

## ارزیابی گذشته‌نگر میزان پرتوگیری با استفاده از روش رنگ‌آمیزی هیبریدی فلورسانس و بررسی آسیب‌های پایدار کروموزومی

سیدابوالقاسم حائری

پژوهشکده راکتور، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، تهران، ایران.

\*تهران، سازمان انرژی اتمی ایران، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده راکتور، کدپستی: ۱۴۳۹۹-۵۱۱۱۳

پست الکترونیکی: ahaeri@aeoi.org.ir

### چکیده

هدف دزسنجی زیستی، تخمین میزان پرتوگیری افراد پرتوکار و یا درگیر در سوانح مختلف پرتوی با استفاده از میزان تغییرات در شاخص‌های زیستی است. روش‌های سیتوژنتیکی، از شایع‌ترین و کاربردی‌ترین روش‌های دزسنجی زیستی هستند. در موارد پرتوگیری مزمن یا درازمدت، روش سیتوژنتیک هیبریدی فلورسانس مورد استفاده قرار می‌گیرد که در آن، بررسی تعداد آسیب‌های پایدار کروموزومی، معیاری برای تخمین میزان پرتوگیری افراد است. هر آزمایشگاه دزسنجی زیستی، برای تخمین صحیح و دقیق میزان پرتوگیری، باید منحنی کالیبراسیون اختصاصی برای انواع مختلف پرتو در دزها و آهنگ دزهای مختلف را تهیه کند. در این تحقیق، پس از نمونه‌گیری از خون دو مرد سالم و غیر سیگاری، نمونه‌ها تحت تابش دزهای ۰/۵ تا ۲ گری اشعه ایکس ساطع شده از دستگاه شتاب‌دهنده خطی قرار داده و پس از جداسازی لنفوسیت‌های خون محیطی و کشت سلولی، گستره متافازی آن‌ها تهیه شد. پس از انجام رنگ‌آمیزی هیبریدی فلورسانس بر روی گستره‌های متافازی، به کمک میکروسکوپ فلورسانس، آسیب‌های پایدار کروموزومی ایجاد شده توسط دزهای مختلف پرتو در لنفوسیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس میزان آسیب‌های پایدار کروموزومی مشاهده شده در دزهای مختلف پرتو ایکس، منحنی دز-پاسخ استخراج شد که از آن می‌توان برای ارزیابی گذشته‌نگر پرتوگیری‌های شغلی و حوادث پرتوی مختلف بهره‌برداری کرد.

**کلیدواژگان:** دزسنجی زیستی، فلورسانس هیبریدی، لنفوسیت‌های خون محیطی، آسیب‌های پایدار کروموزومی، منحنی کالیبراسیون.

### ۱. مقدمه

هستند. در روش‌های فیزیکی، تخمین دز معمولاً با استفاده از نشانگرهای مناسب و یا شبیه‌سازی‌های کامپیوتری انجام می‌شود [۲]. در روش‌های زیستی، برای تخمین میزان پرتوگیری از نشانگرهای زیستی استفاده می‌شود و میزان تغییر آن‌ها ملاکی برای تخمین میزان پرتوگیری است. نشانگرهای

تخمین دقیق میزان پرتوگیری افراد در موارد شغلی و یا حوادث مختلف پرتوی، از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای برخوردار و برای درمان ضایعات پرتوی و ارائه مشاوره‌های پزشکی از ضرورت‌های اصلی است [۱]. در میان روش‌های مختلف دزسنجی، روش‌های فیزیکی و زیستی دارای کاربرد بیشتری

مراحل اصلی برای بهره‌برداری از روش‌های مختلف دزسنجی زیستی است. هدف از مطالعه حاضر، راه‌اندازی، بهینه‌سازی و تهیه منحنی دز-پاسخ با استفاده از آسیب‌های پایدار کروموزومی القا شده توسط دزهای مختلف اشعه ایکس با استفاده از روش رنگ‌آمیزی هیبریدی فلورسانس کروموزومی برای استفاده در دزسنجی زیستی پرتوگیری‌های مزمن و یا گذشته‌نگر است.

## ۲. مواد و روش‌ها

تمامی موارد توصیه‌شده در راهنمای فنی آژانس بین‌المللی انرژی اتمی برای رسم منحنی دز-پاسخ مدنظر قرار گرفته و رعایت شدند [۵].

### ۱.۲. نمونه‌گیری و پرتودهی

با توجه به ملاحظات اخلاقی، پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی از دو فرد سالم و غیر سیگاری (۳۲ و ۳۶ ساله) که حداقل یک ماه قبل از نمونه‌گیری هیچ دارویی به‌خصوص آنتی‌بیوتیک دریافت نکرده بودند، ۱۲ میلی‌لیتر از خون آن‌ها با استفاده از سرنگ آغشته به هپارین سدیم گرفته شد. هر یک از نمونه‌های خون در ۴ لوله فالكون استریل تقسیم شده و لوله‌ها در داخل تانک آب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. دزهای صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ گری اشعه ایکس با استفاده از دستگاه شتاب‌دهنده خطی با انرژی ۶ مگا‌ولت به نمونه‌ها تابانیده شد. بلافاصله پس از تابش‌دهی، نمونه‌ها به مدت دو ساعت در گرم‌خانه<sup>۷</sup> ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس مراحل کشت سلولی آغاز گردید.

### ۲.۲. کشت و محصول‌برداری لنفوسیت‌ها

هر نمونه خون از دو فرد سالم و غیر سیگاری (۳ میلی‌لیتر)، ابتدا با ۳ میلی‌لیتر سالیین بافر فسفات استریل، رقیق شده و

زیستی مختلفی برای تخمین میزان پرتوگیری افراد شناسایی شده که نشانگرهای سیتوژنتیکی، جزء معتبرترین و کاربردی‌ترین آن‌ها می‌باشند [۳].

بررسی میکروسکوپی میزان وقوع آسیب‌های ناپایدار کروموزومی مانند دی‌سانتريک<sup>۱</sup> و حلقه<sup>۲</sup> در کشت لنفوسیت‌های خون محیطی افراد پرتو دیده، روش رایج و استاندارد شده برای تخمین زیستی میزان پرتوگیری است که به روش آنالیز متافاز یا سنجش دی‌سانتريک معروف است [۴]. در پرتوگیری‌های مزمن و درازمدت، روش سنجش دی‌سانتريک دقت خود را برای تخمین دز از دست می‌دهد. در این موارد، برای غلبه بر محدودیت‌های سنجش دی‌سانتريک، روش جایگزین توصیه‌شده توسط آژانس بین‌المللی انرژی اتمی، بررسی جابه‌جایی‌های پایدار کروموزومی مانند جابه‌جایی‌های دوجانبه<sup>۳</sup> و غیر دوجانبه<sup>۴</sup> با استفاده از رنگ‌آمیزی هیبریدی فلورسانس<sup>۵</sup> است [۵].

از آن‌جاکه جابه‌جایی‌های پایدار کروموزومی در طول تقسیم سلولی به‌صورت ثابت و پایدار باقی می‌مانند، این نوع آسیب‌های کروموزومی را برای تخمین دز در موارد پرتوگیری‌های مزمن و یا گذشته‌نگر<sup>۶</sup> مورد استفاده قرار می‌دهند [۵، ۶]. با توجه به وجود اختلاف در منحنی‌های کالیبراسیون آزمایشگاه‌های مختلف دزسنجی زیستی، تفسیر دز با استفاده از منحنی‌های کالیبراسیون سایر آزمایشگاه‌ها باعث افزایش عدم قطعیت در تخمین دز خواهد شد. بنابراین، توصیه آژانس بین‌المللی انرژی اتمی این است که هر آزمایشگاه دزسنجی زیستی، منحنی دز-پاسخ مختص به خود را تهیه کند و مورد بهره‌برداری قرار دهد [۵]. تهیه منحنی دز-پاسخ، یکی از

<sup>1</sup> Dicentric

<sup>2</sup> Ring

<sup>3</sup> Reciprocal

<sup>4</sup> Non-reciprocal

<sup>5</sup> Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

<sup>6</sup> Retrospective

<sup>7</sup> Incubator

### ۳.۲. تعیین اندیس میتوزی

به منظور تعیین درصد سلول‌های میتوزی به کل سلول‌ها (اندیس میتوزی)، یک اسلاید از هر نمونه با استفاده از رنگ گیمسای<sup>۲</sup> ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده با گیمسای را با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰۰ بررسی کرده و برای هر نمونه، درصد سلول‌های میتوزی در ۱۰۰۰ سلول محاسبه شد.

### ۴.۲. مراحل رنگ‌آمیزی هیبریدی فلورسانس

رنگ‌آمیزی اختصاصی دو جفت کروموزوم (۴ با استفاده از روش هیبریدی فلورسانس در دو روز کاری و در چهار مرحله اصلی بر روی اسلایدها انجام شد. مراحل واسرشته کردن<sup>۳</sup> و هیبریداسیون DNA در روز اول رنگ‌آمیزی انجام شد. در روز دوم، مراحل شستشو برای حذف تداخل‌های DNA آزاد و آشکارسازی انجام شدند [۵]. در نهایت، تمامی اسلایدها با رنگ دپی<sup>۴</sup> رنگ‌آمیزی شده و با استفاده از لامل<sup>۵</sup>، اسلایدها تثبیت شدند [۵].

### ۵.۲. بررسی میکروسکوپی اسلایدها

اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده با روش هیبریدی فلورسانس با کمک میکروسکوپ فلورسانس مجهز به فیلترهای مخصوص (برای شناسایی طیف‌های مختلف نوری) بررسی شدند و آسیب‌های پایدار مشاهده شده در کروموزوم‌های ۱ و ۴ مورد شمارش قرار گرفتند. همچنین با کمک فیلتر مخصوص مشاهده نتیجه رنگ‌آمیزی دپی، آسیب‌های ناپایدار کروموزومی دی‌سانتريک و حلقه شمارش شدند.

سپس به لوله‌های حاوی ۳ میلی‌لیتر فایکول منتقل و سانتریفیوژ شدند تا لئوسیت‌های نمونه خون جداسازی شوند. به لئوسیت‌های جداسازی شده در زیر هود استریل، ۴/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت RPMI-1640 اضافه شد و سپس یک میلی‌لیتر سرم جنین گاو، ۵۵ میکروگرم فیتوهم‌گلوتینین (با غلظت نهایی ۱۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت) و ۰/۱ میلی‌لیتر پنی‌سیلین - استرپتومایسین نیز به آن افزوده شد و درب لوله را محکم کرده و داخل گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پس از گذشت ۴۵ ساعت از شروع کشت، برای متوقف نمودن دوک‌های تقسیم سلولی، ۲۰ میکرولیتر کلسمید (با غلظت نهایی ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) در شرایط استریل به محیط کشت اضافه شد و لوله‌ها مجدداً به گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد بازگردانده شدند. ۴۸ ساعت پس از شروع کشت، لوله‌ها را از گرم‌خانه خارج کرده و سپس به مدت ۸ دقیقه و با سرعت زاویه‌ای ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز رویی رسوب را به‌طور کامل خارج کرده و برای ایجاد شوک هیپوتونیک، ۲ میلی‌لیتر از محلول آبی پتاسیم کلرید ۰/۰۷۵ مولار به لوله‌ها اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس لوله‌ها دوباره سانتریفیوژ شده و فاز رویی رسوب خارج شد. برای تثبیت لئوسیت‌ها، ۲ میلی‌لیتر از محلول تازه تهیه‌شده متانول - استیک اسید (با نسبت حجمی ۳ به ۱) به رسوب‌های سلولی اضافه شد. پس از تکرار دوباره مرحله تثبیت لئوسیت‌ها، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول تثبیت کننده را با توده سلولی مخلوط کرده و با استفاده از دستگاه پخش‌کننده متافاز<sup>۱</sup>، ۵۰ میکرولیتر از محلول تثبیت کننده حاوی لئوسیت‌ها بر روی هر اسلاید پخش شده و گستره‌های متافازی تهیه شدند.

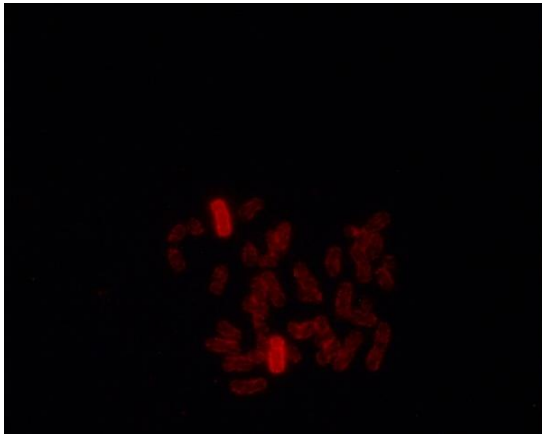
<sup>2</sup> Giemsa

<sup>3</sup> Denaturation

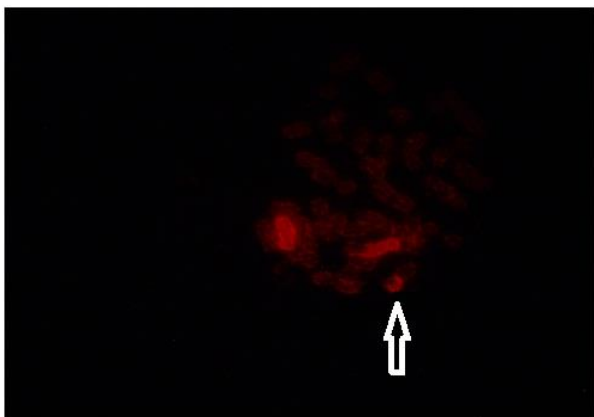
<sup>4</sup> 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

<sup>5</sup> Cover glass

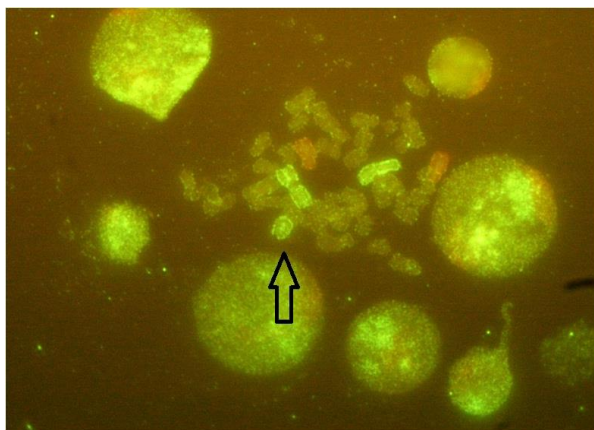
<sup>1</sup> Metaphases Spreader



شکل (۳): کروموزوم شماره ۴ رنگ آمیزی شده با Texas red.



شکل (۴): جابه‌جایی در کروموزوم شماره ۴ رنگ آمیزی شده با Texas red (پیکان، قطعه جابه‌جا شده را نشان می‌دهد).



شکل (۵): جابه‌جایی در کروموزوم شماره ۱ رنگ آمیزی شده با FITC (پیکان، قطعه جابه‌جا شده را نشان می‌دهد).

### ۳. نتیجه‌گیری

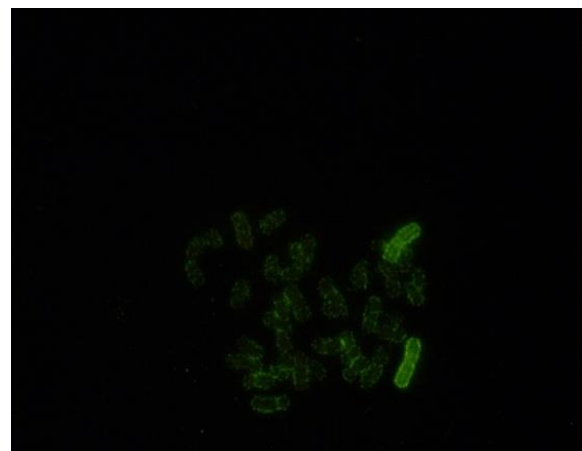
برای هر نمونه، به ازای هر دز پرتو، ۱۰۰۰ گستره متافازی مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. نتایج به‌دست‌آمده از

شکل ۱، نمونه‌ای از گستره متافازی قابل مشاهده با فیلتر دپی را نشان می‌دهد. در شکل ۲، کروموزوم شماره ۱ که با FITC<sup>۱</sup> رنگ آمیزی شده و به رنگ سبز درآمده است نشان داده شده است. شکل ۳، کروموزوم شماره ۴ که با Texas Red رنگ آمیزی شده و به رنگ قرمز درآمده، به تصویر کشیده شده است.

شکل ۴، جابه‌جایی در کروموزوم شماره ۴ رنگ آمیزی شده با Texas Red (قابل مشاهده به صورت یک قطعه اضافی قرمز رنگ) را نشان می‌دهد. شکل ۵، جابه‌جایی در کروموزوم شماره ۱ رنگ آمیزی شده با FITC (قابل مشاهده به صورت یک قطعه اضافی سبز رنگ) را نشان می‌دهد.



شکل (۱): نمونه‌ای از گستره متافازی قابل مشاهده با فیلتر دپی.



شکل (۲): کروموزوم شماره ۱ رنگ آمیزی شده با FITC.

<sup>۱</sup> Fluorescein isothiocyanate

بررسی آسیب‌های ناپایدار و پایدار کروموزومی برای دزهای ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ گری اشعه ایکس، در جدول ۱ خلاصه شده است. پس از استخراج میزان آسیب‌های پایدار در هر دز پرتو، منحنی دز-پاسخ میزان آسیب‌های پایدار به ازای هر دز پرتو برای نمونه خون دو فرد سالم و غیرسیگاری مورد بررسی و میانگین آن‌ها ترسیم شد (شکل ۶). محور X منحنی، دز پرتو ایکس تابش شده به نمونه‌ها و محور Y میزان آسیب‌های پایدار به ازای هر سلول را نشان می‌دهد. برازش منحنی بر روی میانگین داده‌ها نشان‌دهنده خطی-درجه دو بودن منحنی به دست آمده است (رابطه ۱).

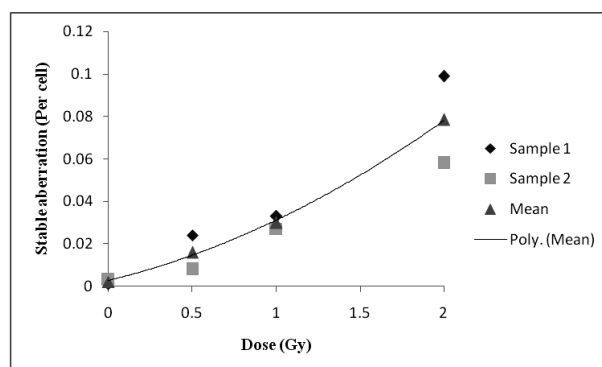
$$y = 0.009x^2 + 0.019x + 0.002 \quad (1)$$

که در آن Y میزان بیراهی‌های پایدار مشاهده‌شده و X دز پرتو ایکس است. منحنی دز-پاسخ حاصل از این تحقیق با منحنی‌های ارائه شده توسط سایر محققین از نظر خطی-درجه دو بودن مشابهت نشان می‌دهد [۷-۹].

برای دزسنجی گذشته‌نگر، بررسی جابه‌جایی‌های پایدار کروموزومی از جایگاه خاصی برخوردار است. علت این امر، عبور و بقاء کروموزوم‌های دارای این نوع آسیب‌ها از مرحله تقسیم سلولی و انتقال آن‌ها به سلول‌های دختری می‌باشد. این در حالی است که سلول‌های دارای آسیب‌های ناپایدار، اغلب در طی گذر از مرحله میتوزی از بین رفته و حذف می‌شوند [۱۰].

جدول (۱): میزان آسیب‌های پایدار و ناپایدار کروموزومی پس از تابش دزهای مختلف اشعه ایکس (بر اساس رنگ‌آمیزی FISH).

دز پرتو (گری)	تعداد گستره بررسی شده	آسیب‌های ناپایدار		آسیب‌های پایدار	
		دی سانتریک	آسنتریک <sup>۱</sup>	جابه‌جایی‌های ساده	جابه‌جایی‌های غیر دوجانبه
۰	۲۰۰۰	۰	۶	۱	۳
۰/۵	۲۰۰۰	۱	۲	۷	۲۵
۱	۲۰۰۰	۴	۱۴	۱۴	۴۶
۲	۲۰۰۰	۱۹	۲۱	۳۰	۱۲۲



شکل (۶): منحنی دز-پاسخ آسیب‌های پایدار کروموزومی در دزهای مختلف اشعه ایکس برای نمونه خون دو فرد سالم و غیرسیگاری.

<sup>۱</sup> Acentric  
<sup>۲</sup> Terminal

جابه‌جایی‌های پایدار ممکن است به‌صورت ساده (جابه‌جایی دوجانبه بین دو کروموزوم) و یا پیچیده<sup>۱</sup> (مانند جابه‌جایی‌های غیردوجانبه) اتفاق بیفتد که البته هر دو نوع آسیب در دزسنجی گذشته‌نگر دارای اهمیت بوده و باید لحاظ شوند [۱۱]. اگر نمونه خون تا حدود یک سال پس از پرتوگیری از فرد گرفته شود، سنجش دی‌سانتريک، روش قابل قبولی برای تخمین میزان پرتوگیری خواهد بود و بررسی آسیب‌های ناپایدار کروموزومی کفایت می‌کند [۱۰]. البته روش سنجش دی‌سانتريک، تا چند سال پس از وقوع حادثه پرتویی نیز قابل استفاده است، هرچند که دقت روش با افزایش فاصله زمانی بین پرتوگیری و بررسی کروموزومی کاهش می‌یابد [۵]. اگر فردی دز پایی از پرتو را دریافت کرده باشد، سلول‌هایی که دارای کروموزوم دی‌سانتريک هستند با نیمه‌عمر حدود ۳ سال از گردش خون حذف می‌شوند [۱۲]. سلول‌های واجد آسیب‌های ناپایدار، در صورت ورود به میتوز اغلب از بین می‌روند و بنابراین، با گذشت زمان میزان ناپایداری کروموزومی کاهش می‌یابد. برخلاف روش سنجش دی‌سانتريک، میزان زمینه آسیب‌های ناپایدار کروموزومی

وابسته به سن می‌باشد. بنابراین لازم است که سن فرد را در دزسنجی زیستی گذشته‌نگر با استفاده از روش هیبریدی فلورسانس لحاظ کرد [۷]. نشان داده شده است که بین جابه‌جایی‌های پایدار کروموزومی و سن فرد ارتباط واضحی وجود دارد [۱۳-۱۶]. البته حتی پس از تصحیح فاکتور سن، بازهم گوناگونی میزان آسیب‌های پایدار کروموزومی بین افراد پرتو نخورده وجود خواهد داشت [۱۷-۱۹].

برخلاف داده‌های متناقض منتشرشده راجع به اثر کشیدن سیگار، نظر تعدادی از محققین بر این است که سیگار کشیدن باعث افزایش جابه‌جایی‌های پایدار نمی‌شود [۱۲ و ۲۰]. عده دیگری از محققین اعتقاد دارند که اهمیت همسان‌سازی از نظر مصرف سیگار، تقریباً به اندازه همسان‌سازی از نظر سن فرد می‌باشد [۲۱]. توصیه می‌شود که هر آزمایشگاه دزسنجی زیستی، اطلاعات مربوط به جابه‌جایی‌ها را در جمعیت کنترل، بررسی و مشخص کند [۱۱]. در حال حاضر، توافق کلی بر این است که جابه‌جایی‌های پایدار کروموزومی باید صرفاً در سلول‌های پایدار (سلول‌های فاقد کروموزوم دی‌سانتريک و یا حلقه در گستره متافازی) شمارش شوند [۵].

<sup>1</sup> Complex

- [1] United States Government US Army. Medical consequences of radiological and nuclear weapons, (2013).
- [۲] حسینی پویا، سید مهدی. کتاب مبانی دزسنجی در پرتوگیری خارجی. انتشارات پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای (۱۳۹۴).
- [۳] مزدارانی، حسین. کتاب دزیمتری بیولوژیکی. انتشارات طب نوین (۱۳۸۲).
- [4] ISO 19238. Radiation protection: Performance criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics (2014).
- [5] IAEA. Cytogenetic Dosimetry: Application in preparedness for and response to Radiation Emergencies. Emergency Preparedness and Response Series (2011).
- [6] M.L. Camparoto, A.T. Ramalho, A.T. Natarajan, M.P. Curado and E.T. Sakamoto-Hojo. Translocation analysis by the FISH-painting method for retrospective dose reconstruction in individuals exposed to ionizing radiation 10 years after exposure. *Mutat Res.* 530(1-2) (2003) 1–7.
- [7] Q.J. Liu, X. Lu and X.T. Zhao. Assessment of retrospective dose estimation, with fluorescence in situ hybridization (FISH), of six victims previously exposed to accidental ionizing radiation. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 759 (2014) 1–8.
- [8] L. Stronati, M. Durante, G. Gensabella, G. Gialanella, G.F. Gross, M. Pugliese, P. Scampoli, A. Sgura, A. Testa and C. Tanzarella. Calibration curves for biological dosimetry by fluorescence in situ hybridisation. *Radiat Prot Dosimetry.* 94(4) (2001) 335–345.
- [9] J.F. Barquinero, S. Cigarrán, M.R. Caballín, H. Braselmann, M. Ribas, J. Egozcue and L. Barrios. Comparison of X-ray dose-response curves obtained by chromosome painting using conventional and PAINT nomenclatures. *Int J Radiat Biol.* 75(12) (1999) 1557–1566.
- [10] A.V. Sevan'kaev, I.K. Khvostunov, G.F. Mikhailova, E.V. Golub, O.I. Potetnya, N.N. Shepel, V.Y. Nugis and N.M. Nadejina. Novel data set for retrospective biodosimetry using both conventional and FISH chromosome analysis after high accidental overexposure. *Appl Radiat Isot.* 52(5) (2000) 1149–1152.
- [11] J.F. Barquinero, C. Beinke and M. Borràs. RENEB biodosimetry intercomparison analyzing translocations by FISH. *Int J Radiat Biol.* 93(1) (2017) 30–35.
- [12] A.A. Edwards, M. Szuilinska and D.C. Lloyd. Reconstruction of doses from ionizing radiation using fluorescence in situ hybridization techniques. *Br J Radiol.* 80(1) (2007) S63–67.
- [13] E. Grégoire, L. Roy, V. Buard and M. Delbos. Twenty years of FISH-based translocation analysis for retrospective ionizing radiation biodosimetry. *Int J Radiat Biol.* 94(3) (2018) 248–258.
- [14] M.J. Ramsey, D.H. Moore, J.F. Briner, D.A. Lee, L. Olsen, J.R. Senft and J.D. Tucker. The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting. *Mutat Res.* 338(1-6) (1995) 95–106.
- [15] I. Sorokine-Durm, C. Whitehouse and A.A. Edwards. The variability of translocation yields amongst control populations. *Radiat Prot Dosimetry* 88(1) (2000) 93–99.
- [16] J.N. Lucas and W. Deng. Our views on issues in radiation biodosimetry based on chromosome aberrations measured by FISH. *Radiat Prot Dosimetry.* 88(1) (2000) 77–86.
- [17] Y. Suto, M. Akiyama, T. Noda and M. Hirai. Construction of a cytogenetic dose-response curve for low-dose range gamma-irradiation in human peripheral blood lymphocytes using three-color FISH. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 794 (2015) 32–38.
- [18] C.A. Whitehouse, A.A. Edwards, E.J. Tawn, G. Stephan, U. Oestreicher and JE Moquet. Translocation yields in peripheral blood lymphocytes from control populations. *Int J Radiat Biol.* 81(2) (2005) 139–145.
- [19] Tucker JD. Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: a review of the major considerations for human biological dosimetry. *Mutat Res.* 659(3) (2008) 211–220.
- [20] P.C. Van Diemen, D. Maasdam, S. Vermeulen, F. Darroudi and A.T. Natarajan. Influence of smoking habits on the frequencies of structural and numerical chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique. *Mutagenesis.* 10(6) (1995) 487–495.
- [21] J.D. Tucker and D.H. Moore. The importance of age and smoking in evaluating adverse cytogenetic effects of exposure to environmental agents. *Environ Health Perspect.* 104(Suppl 3) (1996) 489–492.

