

УДК: 577.112.82:616.4-008.8:616-001.28

Д. А. Бази́ка, К. Д. Музалевська✉, О. Л. Мазниченко, О. А. Беляєв

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, вул. Мельникова 53, м. Київ, 04050, Україна

ЕКСПРЕСІЯ ГІСТОНУ γ -H2AX У ЛІМФОЦИТАХ ПЕРСОНАЛУ ОБ’ЄКТУ “УКРИТТЯ” ЧАЕС ПРИ ОПРОМІНЕННІ В ПРОФЕСІЙНИХ ЛІМІТАХ

Мета. Порівняти вплив різних доз радіоактивного випромінювання в різний період часу після його дії на утворення γ -H2AX гістонів у учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС та у людей, які виконують роботи в зоні високого радіаційного ризику.

Матеріали та методи. Експресію гістону γ -H2AX у лімфоцитах периферичної крові 68 пацієнтів, 33 особи, які працюють на проекті “Укриття”, після радіаційного опромінення в професійних лімітах та 35 ліквідаторів, опромінених 24–27 років тому, досліджували за допомогою методу проточної цитофлуориметрії.

Результати. Експресія γ -H2AX гістону у персоналу об’єкту “Укриття”, після виходу з зони робіт, була вищою ($0,70 \pm 0,93$) ($M \pm SD$), ніж у ліквідаторів наслідків аварії ($0,51 \pm 0,27$) ($M \pm SD$), $p < 0,001$. Порівнявши між собою групи опромінених осіб-ліквідаторів розділених на групи в залежності від отриманих доз (150–250 мЗв, $n = 20$ та 250–1000 мЗв, $n = 16$), були знайдені кореляційні зв’язки між дозою опромінення та кількістю γ -H2AX гістонів. Кількість γ -H2AX позитивних клітин була більшою в групах людей, які отримали більші дози ($0,49 \pm 0,05$ та $0,55 \pm 0,08$, ($M \pm SD$ відповідно, $p < 0,01$)).

Висновки. Наше дослідження показує можливість визначення γ -H2AX гістонів в якості маркера клітинної радіочутливості та можливості діагностики ранніх наслідків опромінення в малих дозах у людини.

Ключові слова. Іонізуюче випромінювання, γ -H2AX гістон, радіація, лімфоцити, Чорнобиль.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2014. Вип. 19. С. 186–191.

D. A. Bazyka, K. D. Muzalevska✉, O. L. Maznichenko, O. A. Belyaev

State Institution “National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

Expression of γ -H2AX histone in lymphocytes of the Chernobyl “Shelter” object staff exposed to ionizing radiation in occupational limits

Objective. To compare the effect of radiation dose and time after exposure on formation of γ -H2AX histone in Chernobyl clean-up workers and personnel who perform work activities at the zone of high radiation risks.

Materials and Methods. The expression of γ -H2AX histone in peripheral blood lymphocytes of 68 patients, including 33 “Shelter” workers after recent radiation exposure in professional limits and comparison group of 35 Chernobyl clean-up workers exposed 24–27 years before, the study by flow cytometry.

✉ Музалевська Катерина Дмитрівна, e-mail: myzik89@yandex.ru

Results. An increase of the expression of γ -H2AX histone in lymphocytes was revealed in "Shelter" staff after leaving the area of work ($0,70 \pm 0,93$) ($M \pm SD$), comparing with Chernobyl clean-up workers ($0,51 \pm 0,27$) ($M \pm SD$), $p < 0,001$. Analysis subgroups of clean-up workers divided by doses (100–250 mSv, $n = 20$ and 250–1000 mSv, $n = 16$) we found connection between radiation dose and the percentage of γ -H2AX positive cells. The number of γ -H2AX positive cells was higher in a subgroup with higher doses ($0,49 \pm 0,05$ and $0,55 \pm 0,08$, ($M \pm SD$, respectively, $p < 0.01$)).

Conclusions. Our study suggests the possibility of determining γ -H2AX histone as a marker of cellular radiosensitivity and possibility to use it as a diagnostic tool of a recent radiation exposure at low doses in humans.

Key words. Ionizing radiation, γ -H2AX histone, radiation, lymphocyte, Chernobyl.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2014;19:186-191.

Радіологічні наслідки Чорнобиля протягом багатьох років, що минули, є предметом постійної уваги. Кризовий стан екології в Україні, який погіршився після аварії на ЧАЕС, сприяв зростанню частоти різних клітинних порушень, починаючи з імунопатологічних станів серед населення, а особливо у ліквідаторів, які становлять одну з найчисельніших груп опромінених постраждалих [1]. Для запобігання поширення радіації, в 1986 році було зведено безпечне укриття над четвертим реактором, над новою безпечною спорудою виконуються роботи і сьогодні. Запроваджено спеціальну медичну та біофізичну систему контролю персоналу, результати даних яких не показують шкідливого ефекту від робіт. Були встановлені спеціальні умови роботи на території високого радіаційного ризику, включаючи ЧАЕС та роботи в безпосередній близькості до об'єкту "Укриття". Ці умови включають підвищений зовнішній радіаційний рівень, можливо через поглинання трансуранових елементів, висока температура і інші небезпечні фактори. Встановлений щорічний ліміт отриманих доз знаходиться в межах від 20 мЗв для більшості робіт, та до 50 мЗв, для спеціальних робіт [2].

Як відомо, вплив радіації в першу чергу шкідливо впливає на генетичний матеріал клітини. Репарація ДНК є фундаментальним клітинним процесом, що забезпечує стабільність геному. Вважається, що двониткові розриви ДНК є найбільш небезпечними для клітин, оскільки вони можуть призвести до її загибелі. В організмі людини та інших еукаріот ДНК обгорнута навколо групи гістонів, що складається з ко-ру гістонів H2A, H2B, H3 та H4. H2AX є членом родини H2A гістонів з молекулярною масою 14 кДа. Одним з ранніх етапів відповіді клітини на двониткові розриви ДНК після дії іонізуючого випромінювання є фосфорилування гістона H2AX по серину 139, яке відбувається в доменах хроматину навколо двониткового розриву. Така фосфорильована форма H2AX має назву γ -H2AX. Спочатку γ -H2AX осередки є маленькими, стають видимі вже на протязі 1–3

For many years the radiological consequences of Chernobyl are the subject of constant attention. Critical conditions of an environment in Ukraine, that have been deteriorated after the Chernobyl accident caused increase of a frequency of different cellular effects starting from immunopathological diseases among the population, especially in the clean-up workers, who represent the largest group by number of exposed and the individual radiation dose [1]. The Shelter was erected over the fourth reactor to prevent the spread of radiation in 1986 and the new safe confinement construction works are performed now. Special health and biophysical check control programs are implemented for staff and the results don't exhibit harmful effects. Special work conditions are established for a high radiation risks area, including Chernobyl NPP site area and works inside and in a close proximity to Shelter. Workplace conditions inside Shelter include elevated external radiation levels, possible transuranium elements intake, high temperature and other hazardous factors. Established annual dose limits differ from 20 mSv for majority of work tasks to 50 mSv for special tasks [2].

It is known that radiation harmfully affects on cellular genetic material. DNA reparation is a fundamental process which ensures the stability of the genome. It is believed that double-strand breaks DNA are the most dangerous for cells because it can lead to its death. In humans and other eukaryotes DNA wrapped around the histone group consists of core histones H2A, H2B, H3 and H4. H2AX is a histone of H2A family with a molecular mass of 14 kDa. One of the early stages of cell response to double-strand breaks DNA after ionizing radiation is the phosphorylation of histone H2AX on serine 139, which occurs around this breaks in chromatin domains. This phosphorylated form of H2AX is called γ -H2AX. At first, γ -H2AX foci are small and are already visible during 1–3 minutes after irradiation [3]. γ -H2AX accu-

хвилин після опромінення [3]. Скупчення γ -H2AX після опромінення можна візуалізувати в клітинах за допомогою специфічних антитіл. Час, за який відбувається скупчення γ -H2AX після дії іонізуючого випромінювання, прямо пропорційний радіаційній чутливості клітин. Це дає змогу говорити про можливість використання кількості цього гістону як маркера клітинної радіочутливості та діагностики наслідків опромінення після отримання різних доз радіації [4]. Вченими з Італії було запропоновано розробку нового метода проточної цитометрії для діагностики Ataxia telangiectasia, який заснований на вимірюванні фосфорилування γ -H2AX гістона. Ataxia telangiectasia – це прогресуюче нейродегенеративне захворювання, яке починається з раннього дитинства та викликається мутаціями в ATM-гені (Ataxia telangiectasia mutated gene). Більшість тестів не є достатньо специфічними, займають багато часу чи потребують велику кількість зразків крові. А метод проточної цитометрії є дуже чутливим, специфічним, швидким та вимагає лише 2 мл периферичної крові і тому може бути застосований для ранньої діагностики Ataxia telangiectasia за допомогою визначення змін рівня γ -H2AX гістона [5]. Проведення досліджень методом імунофлуорисценції щодо впливу I-131 терапії на ДНК розриви в лімфоцитах периферичної крові встановили, що дана терапія викликає велику кількість двониткових розривів нуклеїнової кислоти [6]. Вчені з Німеччини запропонували визначати дози променевої терапії пухлин для різних ділянок тіла за допомогою аналізу γ -H2AX. Висока чутливість до радіаційних доз цього гістона дозволяє контролювати ефективність препарату на різних стадіях його введення [7]. Результати наукових досліджень свідчать, що за різних доз випромінювання змінюється і кількість γ -H2AX [8]. Метод проточної цитометрії є дуже чутливим, специфічним та швидким, вимагає невеликої кількості периферичної крові. Метою нашої роботи було виявити зв'язок між утворенням γ -H2AX гістонів та радіаційними дозами у ліквідаторів аварії та людей, які в даний час працюють на об'єкті “Укриття”.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом досліджень були лімфоцити периферичної крові двох груп людей. До першої групи належало 35 учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС (УЛНА) з 1986–1988 рр., які зазнали впливу іонізуючого випромінювання з діапазонами доз від 200 до 1000 мЗв. Пацієнти були вибрані з клініко-епідеміологічного реєстру Національного наукового центру радіаційної медицини. До другої групи відно-

mulation in cell can be visualized using specific antibodies. The time which γ -H2AX foci are increased is directly proportional to the radiation sensitivity of cells. That allows to speak about the possibility of using the number of histone as a marker of cellular radiosensitivity and the possibility diagnostic radiation effects after receiving various doses of radiation [4]. Scientists from Italy were proposed to develop a new method of flow cytometry for the diagnosis of Ataxia-telangiectasia, which is based on measuring the phosphorylation of histone γ -H2AX. Ataxia telangiectasia – is a progressive neurodegenerative disease that begins in early childhood and it is caused by mutations in the ATM gene (Ataxia telangiectasia mutated gene). Most of tests are not specific enough, need to much time or require a large number of blood samples. A method of flow cytometry is a very sensitive, specific, rapid and requires only 2 ml of peripheral blood and can therefore be used for regulation early diagnostic of Ataxia telangiectasia by determining changes in the γ -H2AX histones [5]. Research the impact of I-131 therapy on DNA breaks in peripheral blood lymphocytes by the method of flow cytometry was found that this therapy caused a large number of double-strand breaks of nucleic acid [6]. Scientists from Germany have proposed to determine the dose of tumors radiotherapy of different parts of the body using γ -H2AX analysis. Histones high sensitivity to radiation doses allows monitor the effective of application drugs at different stages of its introduction [7]. Results of scientist research indicate that the different doses of radiation on cells changes and the number of γ -H2AX [8]. The flow cytometry method is a very sensitive, specific and rapid, requires small quantity of peripheral blood cells. The aim of our study was to reveal connection between the effect of formation γ -H2AX histone and radiation dose in Chernobyl clean-up workers and personnel, who work on the project “Shelter”.

MATERIALS AND METHODS

The object of the research were lymphocytes in peripheral blood of two groups of individuals. The first group represented 35 Chernobyl clean-up workers exposed in 1986–1988 years in doses from 200 to 1000 mSv. Patients were selected randomly from the subjects included to the long-term follow-up at the Clinical and Epidemiological Registry of the National Research Center for Radiation

сились 33 людини, які працюють на об'єкті “Укриття” 2013–2014 рр., пройшли спеціальний медичний та біофізичний контроль після залишення радіаційної зони. Дози опромінення становили до 20 мЗв.

В процесі досліджень був використаний прямий імунофлуоресцентний тест з використанням γ -H2AX антитіл, мічених Alexa Fluor 488 (BD, США). Підготовка біоматеріалу включала: до 100 мкл периферичної крові додавали 500 мкл Perm Wash buffer (BD, США) та інкубували протягом 20 хвилин. Після видалення Perm Wash buffer шляхом центрифугування 10 хвилин 1500 об.хв, клітини відмивали з Phosphate buffer solution (PBS). Додавали 50 мкл γ -H2AX антитіл у робочому розведенні (1:10). Зразки інкубували протягом 60 хвилин у темряві при кімнатній температурі. Контролем були флуоресцентні мікросфери “Calibrite” (BD, США). Аналіз даних проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі FACScan (BD, США). Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В ході проведених досліджень було встановлено, що кількість γ -H2AX гістонів експресованих у лімфоцитах персоналу об'єкту “Укриття”, які щойно залишили зону робіт, була вищою ($0,7 \pm 0,93$, $M \pm SD$), ніж в учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС (УЛНА) ($0,51 \pm 0,27$, $M \pm SD$; $p < 0,001$) (рис.1). Період часу між закінченням опромінення та аналізом становив від 24 до 72 год. Це, можливо, можна пояснити тим, що пройшло мало часу після опромінення, структура ДНК ще не встигла стабілізуватися та усунути двониткові розриви. Однак, індивідуальні відмінності цієї групи людей набагато більші, ніж в УЛНА, про це свідчать збільшені дані відхилення від середнього. Також можна припустити, що менші дози та більш тривале опромінення призводять до більшої кількості двониткових розривів нуклеїнової кислоти. Згідно з дослідженнями інших авторів, γ -H2AX гістони можна виявити в клітині вже через 30–60 хвилин після дії іонізуючої радіації, кількість якого зменшується або зростає відповідно до проходження репарації ДНК [3]. Це доказ експресії γ -H2AX гістону у людей, а група УЛНА була опромінена більш ніж 20 років тому і може бути використана як контрольна група.

При порівнянні груп опромінених осіб – учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС, розподілених в залежності від отриманих доз (150–250 мЗв, $n = 20$ та 250–1000 мЗв, $n = 16$), були знайдені кореляційні зв'язки між дозою опромінення та кількістю γ -H2AX гістонів. Кількість γ -H2AX була більшою в групах лю-

Medicine. The second group was consisted of 33 Shelter workers of 2013–2014 who underwent a special health and biophysical control after leaving radiation zone. Doses of exposure were up to 20 mSv.

A direct immunofluorescent assay was used with cell staining with Alexa Fluor 488 and anti γ -H2AX antibody (BD, USA). The assay included the next steps: 100 mkl of peripheral blood were mixed with 500 mkl of PermWash buffer (BD, USA) and incubated for 20 minutes. After removing the PermWash solution by centrifugation 10 min at 1500 rpm cells were washed with 500 mkl of Phosphate buffer solution (PBS). The anti γ -H2AX antibody in a working concentration (1:10) was added in a quantity of 50 mkl. The samples were incubated during 60 minutes at room temperature in the dark. “Calibrite” (BD, USA) fluorescent microspheres served as a control. Data analysis was performed using FACScan flow cytometer (BD, USA). Statistical analysis was performed using Statistica 6.0.

RESULTS AND DISCUSSION

It was found that the percentage of lymphocytes expressing γ -H2AX histone number in group of workers recently leaving works at the object “Shelter” was higher ($0,7 \pm 0,93$) ($M \pm SD$), than at clean-up workers ($0,51 \pm 0,27$) ($M \pm SD$), $p < 0.001$ (Fig.1). Time period between the end of exposure and analysis varied from 24 to 72 hours. Possible explanations include short time, that has passed after irradiation and was not sufficient for stabilizing of DNA structure and elimination the double strand breaks. However individual differences in this groups of people were much higher than in clean-up workers that was illustrated by the higher standard deviation values. It could be also suggested that at lower doses and more prolonged exposure lead to increase DNA double-stranded breaks. According to the current experimental studies γ -H2AX histone can be detected in a cell during 30–60 minutes after exposure, later the expression decreases or increases respectively to undergo DNA repair [3]. There is a little evidence on H2AX expression in humans; and the groups of exposed more than 20 years ago could be referred as a control group.

Analysis subgroups of clean-up workers divided by doses (100–250 mSv, $n = 20$ and 250–1000 mSv, $n = 16$) we found connection between radiation dose and the percentage of γ -H2AX positive cells. The number of γ -H2AX was higher in a subgroup with higher doses (0.49 ± 0.05 and $0.55 \pm$

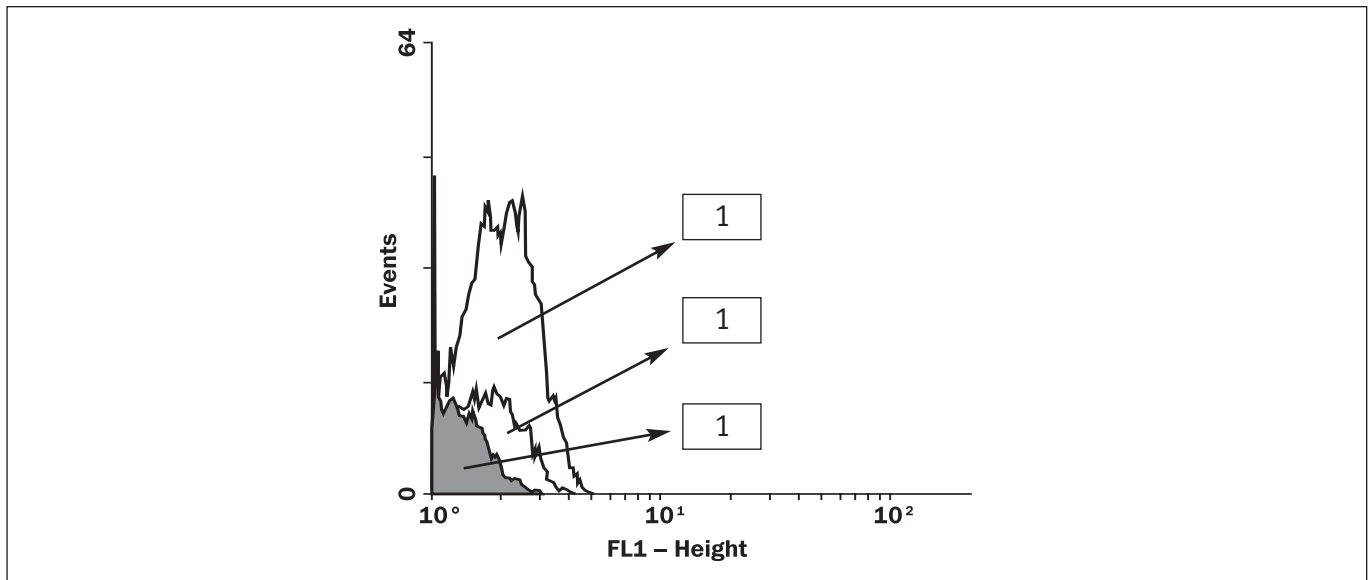


Рисунок 1. Експресія γ -H2AX гістону в лімфоцитах периферичної крові досліджених груп людей:

1 – контроль флуоресценції, 2 – учасники ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС 1986–1988 рр., 3 – особи, які працюють на проекті “Укриття”

Figure 1. γ -H2AX histone expression in peripheral blood lymphocytes:

1 – fluorescence control, 2 – the Chernobyl clean-up workers, 3 – current staff of the “Shelter” object

дей, які отримали більші дози опромінення ($0,49 \pm 0,05$ та $0,55 \pm 0,08$, $M \pm SD$, відповідно; $p < 0,01$). Ці дані повністю підтверджують результати інших авторів [4].

ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень у людей були продемонстровані докази зв'язку експресії γ -H2AX гістонів з опроміненням малими дозами радіації. Отримані дані підтверджують результати експериментальних досліджень інших авторів, які демонструють, що в клітині після дії іонізуючого випромінювання в малих дозах збільшується кількість γ -H2AX гістону [9].

Ми показали збереження підвищеного рівня γ -H2AX гістону в пізній період часу після опромінення. Плануються додаткові дослідження для отримання інформації щодо різниці експресії γ -H2AX гістону при різних дозах і у розширеній кількості досліджень. Наші групи досліджень включали співробітників з історією регулярної перевірки здоров'я, тому не було знайдено ніяких доказів щодо наявності хвороб, пов'язаних зі змінами в структурі ДНК, таких як атаксія-телеангіектазія. Звичайно, в наступних роботах, необхідним є дослідження неопромінених груп людей, а також порівняння експресії γ -H2AX гістону з іншими параметрами імунної системи.

На нашу думку, визначення γ -H2AX гістону може бути використане в якості маркера клітинної радіочутливості та діагностики ранніх наслідків опромінення у людини після отримання малих доз радіації.

0.08, ($M \pm SD$, respectively, $p < 0.01$). Our data are in accordance with the results of other authors [8].

CONCLUSIONS

As result of this study the evidence was demonstrated in humans on the connection of expression of γ -H2AX histone with radiation exposure at low dose. Our data confirm the experimental results of other authors who have demonstrated that the γ -H2AX cell concentration is increased after irradiation at low dose [9].

For the first time we have shown the preservation of the elevated γ -H2AX at a late period after exposure. Additional research is planned to get information on the differences of expression in different dose rates and at an extended number of study subjects. Our study groups included staff with a history of regular health checks, so no evidence was detected on the presence of diseases that can be associated with DNA changes, like ATM. Of course, it is necessary to study non-irradiated subjects, and to compare the γ -H2AX histone expression with other parameters of the immune system.

To our opinion, the analysis of γ -H2AX histone expression can also be used as a marker of cellular radiosensitivity and as a marker tool for diagnostics of early radiation effects in humans after receiving low doses of radiation.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дози опромінення / І.А.Ліхтарьов, Л.М.Ковган, В.В.Чумак [та ін.] // Медичні наслідки Чорнобильської катастрофи: 1986-2011: монографія / за ред. А.М.Сердюка, В.Г.Бєбєшка, Д.А.Базики. – Тернопіль : ТДМУ, Укрмедкнига, 2011. – С. 35–64.
2. Радіаційний захист і здоров'я персоналу підприємств, що виконують роботи з перетворення об'єкта Укриття ДСП ЧАЕС на екологічно безпечну систему / В.Сушко, Д.Базики, І.Ліхтарьов [та ін.] // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології.-2013. – Вип. 18. – С. 373–383.
3. Тарасова А.В. Определение репарации двуниевых разрывов ДНК в лимфоцитах крови по накоплению фосфорилированной формы гистона H2AX / А.В.Тарасова, Т.В. Шман // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2011. – Вип. 2(6). – С. 28–33.
4. Rothkamm K. Gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure / K. Rothkamm // Ann. Ist. Super. Sanita. – 2009. – Vol. 3, No. 45. – P. 265–271.
5. A rapid flow cytometry test based on histone H2AX phosphorylation for the sensitive and specific diagnosis of ataxia telangiectasia / P. Porcedda, V. Turinetto, A. Brusco [et.al.] // Cytometry A. – 2008. – Vol. 6, No. 73. – P. 508–516.
6. Sensitive immunodetection of radiotoxicity after iodine-131 therapy for thyroid cancer using γ -H2AX foci of DNA damage in lymphocytes / M. Doai, N. Watanabe, T. Takahashi [et.al.] // Ann. Nucl. Med. – 2013. – Vol.3, No.27. – P. 233–238.
7. Sak A. Use of γ H2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy/ A.Sak, M. Stuschke // Semin. Radiat. Oncol. – 2010. – Vol. 20, No. 4. – P. 223–231.
8. Changes in the number of double-strand DNA breaks in chinese hamster V79 cells exposed to γ -radiation with different dose rates// K. Kottenko, A. Bushmanov, I. V. Ozerov [et.al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol.7, No. 14. – P. 13719–13726.
9. Takashi Sugihara, Hayato Murano, Kimio Tanaka. Increased γ -H2AX intensity in response to chronic medium-dose-rate γ -ray irradiation. Plos One. – 2012. – Vol. 9, No. 7. – P. 453.

REFERENCES

1. Lihtar'ov I, Kovgan L, Chumak V, et al. [Doses of exposure]. In: Serdiuk A, Bebesko V, Bazyka D, et al., editors. [Medical consequences of the Chornobyl accident: 1986-2011]. Ternopil: TDMU; 2011. p. 35-64. Ukrainian.
2. Sushko VA, Bazyka DA, Likhtarev IA, Lyashenko LA, Berkovskiy VB, Loganovskiy KN, et al. Radiation protection and health of personnel of contracting enterprises participating in works for transformation of the object "Shelter" of SSE Chornobyl NPP into an ecologically safe system. Probl Radiac Med Radiobiol. 2013;18:373-83.
3. Tarasova A, Shman T. [DNA double-strand breaks repair detection in lymphocytes based on histone H2AX phosphorylation]. Mediko-biologicheskie problemy zhyzneideiatel'nosti. 2011; 2(6):28-33. Russian.
4. Rothkamm K. Gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. Ann Ist Super Sanita. 2009;3(45):265-71.
5. Porcedda P, Turinetto V, Brusco A, Cavalieri S, Lantelme E, Orlando L, et al. A rapid flow cytometry test based on histone H2AX phosphorylation for the sensitive and specific diagnosis of ataxia telangiectasia. Cytometry A. 2008 Jun;73(6):508-16.
6. Doai M, Watanabe N, Takahashi T, Taniguchi M, Tonami H, Iwabuchi K, et al. Sensitive immunodetection of radiotoxicity after iodine-131 therapy for thyroid cancer using γ -H2AX foci of DNA damage in lymphocytes. Ann Nucl Med. 2013 Apr;27(3):233-8.
7. Sak A, Stuschke M. Use of γ H2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. Semin Radiat Oncol. 2010 Oct;20(4):223-31.
8. Kottenko KV, Bushmanov AY, Ozerov IV, Guryev DV, Anchishkina NA, Smetanina NM, et al. Changes in the number of double-strand DNA breaks in Chinese hamster V79 cells exposed to γ -radiation with different dose rates. Int J Mol Sci. 2013 Jul 1;14(7):13719-26.
9. Takashi Sugihara, Hayato Murano, Kimio Tanaka. Increased γ -H2AX intensity in response to chronic medium-dose-rate γ -ray irradiation. Plos One. 2012 Sep; 9(7):453.

Стаття надійшла до редакції 19.06.2014

Received: 19.06.2014