

*І.В. Чорна, к.біол.наук, І.Ю. Висоцький, д.мед.наук*

## ОЦІНКА ІНДУКОВАНИХ РАДІАЦІЄЮ ПОШКОДЖЕНЬ ДНК ТА ЇХНЬОЇ РЕПАРАЦІЇ У КЛІТИНАХ ЛІНІЇ K562 МІЕЛОГЕННОЇ ЛЕЙКЕМІЇ ЛЮДИНИ

*Сумський державний університет, медичний інститут, м. Суми*

Виникнення стійкості ракових клітин до дії іонізуючого опромінення є перешкодою для променевої терапії, тому подолання радіорезистентності пухлин пов'язане з успіхами у вивченні механізмів клітинної відповіді на генотоксичний вплив іонізуючої радіації. Основні дослідження дії радіації на клітини проводяться по таких напрямках: 1) вивчення пошкоджень ДНК та їхньої репарації; 2) мутації генів-супресорів пухлин (p53, Atm, Bcl1/2, DNA-РК та ін.) та індукована радіацією експресія онкогенів; 3) роль факторів росту та цитокінів; 4) порушення клітинного циклу та його контрольних точок; 5) з'ясування механізмів апоптозу та некрозу [1, 2].

Відомо, що дія іонізуючого випромінювання викликає одно- та двониткові розриви ДНК [3, 4]. У репарацію цих пошкоджень залучаються різні молекулярні системи. Однотиткові розриви швидко відновлюються, а двониткові репарують повільно або зовсім не репарують, що призводить у кінцевому результаті до загибелі клітин. В останні роки було розроблено багато методів, що дозволяють реєструвати пошкодження ДНК та досліджувати процеси репарації, однак не всі вони володіють достатньою чутливістю та специфічністю. Одним із найбільш перспективних методів оцінки клітинної реакції на опромінення є метод "ДНК-комет", який базується на оцінці електрофоретичної рухливості ДНК окремих клітин, іммобілізованих у агарозному гелі. Реєстрованою зміною є здатність

ДНК індивідуальної клітини мігрувати у постійному електричному полі завдяки розщепленню її на менші фрагменти. Розщеплена ДНК клітин після електрофорезу утворює характерні структури, що на вигляд нагадують комети. За параметрами "комети" можна судити про стан ДНК клітини [5-8]

Цитостатична дія променевої терапії, як і протипухлинних препаратів, реалізується шляхом індукції апоптозу. Тому розвиток резистентності до обох типів протипухлинної терапії так або інакше пов'язаний із факторами, що впливають на апоптоз. Хронічна мієлопроліферативне захворювання, при якому відмічається аномально швидке розмноження мієлопоетичних клітин крові у кровотвірній тканині червоного кісткового мозку. ХМЛ характеризується порушеннями хромосомного набору, які виражаються у появі філадельфійської хромосоми. Утворення даної хромосоми зумовлено реципрокною транслокацією між 9 і 22 хромосомами t(9;22)(q34;q11). У результаті цього спостерігається конститутивна активація Bcr-Abl тирозинкінази, що, вірогідно, призводить до підвищення резистентності до апоптозу та зниження радіочутливості в лімфомних клітинах, однак механізми такої резистентності залишаються недостатньо з'ясованими [9, 10, 11].

Адаптаційні зміни, які забезпечують виживання клітин за рахунок тимчасової активації їх захисних механізмів, можуть лежати в основі виникнення стабільної резистентності

до хіміо- та радіотерапії частини ракових клітин. Тому виникає необхідність більш детального вивчення цих змін.

Метою даної роботи було вивчення впливу іонізуючого опромінення на ріст, виживання та репарацію однокланцових розривів ДНК у клітинах мієлогенної лейкемії лінії K562.

### Матеріали та методи дослідження

Клітини лінії K562 (мієлогенна лейкемія людини) вирощували в середовищі RPMI 1640 ("Sigma", США), за присутності 10% деконплементованої ембріональної сироватки великої рогатої худоби (FCS, "Sigma", США) і 50 мкг/мл гентаміцину. Культивовані клітини підтримували в зволоженій атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

Для опромінення клітин було використано рентгенівську установку Clinac 600 ("Varian", США) Потужність дози становила 1 Гр хв.

Інтенсивність росту клітинної культури та відсоток мертвих клітин визначали після їх фарбування розчином трипанового синього (кінцева концентрація 0,1%, час фарбування — 5 хв) та підрахунку зафарбованих (мертвих) і незафарбованих (живих) клітин під інвертованим мікроскопом у цитометричній камері Фукса-Розенталя.

Ідентифікацію апоптичних клітин здійснювали на підставі аналізу морфологічних ознак: конденсації хроматину, фрагментації ядра, та яскравості зафарбовування фіксованих клітин флюоресцентним барвником DAPI (4,6-діамідино-2-феніліндол) [12] Через 48 год після опромінення клітини збирали та осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 170 g. Надосадову рідину відбирали, а до осаду, безперервно перемішуючи, додавали 200 мкл охолодженого фіксуєного розчину (1 частина льодяної оцтової кислоти: 3 частини безводного метанолу) та залишали пробірки на 10 хв на льоді. Після цього наносили краплю клітинної суспензії на холодне предметне мікроскопічне скельце розміром 26x76 мм. Висушений препарат фарбували DAPI (1 мкг мл у буфері 100 mM NaCl; 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,4) та оглядали під флюоресцентним мікроскопом

Для виявлення розривів ДНК та їх репарації здійснювали гель-електрофорез одиничних клітин (Single

Cell Gel Electrophoresis Assay, SCGE) або метод ДНК-комет за умов лужного рН [5, 13]. На досліджувані клітини діяли рентгенівським опроміненням у дозі 2,0 Гр. Щоб запобігти репарації ДНК, опромінення проводили на льоді. У різні часові інтервали (0, 15, 30, 60, 120 та 180 хв) після дії іонізуючої радіації аликвоти суспензії клітин ( $2 \times 10^4$  у 50 мкл) змішували при  $37^\circ\text{C}$  із 100 мкл 1% розчину низькоплавкої агарози VII типу ("Sigma", США) та наносили у вигляді тонкого шару на предметні мікроскопічні скельця розміром  $26 \times 76$  мм, які були попередньо вкриті 0,5% розчином агарози III типу ("Sigma", США) та висушені. Нанесені зразки покривали скельцями розміром  $24 \times 50$  мм, витримували протягом 5 хв при  $4^\circ\text{C}$  для застигання гелю агарози, після чого накривні скельця знімали. Лізис клітин проводили щонайменше протягом 1 год при  $4^\circ\text{C}$  у свіжо приготовленому холодному лізуючому буфері (2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA, 10 мМ Tris-HCl, рН 7,5, 1% Triton X-100). Після цього слайди на предметних скельцях поміщали у камеру для горизонтального електрофорезу та інкубували протягом 15 хв у свіжо приготовленому холодному електрофоретичному буфері (300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA, рН 13). Електрофорез здійснювали у тому ж буфері при силі струму 300 мА, напрузі 0,8 В см протягом 20 хв. Після цього слайди промивали двічі по 5 хв нейтралізуючим буфером (0,4 М Tris-HCl, рН 7,5) та висушували. Комети зафарбовували розчином бромистого етидію (20 мкг/мл), оглядали під флуоресцентним мікроскопом та класифікували на 5 категорій ( $A_0 - A_4$ ) згідно класифікації, розробленої Коллінзом [5, 6]. Для кожної експериментальної точки підраховували 100 комет. Середній рівень пошкоджень ДНК (D) в умовних одиницях (у о) визначали за формулою:  $D = A_1 + 2 \times A_2 + 3 \times A_3 + 4 \times A_4$  [13, 14], де  $A_1, A_2, A_3, A_4$  — кількість комет відповідних класів. Таким чином, підрахований загальний рівень пошкоджень ДНК у зразку може коливатись від 0 до 400 у. о.

Варіаційно-статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням критерію Стьюдента за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel 2002.

### Результати дослідження та їх обговорення

Дія на клітини іонізуючого випромінювання призводить до індукції різних типів пошкоджень ДНК та процесів репарації. Чутливість пухлин, так само як і здорових тканин, є вирішальним фактором для успішної радіотерапії та залежить від типу клітин, проліферативного та метаболічного статусу, ДНК-репаруючої здатності та ін.

Встановлено, що час подвоєння неопромінених клітин лінії K562 становив приблизно 24 години. Дія різних доз рентгенівського опромінення (2, 5, 10 Гр) призводила до дозозалежного інгібування росту клітин K562. Даний ефект залежав від часу, його величина зростала зі збільшенням тривалості культивування клітин після припинення дії опромінення (рис. 1). Повне інгібу-

або його затримку в  $G_1, S$  та  $G_2$  фазах. Механізми, які дозволяють клітині відповідати на пошкодження ДНК затримкою клітинного циклу, завдяки чому здійснюється репарація пошкоджень і тим самим їх обмеження, і є контрольними точками клітинного циклу, які багато в чому визначають клітинну відповідь на дію пошкоджуючих агентів, перш за все таких, як іонізуюче випромінювання та хіміопрепарати [1]. "Арешт" клітин у  $G_1$  фазі дає клітинам достатньо часу для репарації пошкодженої ДНК, стабілізації геному й переходу до реплікації. Якщо ж пошкодження ДНК надто масивне, то індукуються гени, які є позитивними регуляторами апоптозу [15, 16]. Виявлено, що у клітинах K562 порушена здатність до затримки клітинного циклу у  $G_1$  фазі після дії рентгенівського опромінення і пе-

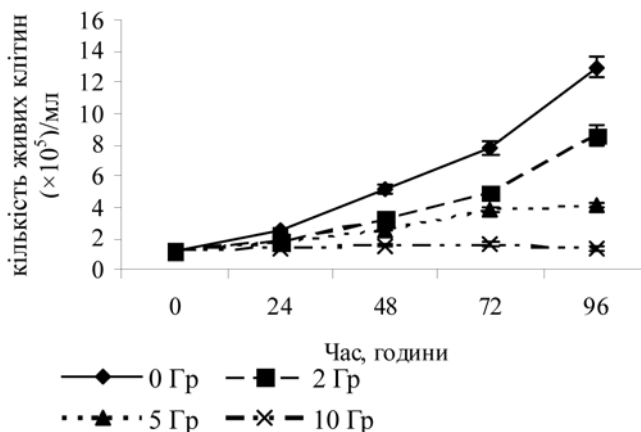


Рис. 1. Вплив іонізуючого випромінювання на проліферацію клітин лінії K562

вання росту клітин спостерігалось при опроміненні в дозі 10 Гр. Щоб з'ясувати, чим зумовлена затримка зростання кількості клітин — припиненням проліферативної активності чи їхньою загибеллю — вивчали життєздатність клітин методом фарбування барвником трипановим синім. Принцип даного методу базується на тому факті, що живі клітини володіють вибірковою проникністю плазматичної мембрани для різних речовин, вони непроникні для використаного барвника. Виявлено, що зменшення приросту кількості клітин K562 після опромінення у порівнянні з неопроміненими клітинами зумовлене, головним чином, припиненням їхньої проліферативної активності.

Відомо, що іонізуюча радіація ініціює зупинку клітинного циклу

реважна більшість клітин зупиняється у  $G_2$  фазі [9]. Блок у  $G_2$  фазі клітинного циклу сприяє підвищенню радіорезистентності в пухлинних клітинах. І навпаки, втрата  $G_2$  контрольної точки в клітинах обумовлює підвищення їхньої чутливості до цитотоксичної дії радіації та цитостатиків. Наступне швидке включення в мітоз клітин із пошкодженнями ДНК призводить до подальших хромосомних порушень та клітинної загибелі [1]. Радіопротекторну дію Vcr-Abl тирозинкінази у клітинах K562 пов'язують із пролонгованою зупинкою клітин у  $G_2$  фазі клітинного циклу [9].

Для визначення рівня початкових та залишкових пошкоджень ДНК, викликаних дією рентгенівського випромінювання та швидкості репарації цих пошкоджень у кліти-

нах лінії K562, застосовували метод ДНК-комет у лужному рН. За умов нейтрального рН комет-аналіз ДНК дозволяє виявляти дволанцюгові розриви ДНК, а за лужного — одноланцюгові розриви та лужнолабільні сайти, оскільки при використанні даного методу двониткові розриви становлять менше 5% загального виходу пошкоджень ДНК [17]. Міграція ДНК до аноду тим більша, чим більше розривів містить ДНК. На рисунку 2 наведено приклади форми комет різних класів, одержаних нами, і які повністю відповідають даним літератури [6, 13].

Фарбування бромистим етидієм чітко виявляє форму комет і дозволяє розділити їх на 5 класів ( $A_0$  —  $A_4$ ), залежно від співвідношення матеріалу ДНК у "голові" та "хвості" комети: клас  $A_0$  — інтактне ядро, немає пошкоджень ДНК; клас  $A_1$  — добре виражене ядро, довжина "хвоста" комети менша або рівна величині радіуса "голови" комети (<5% ДНК у "хвості"); клас  $A_2$  — чітке ядро, довжина "хвоста" комети менша або рівна величині діаметра "голови" комети (<20% ДНК у "хвості"); клас  $A_3$  — помітне ядро, довжина "хвоста" комети перевищує величину діаметра "голови" комети (кількість ДНК у "хвості" від 20 до 75%); клас  $A_4$  — пошкодження ДНК високої інтенсивності, нечітке ядро, більше 75% ДНК розміщується у "хвості" комети (рис. 2).

Встановлено, що вихідний рівень ендогенних пошкоджень ДНК у неопромінених клітинах лінії K562 не перевищував 90 у.о., що становить близько 22% від максимальної величини пошкоджень (400 у.о.), який може бути виявлений даним методом у досліджуваних клітинах під впливом стресових чинників. Як видно із табл. 1, у клітинах K562, які тестували на різні терміни (0, 15, 30, 60, 120, 180 хв) після опромінення в дозі 2 Гр, репарація одониткових розривів ДНК найбільш інтенсивно здійснювалась протягом перших 30 хвилин після опромінення.

У неопромінених клітинах (контроль) сумарна кількість комет класів  $A_2$ ,  $A_3$  та  $A_4$  не перевищувала 3%. У клітинах, які тестували відразу (0 хв) після опромінення, спостерігалось, головним чином, збільшення кількості комет класу  $A_2$  та практично повна відсутність комет класу  $A_0$  (< 1%). Залишкові нерепара-

товані пошкодження (у середньому біля 25%) були виявлені після 180 хв культивування опромінених клітин даної лінії (рис. 3).

В еукариотичних організмів виявлено два основних механізми репарації двониткових розривів ДНК: гомологічна рекомбінація (homolo-

gous recombination, HR) та з'єднання негомологічних кінців (nonhomologous end-joining, NHEJ) [1, 16, 18]. У механізмі HR матрицею слугує непошкоджений гомологічний фрагмент ДНК з послідовністю, комплементарною хоча б одному розриваному кінцю, тоді як NHEJ не вима-

Таблиця  
Вплив рентгенівського випромінювання на індукцію пошкоджень ДНК та їхню репарацію у клітинах лінії K562

Доза опромінення (Гр)	Кількість підрахованих клітин	Час після опромінення (хв)	Рівень пошкоджень ДНК (у.о.)
0	100	0	78,8±9,6
2	100	0	172,8±6,5***
2	100	15	140,1±5,3***
2	100	30	126,9±4,1***
2	100	60	116,0±8,0**
2	100	120	106,2±4,0**
2	100	180	105,6±5,1*

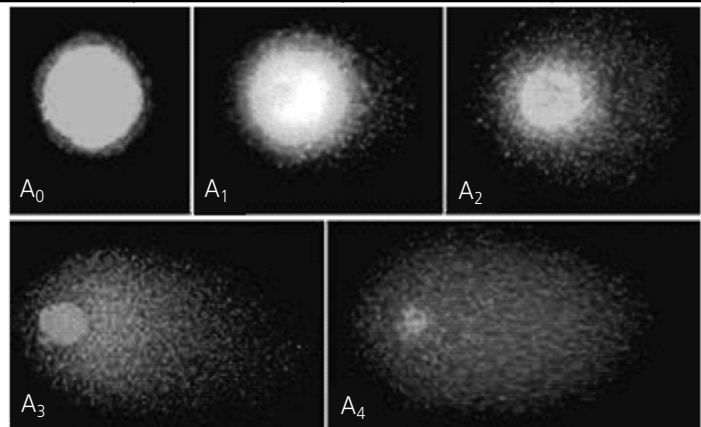


Рис. 2. Мікрофотографії комет класів  $A_0$  —  $A_4$  із наростаючим ступенем пошкоджень ДНК (фарбування бромистим етидієм). об. ?400

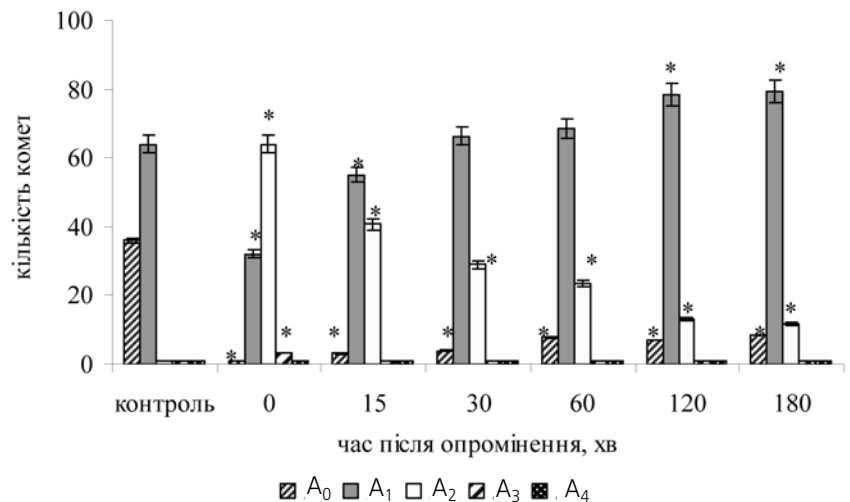


Рис. 3. Співвідношення ДНК-комет класів  $A_0$  —  $A_4$  у клітинах K562 після дії рентгенівського опромінення.

Примітка: відмінність між контрольними та дослідними (опроміненими) клітинами вірогідна \* -  $p < 0,001$

гає наявності гомологічної матриці NHEJ здійснюється комплексом білків, до якого належать ДНК-залежна протеїнкіназа (DNA-PK), Ku70, Ku86, ДНК-лігаза IV, XRCC4 та інші. Комплекс білків, що беруть участь у репарації двониткових розривів ДНК за механізмом HR включає ATM, BLM, BRCA1/2, c-ABL, RAD51/51C/51D/52/54, XRCC2/3 та ін. Крім того, білки MRE11, RAD50 та NBS1 (MRN комплекс) беруть участь у репарації пошкоджень ДНК як за механізмом HR, так і NHEJ [16, 18, 19]. Супресори пухлин p53 та BRCA1 контролюють протікання HR та NHEJ, однак їхній вплив на виникнення стійкості до дії радіації залишається предметом інтенсивних досліджень [1, 15]

Як уже було зазначено, резистентність до апоптозу є однією з ключових складових хіміо- та радіорезистентності пухлин. Вплив іонізуючої радіації може викликати мутації генів-супресорів пухлин, активацію онкогенів, тим самим порушуючи індукцію апоптозу в пухлинних клітинах. Механізми, за якими клітина "відчуває" радіаційне пошкодження ДНК, ще недостатньо вивчені. Встановлено, що даний процес пов'язаний з білком p53, а також із деякими протеїнкіназами (c-Abl, ATM). У результаті пошкодження може відбуватися активація p53, що призводить до запуску різних біохімічних відповідей клітини на вплив: апоптоз або виживання (репарація) [1, 15]. Виживання клітини здійснюється шляхом затримки клітинного циклу та репарації ДНК за участю P21WAF1/CIP1 і

Gadd45 [1]. Щоб прослідкувати динаміку розвитку апоптозу в клітинах K562 після впливу рентгенівського випромінювання, проводили оцінку таких морфологічних критеріїв як конденсація хроматину та фрагментація ядра клітини. Не було відмічено достовірних змін у кількості апоптичних клітин у досліджувані терміни (24, 48 год) після дії опромінення в дозі 2 Гр (рис. 4).

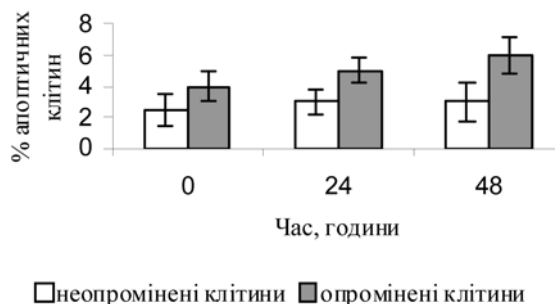


Рис. 4. Вплив рентгенівського опромінення (2,0 Гр) на появу апоптичних клітин лінії K562

Таким чином, у відповідь на дію генотоксичних чинників у клітині запускається ряд метаболічних та регуляторних процесів, серед яких індукція клітинної загибелі шляхом апоптозу, або зупинка клітинного циклу та репарація ДНК. Останнє було виявлено на досліджуваній лінії клітин при дії рентгенівського опромінення.

#### Висновки

1. Оптимізовано умови детекції одониткових розривів ДНК методом комет-аналізу в лужному середовищі, який дає адекватну інформацію про загальний рівень пошкоджень ДНК клітин,

а при дослідженні через певні часові інтервали і про ефективність процесів репарації.

2. Визначені наступні закономірності репарації пошкоджень ДНК в опроміненіх дозою 2 Гр клітинах K562: а) ефективність і швидкість репарації найбільш висока протягом перших 30 хвилин після опромінення; б) репарація ДНК в клітинах

K562 не завершується повністю через 180 хв після опромінення.

3. Дія рентгенівського опромінення (2, 5, 10 Гр) призводила до дозозалежного інгібування росту клітин K562, що зумовлене, головним чином, пригніченням їхньої проліферативної активності, а не загибеллю.

4. Одержані результати можуть бути корисними при аналізі молекулярних основ пухлинної етіології ХМЛ, а також можуть слугувати експериментальним підґрунтям для розроблення більш ефективних схем радіотерапевтичного лікування онкологічних хворих.

#### ЛІТЕРАТУРА

- Свирновский А.И. Молекулярные основы феномена химио- и радиорезистентности при опухолевых процессах / А.И. Свирновский, В.В. Пасюков // Медицинские новости. — 2007. — № 11. — С. 7-19.
- Meyn R.E. The role of apoptosis in radiation oncology / R.E. Meyn, L. Milas, K.K. Ang // Int. J. Radiat. Biol. — 2009. — V. 85, № 2. — P. 107-115.
- Jegga P.A. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? / P.A. Jegga, M. L'brich // Oncogene. — 2007. — V. 26, № 56. — P. 7717-7719.
- Willers H Repair of radiation damage to DNA / H. Willers, J. Dahm-Daphi, S.N. Powel // Br J Cancer — 2004 — V 90, № 7 — P 1297-1301.
- Dusinska M. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions / M. Dusinska, A. Collins // Mutagenesis. — 2008. — V. 23, № 3. — P. 191-205.
- Collins A.R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay / A.R. Collins // Mutat. Res. — 2009. — V. 681, № 1. — P. 24-32.
- Сорочинская У.Б. Применение метода ДНК-комет для оценки поврежденный ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды / У.Б. Сорочинская, В.М. Михайленко // Онкология. — 2008. — Т. 10, № 3. — С. 303-309.
- McKenna D.J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer / D.J. McKenna, S.R. McKeown, V.J. McKelvey-Martin // Mutagenesis. — 2008. — V. 23, № 3. — P. 183-190.
- The modulation of radiation-induced cell death by genistein in K562 cells: activation of thymidine kinase 1 / M.H. Jeong, Y.H. Jin, E.Y. Kang [et al.] // Cell Research. — 2004. — V. 14, № 4. — P. 295-302.
- Stubbs M.C. Therapeutic implications of leukemia stem cell development / M.C. Stubbs, S.A. Armstrong // Clin. Cancer. Res. — 2007. — V. 13, № 12. — P. 3439- 3442.
- Vannucchi A.M. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms / A.M. Vannucchi, P. Guglielmelli, A. Tefferi // CA Cancer J. Clin. — 2009. — V. 59, № 3. — P. 171-191.
- Petrovi? S. Positive correlation between micronuclei and necrosis of lympho-

- cytes in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation / S. Petrovi?, A. Leskovic, G. Joksi? // Arch. Oncol. — 2005. — V. 13, № 2. — P. 65-68.
13. Relationships between acute reactions to radiotherapy in head and neck cancer patients and parameters of radiation-induced DNA damage and repair in their lymphocytes / J. Rzeszowska-Wolny, O. Palyvoda, J. Polanska [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. — 2008. — V. 84, № 8. — P. 635-642.
  14. The comet assay: topical issues / A.R. Collins, A.A. Oscoz, G. Brunborg [et al.] // Mutagenesis. — 2008. — V. 23, № 3. — P. 143-151.
  15. Ohnishi T. The role of the p53 molecule in cancer therapies with radiation and/or hyperthermia / T. Ohnishi // J. Cancer Res. — 2005. — V. 1, № 3. — P. 147-150.
  16. Wyman C. DNA double-strand break repair: all's well that ends well / C. Wyman, R. Kanaar // Annu. Rev. Genet. — 2006. — V. 40, № 2. — P. 363-383.
  17. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments? / S.A. Shaposhnikov, V.B. Salenko, G. Brunborg [et al.] // Electrophoresis. — 2008. — V. 29, № 14. — P. 3005-3012.
  18. Single-strand annealing, conservative homologous recombination, nonhomologous DNA end joining, and the cell cycle-dependent repair of DNA double-strand breaks induced by sparsely or densely ionizing radiation / M. Frankenberg-Schwager, A. Gebauer, C. Koppe [et al.] // Radiat. Res. — 2009. — V. 171, № 3. — P. 265-273.
  19. Kanaar R. DNA repair by the MRN complex: break it to make it / R. Kanaar, C. Wyman // Cell. — 2008. — V. 135, № 1. — P. 14-16.

*I.B. Чорна, I.Ю. Висоцький*

**ОЦІНКА ІНДУКОВАНИХ РАДІАЦІЄЮ ПОШКОДЖЕНЬ ДНК ТА ЇХНЬОЇ РЕПАРАЦІЇ У КЛІТИНАХ ЛІНІЇ K562 МІЕЛОГЕННОЇ ЛЕЙКЕМІЇ ЛЮДИНИ**

У статті представлені результати досліджень впливу рентгеновського опромінення на ріст, виживання та репарацію одноланцюгових розривів ДНК у клітинах мієлогенної лейкемії лінії K562. Виявлено дозозалежне інгібування росту клітин даної лінії. За допомогою комет-аналізу встановлено, що первинний рівень індукованих радіацією пошкоджень ДНК знижувався з часом завдяки репарації ДНК, яка найбільш ефективно проходила протягом перших 30 хвилин після впливу опромінення.

*Ключові слова:* клітини K562, радіація, комет-аналіз, репарація ДНК.

*I.V. Chorna, I.Yu. Vysotsky*

**THE EVALUATION OF RADIOINDUCED DAMAGE AND REPAIR CAPACITY IN K562 CELLS HUMAN MYELOGENOUS LEUKAEMIA**

Results of researches of the effect of X-radiation on growth, viability and repair of DNA single-strand breaks in human myelogenous leukaemia K562 cells are stated in the article. It was found a growth inhibition of cells in a dose-dependent manner. With the aid of comet assay it was established that the primary level of radiation-induced DNA damage had decreased in a time-dependent manner because of DNA repair capacity which was the most effective during the first 30 minutes after radiation action.

*Key words:* K562 cells, radiation, comet assay, DNA repair.

Надійшла до редакції 11.09.09