radon in Drinking Water. National Academies Press (US), Washington.
- [25] Ravikumar, P. & Som R. K. (2014). Determination of the radiation dose due to radon ingestion and inhalation. Int. J. Environ. Sci. Technol. 11:493–508.
- [26] Committee on Risk Assessment of Exposure to Radon in Drinking Water (1999). Transfer of radon from water to indoor air, Pergamon Press.
- [27] Asakainen, M., Kahlos, H. (1980). Natural radioactivity of drinking water in Finland, Health Phys., 39, pp 77-83.

- [28] WHO (2009). WHO Handbook on Indoor Radon. A Public Health Perspective. World Health Organisation, Geneva.
- [29] Smičiklas, I. and Šljivić-Ivanović, M. (2016). Radioactive Contamination of the Soil: Assessments of Pollutants Mobility with Implication to Remediation Strategies. In: Larramendy, L.M., editor, Soloneskik S., Co-editor: Soil Contamination. IntechOpen; Rijeka, Croatia: pp. 253-276.
- [30] Dimović, S., Smičiklas, I., Šljivić-Ivanović, M., Dojčinović, B. (2013). Speciation of ⁹⁰Sr and other metal cations in artificially contaminated soils: The influence of bone sorbent addition. Journal of Soils and Sediments 13:383-39.
- [31] Sokolik, I. N., Winker, D. M., Bergametti, G., Gillette, D. A., Carmichael, G., Kaufman, Y. J., Gomes L., Schuetz, L., Penner, J. E. (2001). Introduction to special section: Outstanding problems in quantifying the radiative impacts of mineral dust, Journal of Geophysical Research Atmospheres 106 (D16): 18015-18028.
- [32] Ng, J.C., Juhasz, A., Smith E, Naidu R. (2015). Assessing the bioavailability and bioaccessibility of metals and metalloids. Environmental Science and Pollution Research. Vol. 22, pp. 8802-8825.
- [33] Koch, I., Reimer, K.J., Bakker, M.I., Basta, N.T., Cave, M.R., Denys, S., et al. (2013). Variability of bioaccessibility results using seventeen different methods on a standard reference material, NIST 2710. Journal of Environmental Science and Health A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering. Vol.48, pp.641-655.
- [34] International Commission on Radiation Units and Measurements (2011). Seltzer, S. M., ed. "Report 85: Fundamental Quantities and Units for Ionizing Radiation". Journal of the International Commission on Radiation Units and Measurements (Revised). 11(1).
- [35] International Commission on Radiological Protection (2007). The 2007 Recommendations of the international commission on radiological protection. ICRP Publication 103, pp. 266-271.
- [36] Faussot, A. (2009). Grandeurset unités dosimétriques. ATSR, 4
- [37] International Commission on Radiation Units and Measurements (1971). Radiation quantities and units ICRU Report 19.
- [38] International Commission on Radiological Protection (2007). The 2007 Recommendations of the International commission on radiological protection. ICRP Publication 103, p. 275.
- [39] International Commission on Radiological Protection (2007). The 2007 Recommendations of the International Commission on radiological protection. ICRP Publication 103, pp. 272.
- [40] ICRP (1991). Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 60. Ann. ICRP 21 (1-3).

- [41] ICRP(1977). Recommendations of the ICRP. ICRP Publication 26. Ann. ICRP 1 (3).
- [42] Hrabak, M., Padovan, R.S., Kralik, M., Ozretic, D., Potocki, K. (2008). Nikola Tesla and the Discovery of X-rays. *RadioGraphics*. 28(4): 1189-92.
- [43] Stabin, M.(2008). *Fundamentals of Nuclear Medicine Dosimetry*. Springer. New York.
- [44] Adrović,F.(2006). *Fizika-odabrana poglavlja iz optike, atomske i nuklearne fizike*. Copygraf, Tuzla.
- [45] UNSCEAR (2012). United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic . Radiation Biological mechanisms of radiation actions at low doses. Report V. New York.
- [46] Rühm, W., Azizova, T., Bouffler, S.,Cullings, M.H., Little, P. M., Walsh, L. and Woloschak, G. E. (2018). Typical doses and dose rates in studies pertinent to radiation risk inference at low doses and low dose rates. *J Radiat Res*. 59(2):1-10.
- [47] Domenech, H., (2017). *Radiation Safety Management and Programs*, Springer International Publishing. Switzerland.
- [48] Vranjes, S., Orlic, M., Vucina, J. (2005). Biological effects of ionizing radiation on cell. *Acta Clinica* 5:50-63.
- [49] Milacic, S. (2005). Chromosomal aberrations like biomarkers of exposition to ionizing radiation *Acta Clinica*; 5:64-71.
- [50] Berberović, Lj. & Hadžiselimović, R. (1977). *Rječnik nauke o evoluciji*. Svjetlost, Sarajevo.
- [51] Đelić, N. & Stanimirović, Z. (2009). *Principi genetike*. ELIT MEDICA. Beograd.
- [52] Hartl, D. & Jones, E. (2005). *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*. Jones & Bartlett Publishing, Burlington, MA, USA.
- [53] Strachan, T., Goodship, J., Chinnery, P. (2014). *Genetics and Genomics in Medicine*. Garland Science, Taylor & Francis. New York, USA.
- [54] Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell. J. (2000). *Molecular Cell Biology*, 4th edition. W. H. Freeman. New York.
- [55] Emery AEH. (1986). *Osnovi medicinske genetike, šesto englesko izdanje*. Savremena administracija, Beograd.
- [56] Ibrulj, S., Haverić, S., Haverić, A.(2008). *Citogenetičke metode - Primjena u medicini*. Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Sarajevo.

- [57] Sigurdardottir, S., Goodman, B.K., Rutberg, J., Jabs, E.W., Geraghty, M.T. (1999). Clinical, cytogenetic, and fluorescence in situ hybridization findings in two cases of "complete ring" syndrome. *Am J Med Genet.* 87, pp. 384-390.
- [58] Casper, A. M., Greenwell, P. G., Wei Tang, W. and Thomas D. Petes, T. D. (2009). Chromosome Aberrations Resulting From Double-Strand DNA Breaks at a Naturally Occurring Yeast Fragile Site Composed of Inverted Ty Elements Are Independent of Mre11p and Sae2p. *Genetics.* 183(2): pp.423-439.
- [59] Zergollern, Lj., Hitrec, V., Polak, J. (1984). Recipročna translokacija otkrivena kroz probanda s nebalansiranranim kariotipom-parcijalna trisomija 10q. *Acta Med Jug;*38:203–312.
- [60] Biesecker, G. L. and Spinner, N.B.(2013). A genomic view of mosaicism and human disease. *Nature reviews, Genetics,* Vol 14, pp. 307-320.
- [61] Larkins, B.A., Dilkes, B.P., Dante, R.A., Coelho, C.M., Woo, Y.M., Liu Y.(2001). Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *J Exp Bot.* 52(355): 183-92.
- [62] Corte, F. Pastor, N.(2003). Induction of endoreduplication by topoisomerase II catalytic Inhibitors. *Mutagenesis.* Vol.18 , No 2. pp.105-112.
- [63] Hadžiselimović, R., Pojskić, N.(2005). Uvod u humanu imunogenetiku. Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju. Sarajevo.
- [64] Žlender, V.(2003). Apoptoza-programirana smrt stanice. *Arh Hig Rada Toksikol,* 54:267-274.
- [65] UNSCEAR(1982). Report to the General Assembly, with Scientific Annexes, Sources and Effects of Ionizing Radiation, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. New York: United Nations.
- [66] ICRP(1993). Protection Against Radon-222 at Home and at Work.ICRP Publication 65.
- [67] ICRP (1994). Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. ICRP Publication 66.
- [68] ICRP (1984). Principles for Limiting Exposure of the Public to Natural Sources of Radiation.ICRP Publication 39.
- [69] WHO (2016). Radon and Health. World Health Organization. WHO Headquarters in Geneva.
- [70] NRC (1999). Health Effects of Exposure to Radon: BEIR VI (Free Executive Summary). National Research Council.

- [71] UNSCEAR (2010). Exposures of the public and workers from various sources of radiation UNSCEAR 2008 Report to the General Assembly of the United Nations with Scientific Annexes, Annex B: United Nations, New York.
- [72] ICRP (2014). Radiological protection against radon exposure. ICRP Publication 126. Ann. ICRP 43(3).
- [73] Darby, S., Hill, D., Auvinen et al., A. (2005). Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*. 330(7485):223.
- [74] United States Environmental Protection Agency (2012). Report to Congress: Radon in drinking water regulations, EPA 815-R-12-002.
- [75] Somlai, K., Tokonami, S., Ishikawa, T., Gaspar, M., Jobbagy, V. J., Kovacs, T. (2007). ²²²Rn concentrations of water in Highland and in the southern part of Hungary, and the assessment of the resulting dose. *Radiation Measurements*, 42(3), 491-495.
- [76] Darby, S et al. (2005). Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*, 330(7485): 223.
- [77] National Academy of Science (NAS) (1999). Report of the Committee on Risk Assessment of Exposure to Radon in Drinking Water, Board on Radiation Effects Research, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press, Washington, DC.
- [78] European Union Commission Recommendation on the protection of the public against exposure to radon in drinking water supplies (2001). *Office Journal of the European Community*, L 344:85-88.
- [79] Federal Register (2015). The Daily Journal of US Government, Linear no-threshold model and Standards for protection against radiation, A proposed rule by the Nuclear Regulatory Commission.
- [80] Calabrese, E.J., (2013). Hormetic mechanisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 43:580-606.
- [81] Нинковић, М. М. (2017). Дилема LNT или HORMESIS моделу заштити од зрачења и нуклеарно оружје. Друштво за заштиту од зрачења Србије и Црне Горе, Београд. Симпозијум 29, 3-14.
- [82] Grant, W. F. (1982). Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 99, 273–291.
- [83] Lucky, T.D. (1999). *Radiation Hormesis*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- [84] Feinendegen, L. E. (2005). Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *British Journal of Radiology*, 78: 3-7.

- [85] Janiak, K. M., Wincenciak, M., Cheda, A., Nowosielska, E., Calabrese, R. (2017). Cancer immunotherapy: how low-level ionizing radiation can play a key role. *Cancer Immunolgy Immunotherapy*. 66(7): 819–832.
- [86] Scott, B. R., and Palma, J. D. (2007). Sparsely Ionizing Diagnostic and Natural Background Radiations are Likely Preventing Cancer and Other Genomic-Instability-Associated Diseases. *Dose-Response* 5(3):230-55.
- [87] Brooks, A. L. (2012). A History of the United States Department of Energy (DOE): Low Dose Radiation Research Program:1998-2008, Review Draft.
- [88] Cullings , H. M. (2014). Impact on the Japanese atomic bomb survivors of radiation received from the bombs. *Health Phys.* 106(2):281-93.
- [89] Takatori, M., Yagi, M and Hattori ,S. (2013). Potential Solutions in Radiation Hormesis *Journal of Cancer Research Updates*, 2, 95-98.
- [90] Feinendegen, L. E., Brooks, A. L., Morgan, W. F. (2011). Biological consequences and health risks of low-level exposure to ionizing radiation: commentary on the workshop. *Health Phys.* 100(3): 247-59.
- [91] Møller, A.P. and Mousseau, T. A. (2015). Biological Indicators of Ionizing Radiation in Nature. In: Armon, R., O. Hänninen, O., editors. *Environmental indicators*. Springer, New York, pp. 871- 881.
- [92] Kienzl, K., Riss, A., Vogel, W., Hackl, J., Götz, B. (2003). Bioindicators and biomonitors for policy, legislation and administration. In : Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G. editors. *Bioindicators & Biomonitors Principles, Concepts and Applications*. Vol. 6, pp. 85-122.
- [93] Ma, T. H. (1999). The international program on plant bioassaysand the report of the follow- up study after the hands-on work shop in China. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 426(2):103–106.
- [94] Nefic, H., Musanovic, J., Metovic, A. and Kurteshi, K. (2013). Chromosomal and Nuclear Alterations in Root Tip Cells of *Allium Cepa* L.Induced by Alprazolam. *Med Arch.* 2013 67(6): 388–392.
- [95] Matsumoto, S., T., Mantovani, M. S., Malagutti, M. I. A., et al. (2006). Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips.*Genetic and Molecular Biology*, 29:148-158.
- [96] Rodriguez-Ruiz, A., Asensio, V., Soto, M., Marigómez, I. (2014). Toxicity assessment through multiple endpoint bioassays in soils posing environmental risk according to regulatory screening values. *Environment and Soil Pollution*, 21(16):9689-708.

- [97] Silva, J. & Fonseca, M. B. (2003). Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. In: Genética Toxicológica, Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J. A. P.(Orgs.), pp. 69-84, Ed. Alcance, Porto Alegre.
- [98] Leme, D. M. & Marin - Morales, M. A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, 682, pp. 71–81.
- [99] El-Shahaby, A. O., Abdel Migid, H. M., Soliman, M. I. & Mashaly, I. A. (2003). Genotoxicity screening of industrial waste water using the *Allium cepa* chromosome aberration assay, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6, 1, pp. 23-28.
- [100] Vicentini, V. E.P., Camparoto, M. L., Teixeira, R.O. & Mantovani, M. S. (2001). *Averrhoa carambola* L., *Skeels* and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. *Acta Scientiarum*, 23, 2, pp. 593-598.
- [101] Fritsch, R. M., Keusgen, M.(2006). Occurrence and taxonomic significance of cysteine sulphoxides in the genus *Allium* L. (Alliaceae). *Phytochemistry*, 67, 1127-1135.
- [102] Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S. (2001). Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J. Clin. Pathol*, 54, 356-361.
- [103] Tatić, B. (1975). Rod *Allium* L., u: Josifović, M., urednik. Ed. Flora SR Srbije VII, SANU, Beograd, 565-592.
- [104] Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of chromatography A*, 1112, 3-22.
- [105] Pareek, S., Sagar, N. A., Sharma, S. and Kumar, V. (2014). Onion(*Allium cepa* L.). *Environ Sci Pollut Res Int.*, 21(16), pp. 9689-708.
- [106] Zhu, J.W., Chen, T., Guan, J., Liu, W. B., Liu, J. (2012). Neuroprotective effects of allicin on spinal cord ischemia-reperfusion injury via improvement of mitochondrial function in rabbits. *Neurochemistry international*, 61, 640-8.
- [107] Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Najman, K., Drzewiecki, J. *et al.* (2008). Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. *Journal of Agr.and Food Chemistry*, 56, 4418-26.
- [108] Bora, K., Sharma, A. (2009). Phytoconstituents and therapeutic potential of *Allium cepa* Linn.- a review. *Pharmacognosy Reviews*, 3, 170-180.
- [109] Corzo-Martinez, M., Corzo, N., & Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 609–625.
- [110] Santas, J., Carbo, R., Gordon, M. H., & Almajano, M. P. (2008). Comparison of the antioxidant activity of two Spanish onion varieties. *Food Chemistry*, 107, 1210–1216.

- [111] Alpha GUARD (2008). Portable Professional Radon Monitor. Saphymo GmbH, Genitron Instruments. Germany.
- [112] AquaKIT (1997). Accessory for radon in water measurement in combination with the radon monitor AlphaGUARD. User manual, Genitron Instruments. Germany.
- [113] Alpha PUMP (2001). Technical Description, User manual. Genitron Instruments. Germany.
- [114] AlphaE (2017). Ultra-Small radon monitor – Bertin. Saphymo GmbH. Frankfurt, Germany.
- [115] Durrani, S. Ilic, R. (1997). Radon Measurements *by* etched track detectors. Applications in Radiation Protection. Earth Sciences and the Environment, Singapore.
- [116] RadoMeter (2000). Sistem za detekciju radona pomoću nuklearnih trag detektora. PMF Univerziteta u Tuzli, Laboratorija za detekciju, dozimetriju i zaštitu od zračenja.
- [117] Genrich, V. (1996). Long-term observation of the natural gamma background radiation. IRPA1996, International Congress on Radiation Protection, Viena.
- [118] MiniTRACE γ (2010). Saphymo GmbH. Frankfurt, Germany.
- [119] Ernst, W. H. O. (2003). The use of higher plants as bioindicators. In: Markert, B. A., Breure, A. M., Zechmeister, H. G, editors. Bioindicators & Biomonitor. Principles, Concepts and Applications. Elsevier, pp. 423-579.
- [120] Ma, T. H. (1999). The international program on plant bioassay sand the report of the follow-up study after the hands-on work shop in China. MutatRes. 426(2):103-106.
- [121] Ma, T. H., Cabrera, G. L., Owens, E.(2005). Genotoxic agents detected by plant bioassays. Rev Environ Health. 20(1):1-14.
- [122] Al Sabti, K., Kurelec, B.(1985). Chromosomal aberration in onion (*Allium cepa*) induced by water chlorinationby-products. BEnviron Contam Tox. 34:80-88.
- [123] Grant, W. F., Salamone, M.F.(1994). Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the International program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. MutatRes. 310(2):187-209.
- [124] Firbas, P.& Amon, T.(2014). Chromosome damage studies intheonion plant *Allium cepa* L. International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, V. 67, pp. 25-35.
- [125] Rozgaj, R., Kašuba, V., Šimić, D.(2002). The frequency of dicentrics and acentrics and the incidence of rogue cells in radiation workers. Mutagenesis, 17(2):135-9
- [126] Gadano, A., Gurni, A., Ferraro, G. (2003). In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. Journal of Ethnopharmacology 81(1):11.

- [127] Bhatta, P. and Sakya, S.R. (2008). Study of mitotic activity and chromosomal behaviour in root meristem *Allium cepa* L. treated with magnesium sulphate. ECOPRINT 15: pp. 83-88.
- [128] Hayashi, M. (2016). The micronucleus test-most widely used *in vivo* genotoxicity test. Genes Environ. 38:18.
- [129] Schmid, W. (1975). The micronucleus test. Mutation Research, 31(1): 9-15
- [130] Barbosa, I. S., Pereira-Magnata, S., Amaral, A., Sotero, G. Melo, H. C. (2005). Dose assessment by quantification of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes from patients exposed to gamma radiation. Genetics and Molecular Biology, Brazilian Society of Genetics 28, 3, 452-457.
- [131] Anne Vral, A., Fenech, M., Thierens, H. (2011). The micronucleus assay as a biological dosimeter of *in vivo* ionising radiation exposure. Mutagenesis, Vol. 26, 1, pp. 11–17.
- [132] Rukavina, D., Hasanbašić, D., Sofradžija, A., Haverić, A., Haverić, S., Ajanović, A., Gilić, Z. (2012). Učestalost hromatskih aberacija i mikornukleusa u limfocitima konja nakon *in vitro* ozračenja niskim dozama jonizirućeg zračenja. Veterinaria 61, 51-62.