Nghiên cứu động học γH2AX foci sau chiếu xạ tia X ở tế bào lympho máu ngoại vi và nguyên bào sợi người

Phạm Ngọc Duy*, Trần Thanh Mai

Viện Nghiên cứu Hạt nhân

Ngày nhận bài 1/10/2021; ngày chuyển phản biện 5/10/2021; ngày nhận phản biện 10/11/2021; ngày chấp nhận đăng 16/11/2021

Tóm tắt:

Kỹ thuật định lượng các γH2AX foci được sử dụng để nghiên cứu tổn thương chuỗi đôi DNA (DSB) ở tế bào do tác động của bức xạ ion hóa. Tế bào lympho máu ngoại vi và nguyên bào sợi người được chiếu xạ tia X liều 2 Gy. Số lượng các γH2AX foci trong tế bào được phân tích bằng phương pháp định lượng miễn dịch huỳnh quang dùng các kháng thể đặc hiệu. Đánh giá ở các thời điểm sau khi tế bào được chiếu xạ trong khoảng 0-5 giờ để xác định động học các γH2AX foci ở tế bào. Kết quả chỉ ra tế bào lympho đạt lượng γH2AX foci cao nhất ở thời điểm 1 giờ, còn nguyên bào sợi là ở thời điểm 45 phút sau chiếu xạ. Điều này cho thấy bức xạ gây tổn thương DNA và khả năng sửa chữa của 2 loại tế bào này là khác nhau. Các nghiên cứu tổn thương DSB *in vitro* ở các loại tế bào này bằng kỹ thuật định lượng γH2AX foci cần được thực hiện ở các thời điểm như trên để đảm bảo tính ổn định của các γH2AX foci được sinh ra tại vị trí các DSB.

Từ khóa: **nguyên bào sợi, tế bào lympho, tổn thương chuỗi đôi DNA, γH2AX foci.**

Chỉ số phân loại: **2.6**

Đặt vấn đề

Bức xạ ion hóa có thể gây ra nhiều dạng tổn thương phân tử DNA. Nhiều phản ứng sinh hóa được kích hoạt để tế bào đáp ứng với các tổn thương này. Protein γH2AX xuất hiện sớm hơn các protein đáp ứng với tổn thương khác khi có các DSB. Chúng có thể xuất hiện chỉ vài giây sau khi chiếu xạ. Histone H2AX của histone H2A có mặt trong thể nhân (chiếm 2-25% tổng số H2A) và có liên quan đến quá trình sửa chữa DSB. Khi H2AX được phosphoryl hóa ở serine 139 bởi các protein kinase PIKKs sẽ tạo nên dạng γH2AX [1, 2]. γH2AX hoạt động để kích hoạt các protein sửa chữa DNA khác như BRCA1, 53BP1, MDC1 và Rad51. Sự hoạt hóa ATM và MDC1 có vai trò trong điều hòa quá trình phosphoryl hóa của H2AX dọc theo các sợi DNA bị đứt [3]. Mỗi γH2AX foci do bức xạ gây ra đại diện cho một DSB duy nhất trong các tế bào ở pha G1 [4, 5]. Lúc đầu, các γH2AX foci có kích thước nhỏ, tách biệt tại vị trí của DSB và có thể nhìn thấy ngay sau khi chiếu xạ trong khoảng 1-3 phút. Theo thời gian, các γH2AX foci này phát triển và lan rộng dọc theo chất nhiễm sắc, càng xa vị trí DSB và đạt đến ổn định sau 10-30 phút [1, 5]. Số lượng γH2AX foci có tương quan chặt chẽ với liều bức xạ. Trong thời gian đầu sau chiếu xạ, số lượng γH2AX foci tương ứng với số DSB. Sau đó số lượng này giảm xuống do quá trình sửa chữa tổn thương DNA diễn ra. L.T. Kuo và L.X. Yang (2008) [6] đã chứng minh rằng, tỷ lệ các γH2AX foci so với các DSB là 1:1 nên chúng có thể là chỉ điểm sinh học (biomarker) cho tổn thương DNA. Phân tích các tổn thương DNA thông qua định lượng số γH2AX foci bằng cách sử dụng các kháng thể kháng γH2AX và kháng thể thứ cấp đánh dấu huỳnh quang. Trong kỹ thuật này, các tế bào được cố định lên lam kính, sau đó chúng được lai hóa mô miễn dịch huỳnh quang với kháng thể kháng γH2AX, các điểm huỳnh quang được phân tích bằng kính hiển vi huỳnh quang, flow cytometry hoặc western blot [7-9]. Kỹ thuật phân tích này rất nhạy, có thể đánh giá được tổn thương DSB khi chiếu với liều rất thấp (có thể ở mức 1 mGy) [10]. Nguyên bào sợi và tế bào lympho máu ngoại vi người là các loại tế bào được chọn phổ biến để nghiên cứu hiệu ứng tác động *in vitro* của bức xạ ion hóa vì nguyên bào sợi là lớp tế bào chịu tác động đầu tiên của bức xạ ion hóa, còn tế bào lympho đa số tồn tại ở pha G0 trong hệ thống máu ngoại vi, luân chuyển khắp cơ thể và đã được chứng minh hiệu ứng là tương đương nhau khi chiếu xạ *in vitro* và *in vivo* [11, 12]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá mức độ gây tổn thương DNA của bức xạ tia X và khả năng phục hồi tổn thương của tế bào lympho và nguyên bào sợi người. Qua đó cho thấy động học biến đổi số lượng γH2AX foci ở tế bào tại các thời điểm sau khi chiếu xạ *in vitro* và xác định thời điểm đạt γH2AX foci cao nhất. Từ đó lựa chọn thời điểm sau chiếu xạ thích hợp để thực hiện các nghiên cứu γH2AX.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Mẫu máu ngoại vi từ 3 người bình thường (2 nam, 1 nữ); nguyên bào sợi người từ Phòng Thí nghiệm kỹ nghệ mô và vật liệu y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.

*Tác giả liên hệ: Email: phamngocduynri@gmail.com

Study on the kinetic of γH2AX foci in human peripheral blood lymphocyte and fibroblast cells exposed to X-Ray irradiation

Ngoc Duy Pham*, Thanh Mai Tran

Dalat Nuclear Research Institute

Received 1 October 2021; accepted 16 November 2021

Abstract:

The technique for quantification of γH2AX foci was used for studying the DNA double-strand break (DSB) of the cells exposed to ionising radiation. Peripheral blood lymphocyte and human fibroblast cells were exposed to X-ray irradiation at a dose of 2 Gy. The number of H2AX foci in cells was scored by immunofluorescence quantification using specific antibodies. An evaluation was conducted at time points after irradiation between 0 and 5 hours to determine the kinetics of H2AX foci in cells. The results showed that lymphocytes reached the highest number of γH2AX foci at 1 hour and fibroblasts at 45 minutes after irradiation. This indicated that radiation damages DNA and the repair ability of these two cell types were different. The *in vitro* studies of DSB of these cell types using the γH2AX assay should be performed at the above time points to ensure the stability of the γH2AX foci generated at the DSB sites.

Keywords: **DNA double-strand break, fibroblast, lymphocyte, γH2AX foci.**

Classification number: **2.6**

Phương pháp nghiên cứu

- Tách tế bào lympho từ máu toàn phần (theo hướng dẫn của nhà sản xuất Ficoll-Paque PLUS 1077): pha loãng tỷ lệ 1:1 (v/v) máu toàn phần trong RPMI-1640 (Sigma Aldrich) có 10% huyết thanh, nhẹ nhàng chuyển vào tạo thành lớp trên trong ống ly tâm có chứa Ficoll-Paque PLUS 1077 (GE), ly tâm 2000 vòng/phút trong 30 phút, thu lấy lớp tế bào trắng đục là lớp tế bào đơn nhân chứa phần lớn tế bào lympho, rửa tế bào bằng PBS, pH=7,2. Cố định $2x10^5$ tế bào/ml lên lamen 22x22 mm.

- Nuôi cấy nguyên bào sợi người: nuôi cấy nguyên bào sợi trong đĩa petri Ø 35 mm có đặt lamen 22x22 mm. Nuôi cấy 10^5 tế bào/đĩa trong môi trường DMEM (Sigma Aldrich) có 10% huyết thanh, kháng sinh. Ủ tế bào ở 37°C trong 5% CO_2 trong thời gian 48 giờ. Thay môi trường DMEM có 0,1% huyết thanh, tiếp tục ủ tế bào ở điều kiện như trên.

- Phương pháp chiếu xạ *in vitro*: chiếu xạ *in vitro* bằng nguồn phát tia X (Rigaku, Radioflex-200EGM, dải cao thế đỉnh HV=70-200 kVp) ở nhiệt độ phòng, liều 0 và 2,0 Gy tại vị trí có suất liều khoảng 0,5 Gy/phút. Sau chiếu xạ, ủ tế bào ở 37°C và 5% CO_2 trong các khoảng thời gian 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2 và 5 giờ. Ủ tế bào ngay vào đá lạnh sau các mốc thời gian nêu trên để ức chế sự thay đổi γH2AX. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

- Nhuộm huỳnh quang γH2AX: cố định tế bào bằng 4% formaldehyde trong 10 phút ở nhiệt độ phòng; xử lý 0,5% Triton-X100/PBS, ủ trong đá 5 phút; blocking bằng 1 ml 1% huyết thanh/PBS trong 30 phút ở nhiệt độ phòng; ủ với kháng thể kháng H2AX (Ser139) JBW301 (Millipore) ở 37°C trong 60 phút, rửa 3 lần bằng PBS; sau đó ủ với kháng thể thứ cấp CF488A (Sigma Aldrich) ở 37°C trong 30 phút, rửa 3 lần bằng PBS; đậy lamen có DAPI; quan sát và chụp ảnh huỳnh quang với phin lọc DAPI (bước sóng kích thích 461 nm và bước sóng phát 359 nm) và phin lọc FITC (bước sóng kích thích 525 nm và bước sóng phát 490 nm).

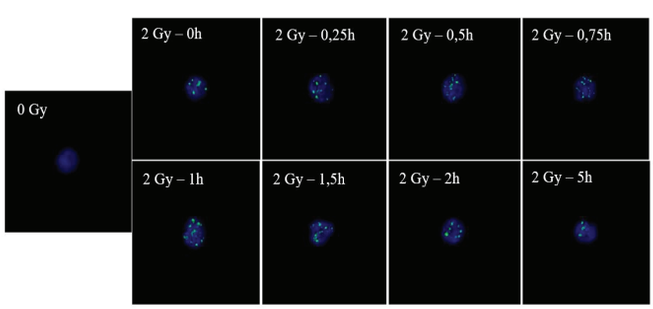
- Phân tích tiêu bản hiển vi: sử dụng kính hiển vi huỳnh quang AXIO Imager Z2 kết hợp phần mềm Metafer 4.0 và Metacyte (Metasystem) để tự động quét, chụp ảnh và đếm số lượng γH2AX foci.

- Phương pháp xử lý số liệu: sử dụng phần mềm Excel để phân tích thống kê và vẽ đồ thị.

Kết quả

Động học các γH2AX foci ở tế bào lympho người được chiếu xạ tia X in vitro

Bức xạ ion hóa gây ra các DSB và các γH2AX foci xuất hiện gần như tức thời sau khi tế bào được chiếu xạ. Hệ thống phân tích tự động Metacyte (Metasystem) cho phép phân tích nhanh số lượng các γH2AX foci được nhuộm miễn dịch huỳnh quang màu xanh lá. Hình 1 thể hiện các γH2AX foci ở tế bào lympho máu ngoại vi người ở các thời điểm từ 0 đến 5 giờ sau khi được chiếu xạ tia X liều 2 Gy.



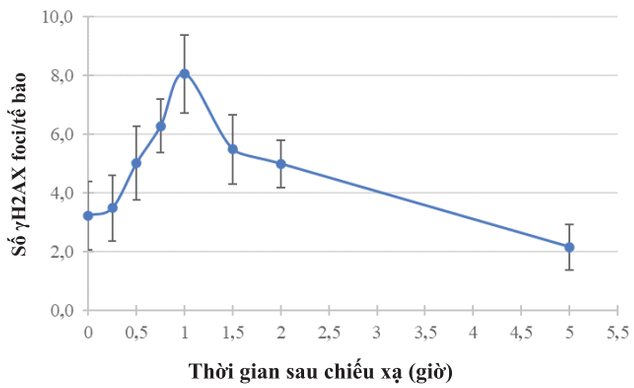
Hình 1. Các γH2AX foci ở tế bào lympho máu ngoại vi người tại các thời điểm từ 0 đến 5 giờ sau khi được chiếu xạ tia X liều 2 Gy (độ phóng đại ×1000).

Tỷ lệ các γH2AX foci ở tế bào lympho thay đổi theo thời gian sau chiếu xạ, số liệu được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ γH2AX foci ở tế bào lympho sau chiếu xạ tia X.

	0 Gy	Thời gian sau chiếu xạ liều 2 Gy (giờ)							
		0	*0,25*	*0,5*	*0,75*	*1*	*1,5*	*2*	*5*
Trung bình foci/tế bào	0,04	3,23	3,49	5,02	6,28	8,05	5,48	4,99	2,16
SD	0,02	1,16	1,12	1,26	0,90	1,33	1,18	0,81	0,77

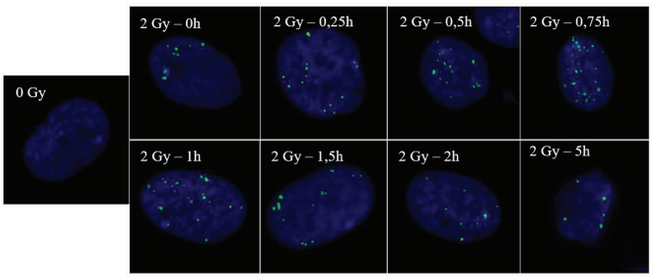
Các γH2AX foci xuất hiện gần như ngay sau khi chiếu xạ với trung bình 3,23±1,16 foci/tế bào (n=3). Tỷ lệ trung bình các foci tăng dần và đạt cao nhất ở thời điểm 1 giờ sau chiếu xạ, trung bình 8,05±1,33 foci/tế bào (n=3). Sau đó chúng giảm dần cho đến thời điểm 5 giờ và có xu hướng giảm thêm. Hình 2 biểu diễn động học các γH2AX foci ở tế bào lympho người tại các thời điểm từ 0 đến 5 giờ sau khi chiếu xạ tia X liều 2,0 Gy.



Hình 2. Động học sự tạo thành các γH2AX foci ở tế bào lympho người.

Động học các γH2AX foci ở nguyên bào sợi người được chiếu xạ tia X in vitro

Sử dụng cùng loại kháng thể đánh dấu huỳnh quang màu xanh lá để xác định các DSB ở nguyên bào sợi người sau chiếu xạ tia X. kết quả hình 3 cho thấy, các γH2AX foci hình thành ở nguyên bào sợi người sau chiếu xạ từ 0 đến 5 giờ.



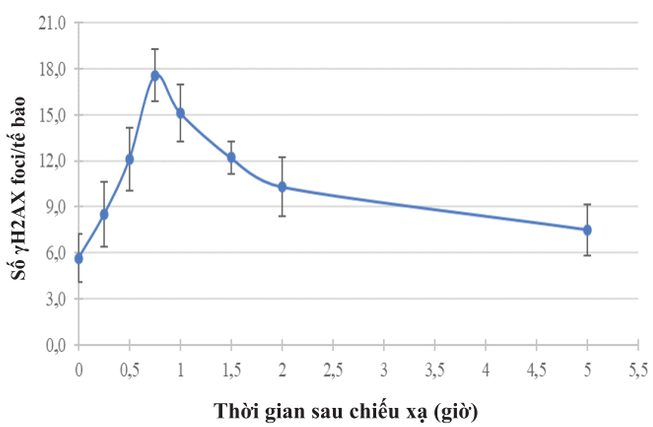
Hình 3. Các γH2AX foci ở nguyên bào sợi người tại các thời điểm từ 0 đến 5 giờ sau khi được chiếu xạ tia X liều 2 Gy (độ phóng đại ×1000).

Tỷ lệ các γH2AX foci ở nguyên bào sợi người theo thời gian sau chiếu xạ được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Tỷ lệ γH2AX foci ở nguyên bào sợi người sau chiếu xạ tia X liều 2 Gy.

	0 Gy	Thời gian sau chiếu xạ liền 2 Gy (giờ)							
		0	*0,25*	*0,5*	*0,75*	*1*	*1,5*	*2*	*5*
Trung bình foci/tế bào	0,06	5,67	8,50	12,10	17,54	15,13	12,20	10,30	7,52
SD	0,02	1,55	2,11	2,05	1,70	1,85	1,07	1,92	1,66

Tương tự như ở tế bào lympho, các γH2AX foci ở nguyên bào sợi cũng xuất hiện ngay sau khi chiếu xạ với tỷ lệ trung bình 5,67±1,55 foci/tế bào (n=3). Tỷ lệ các γH2AX foci tăng dần và đạt cao nhất sau thời gian chiếu xạ khoảng 45 phút với tỷ lệ trung bình 17,54±1,70 foci/tế bào (n=3), sau đó tỷ lệ này càng giảm theo thời gian và sau 5 giờ thì tỷ lệ này giảm về gần bằng ở thời điểm ngay sau chiếu xạ. Hình 4 biểu diễn động học các γH2AX foci ở nguyên bào sợi người sau chiếu xạ tia X liều 2 Gy tại các thời điểm từ 0 đến 5 giờ.



Hình 4. Động học sự tạo thành các γH2AX foci ở nguyên bào sợi người.

Bàn luận

Năng lượng trực tiếp của các tia bức xạ tạo ra các tổn thương trên một vùng nhỏ của DNA. DSB là tổn thương nghiêm trọng nhất gây ra bởi bức xạ ion hóa, là những đứt gãy ở cả 2 sợi đơn DNA. Khi có DSB, các protein H2AX được tổng hợp trước tiên và được phosphoryl hóa thành các dạng γH2AX tập trung xung quanh các DSB, tạo nên các γH2AX foci và số lượng các điểm này sẽ tương ứng với số lượng DSB trên DNA. Một DSB đơn lẻ dẫn đến quá trình phosphoryl hóa hàng nghìn protein H2AX trên các vùng nhiễm sắc ở 2 phía của điểm đứt gãy DNA. Các γH2AX foci có kích thước ban đầu trung bình là 0,2 μm^2 cho thấy quá trình phosphoryl hóa nhanh chóng của hàng nghìn phân tử

γH2AX trong vùng khoảng 2 Mbp [13]. Nhờ kích thước đó mà kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang có thể dễ dàng được dùng để đánh giá mức độ tổn thương DSB của tế bào.

Tỷ lệ các γH2AX foci trung bình ở tế bào lympho máu ngoại vi và nguyên bào sợi người khi chiếu xạ liều 2 Gy nguồn phát tia X đạt cao nhất ở các thời điểm tương ứng là 60 và 45 phút sau chiếu xạ. Sandrine Roch Lefevre và cs (2010) [14], Maria Moroni và cs (2013) [15], Rajesh Kumar Chaurasia và cs (2021) [16] cũng đã chỉ ra thời điểm lượng γH2AX ở tế bào lympho và nguyên bào sợi đạt cao nhất là 30-60 phút sau chiếu xạ. Ban đầu, khi xảy ra các DSB thì có sự phosphoryl hóa các protein H2AX, quá trình này càng diễn ra mạnh hơn để thực hiện các con đường sửa chữa tổn thương của tế bào và đạt cực đại ở một thời điểm sau chiếu xạ. Sau đó, khi tế bào dần hoàn thành quá trình sửa chữa tổn thương DSB, các protein tham gia sửa chữa cũng thoái hóa dần nên số lượng γH2AX foci cũng giảm theo thời gian. Kết quả nghiên cứu đã xác định được thời điểm thích hợp để phân tích γH2AX ở tế bào lympho máu ngoại vi là vào khoảng 60 phút và ở nguyên bào sợi người là 45 phút sau khi chiếu xạ *in vitro*, khi mà hầu hết các γH2AX foci vẫn còn tồn tại, đạt đến kích thước và cường độ cho phép ghi nhận đáng tin cậy. Nghiên cứu này sử dụng liều 2 Gy của nguồn bức xạ tia X và khảo sát tín hiệu huỳnh quang ở các thời điểm từ 0 đến 5 giờ sau chiếu xạ cho thấy, tỷ lệ các γH2AX foci trung bình của tế bào lympho máu ngoại vi là thấp hơn ở nguyên bào sợi người. Đồng thời, số lượng γH2AX foci tại các thời điểm ở tế bào lympho tăng chậm hơn nhưng lại giảm nhanh hơn ở nguyên bào sợi người. Điều này cho thấy khả năng gây tổn thương DSB và khả năng sửa chữa tổn thương DSB do bức xạ ion hóa của 2 loại tế bào này là khác nhau.

Việc lựa chọn các loại tế bào bình thường này cho các nghiên cứu *in vitro* là rất phù hợp vì khi chúng ở pha nghỉ và không chiếu xạ thì số γH2AX foci trung bình là rất thấp trên mỗi tế bào (dưới 0,1). Đồng thời, độ biến động giữa những người khác nhau hoặc các tế bào khác nhau cũng không khác biệt đáng kể [10]. Ngoài đánh giá ở các loại tế bào bình thường nêu trên, việc sử dụng chỉ điểm γH2AX trong điều trị ung thư hiện đang được nghiên cứu. γH2AX foci là một biomarker rất tốt để tiên lượng hiệu quả xạ trị [6]. Sự biến đổi số lượng γH2AX foci có thể được sử dụng để xác định độ nhạy cảm phóng xạ của tế bào hoặc khả năng phục hồi sau tổn thương của chúng và hiệu quả của quá trình sửa chữa tổn thương tế bào. Tỷ lệ tế bào khối u vẫn còn xuất hiện γH2AX foci trong thời gian sau khi chiếu xạ có thể đánh giá được mức độ đáp ứng với bức xạ của tế bào [17]. Số lượng DSB do bức xạ gây ra có tương quan chặt chẽ với số lượng các γH2AX foci và số lượng các foci này tăng tuyến tính với liều bức xạ khi so sánh hiệu ứng *in vitro* và *in vivo*. Do đó, phân tích các γH2AX foci trong tế bào lympho máu ngoại vi người cũng đã được sử dụng để định liều bức xạ, đặc biệt là trong trường hợp chiếu xạ *in vivo* ở liều rất thấp [18]. Như vậy, kỹ thuật phân tích γH2AX hiện nay được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu mức độ tổn thương DSB với những ưu điểm về độ nhạy và khả năng thực hiện trên các loại tế bào khác nhau của chúng.

Kết luận

Phân tích tổn thương dạng DSB bằng định lượng miễn dịch huỳnh quang γH2AX được ứng dụng rộng rãi trong nhiều nghiên cứu *in vitro* và *in vivo*. Trong nghiên cứu này, động học γH2AX foci ở tế bào lympho tăng chậm nhưng giảm nhanh hơn ở nguyên bào sợi người. Thời điểm lượng γH2AX foci đạt cao nhất ở tế bào lympho máu ngoại vi người là 1 giờ và ở nguyên bào sợi người là 45 phút sau chiếu xạ tia X liều 2 Gy. Do vậy, các nghiên cứu *in vitro* đối với các loại tế bào này cần thực hiện ở các thời điểm như trên là thích hợp.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin cảm ơn sự hỗ trợ của các đồng nghiệp trong quá trình thực hiện các thí nghiệm tại Viện Nghiên cứu Hạt nhân. Nghiên cứu này được thực hiện thông qua đề tài mã số CS/21/01-01 và một phần kinh phí từ RC VIE20887-IAEA E3.5010.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] E.P. Rogakou, et al. (1998) "Double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on Serine 139", *J. Biol. Chem.*, **273**, pp.5858-5868.

[2] K. Rothkamm, S. Horn (2009), "Gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure", *Ann Ist. Super Sanita*, **45**, pp.265-271.

[3] V. Savic, et al. (2009), "Formation of dynamic [gamma]-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin", *MolCell*, **34**, pp.298-310.

[4] D.R. Pilch, O.A. Sedelnikova (2003), "Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites", *Biochem. Cell Biol.*, **81(3)**, pp.123-129.

[5] O.A. Sedelnikova, E.P. Rogakou (2002), "Quantitative detection of (125)IdUinduced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody", *Radiat. Res.*, **158(4)**, pp.486-492.

[6] L.J. Kuo, L.X. Yang (2008), "Gamma-H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks", *In. Vivo.*, **22**, pp.305-309.

[7] J.S. Dickey, et al. (2009), "H2AX: functional roles and potential applications", *Chromosoma.*, **118**, pp.683-692.

[8] A. Kinner, et al. (2008), "Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin", *Nucleic Acids Res.*, **36**, pp.5678-5694.

[9] M. Podhorecka, et al. (2010), "H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy", *J. Nucleic Acids*, DOI: 10.4061/2010/920161.

[10] K. Rothkamm, M. Löbrich (2003), "Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses", *Proc. Natl. Acad. Sci*., **100**, pp.5057-5062.

[11] A. Leonard, et al. (1995), "Dose-effect relationship for *in vivo* and *in vitro* induction of dicentric aberrations in blood lymphocytes of children", *Radiat. Res.*, **14**, pp.95-98.

[12] G. Stephan, et al. (2005), "Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of patients treated with radium-224 for ankylosing spondylitis", *Radiat. Environ. Biophys.*, **44**, pp.23-28.

[13] S.V. Costes, et al. (2006), "Imaging features that discriminate between foci induced by high-and low-LET radiation in human fibroblasts", *Radiat. Res.*, **165**, pp.505-515.

[14] Sandrine Roch Lefevre, et al. (2010), "Quantification of c-H2AX foci in human lymphocytes: a method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure", *Radiation Research*, **174**, pp.185-194.

[15] Maria Moroni, et al. (2013), "Evaluation of the gamma-H2AX assay for radiation biodosimetry in a swine model", *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, pp.14119-14135.

[16] Rajesh Kumar Chaurasia, et al. (2021), "Establishment and multiparametric-cytogenetic validation of 60 Co-gamma-ray induced, phospho-gamma-H2AX calibration curve for rapid biodosimetry and triage management during radiological emergencies", *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **866**, DOI: 10.1016/j.mrgentox.2021.503354.

[17] D. Klokov, et al. (2006), "Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays", *Radiother. Oncol.*, **80**, pp.223-229.

[18] M. Lobrich, et al. (2005), "*In vivo* formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**, pp.8984-8989.