

УДК:612.014.3:546.3+612.014.48+614.875:624.131.22

Д. Д. Гапеєнко¹, Г. Й. Лавренчук¹✉, Х. М. Литвинчук¹, В. С. Асмолоква²¹Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, вул. Мельникова, 53, 04050, Київ, Україна,²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України, вул. Леонтовича, 9, 01601, Київ, Україна

ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННИХ ЕФЕКТІВ ЗА УМОВ КОМБІНОВАНОГО ВПЛИВУ ІОНІВ НІКЕЛЮ ТА ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

В сучасних умовах зростає ймовірність одночасного впливу радіаційного та хімічного факторів на біологічні об'єкти, а в зв'язку з цим питання особливостей комбінованої дії різних за своєю природою факторів стає все більш актуальним.

Метою роботи було дослідження у тест-системі культури клітин цитотоксичності іонів нікелю та виявлення особливостей клітинних реакцій при комбінованій дії іонів нікелю та іонізуючого випромінювання.

Матеріали і методи. Дослідження виконані на перещеплюваній культурі клітин лінії L929. Культивування клітин здійснювали згідно зі стандартними методами роботи з клітинними штамами. Через 24 год після посадки клітини опромінювали γ -квантами на апараті “Тератрон” (Канада) в дозах 0,5, 5,0 та 10,0 Гр. Водорозчинну сіль ацетату нікелю додавали в культуральне середовище за 1 год перед опроміненням в кінцевій концентрації: 10, 1, 0,1, 0,01 мкмоль/л. Морфологічні характеристики клітин в культурі визначали у різні терміни культивування. Проліферативну активність клітин оцінювали за кінетикою росту: у межах сітки площею 0,05 мм² підраховували загальну кількість клітин, кількість мітозів і кількість гігантських багатоядерних (2 і більше ядер) клітин. Одночасно визначали кількість апоптотичних клітин.

Результати досліджень. В результаті роботи було встановлено, що іони нікелю проявляють цитотоксичну дію на клітини *in vitro*: при збільшенні концентрації елемента зростала загибель клітин, пригнічувалась їх проліферативна та мітотична активність. Причому, за низьких концентрацій (0,01–0,1 мкмоль/л) зростала кількість атипових полікаріоцитів та рівень апоптозу в культурі клітин. При підвищенні концентрації іонів нікелю загибель клітин відбувалась через апоптоз та некроз. При поєднанні радіації та іонів нікелю спостерігали нелінійні клітинні відповіді: за малих доз радіації (0,5 Гр) відмічали сенсibiliзацію клітин до дії радіації, а за сублетальних доз (10 Гр) – певний радіозахист. Кількість апоптотичних клітин за цих умов статистично достовірно вища порівняно з контролем.

Висновки. Дослідження показали, що іони нікелю мають істотний токсичний вплив на проліферацію та мітотичну активність клітин *in vitro*. При комбінованому впливі з іонізуючим випромінюванням були виявлені сенсibiliзація клітин іонами нікелю до наступного опромінення в малій дозі (0,5 Гр) та зменшення толерантності клітин до опромінення в сублетальній дозі (10 Гр).

Ключові слова: важкі метали, іони нікелю, культура клітин, проліферація, іонізуюче випромінювання, мітоз, апоптоз.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2013. Вип. 18. С. 313–321.

✉ Лавренчук Галина Йосипівна, e-mail: lg20071956@ukr.net

© Гапеєнко Д. Д., Лавренчук Г. Й., Литвинчук Х. М., Асмолоква В. С., 2013

D. D. Napieienko¹, G. I. Lavrenchuk¹✉, J. M. Litvinchuk¹, V. S. Asmolkova²

¹State Institution "National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

²A. V. Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

Features of cellular effects under combined effects of nickel ions and ionizing radiation

Under current conditions the probability of simultaneous effects of radiation and chemical factors on biological objects increases, and that's why the issue of combined influence of factors different by their nature becomes progressively important.

The objective was to study the cytotoxicity of nickel ions in a test-system of cell culture and to detect the cellular reactions under a combined impact of nickel ions and ionizing radiation.

Materials and methods. Studies were performed on inoculated cell culture line L929. Cells were cultivated according to standard methods of treating the cell strains. After 24 h cultivation the cells were γ -irradiated at the unit "Teratron" (Canada) at doses of 0.5, 5.0 and 10.0 Gy. The water-soluble salt of nickel acetate was added to the culture medium 1 h prior to irradiation in the final concentration of 10, 1, 0.1, or 0.01 $\mu\text{mol/L}$. Morphological and functional characteristics of cells in a culture were determined at different periods of cultivation. Proliferative cell activity was assessed by growth kinetics: the total number of cells, the number of mitoses and giant multi (2 or more nuclei) cells were counted within grid area of 0.05 mm². Simultaneously the number of apoptotic cells was determined.

Study results. As a result, it was found that nickel ions exhibit the cytotoxic effects on cells in vitro: an increase in concentration of the element caused the cell death intensification with proliferative and mitotic activity decrease. Moreover, at low concentrations (0.01–0.1 $\mu\text{mol/L}$) the number of atypical polykaryocytes increased as well as the level of apoptosis. When nickel ions concentration increased the cell death took place through apoptosis and necrosis. Under the combined influence of radiation and nickel ions the nonlinear cellular responses were observed: under the low-dose radiation (0.5 Gy) a sensitization of cells to radiation was noted, and the sublethal doses (10 Gy) caused a particular radioprotection. Number of apoptotic cells under these conditions was significantly higher vs. control.

Conclusions. Studies have shown that nickel ions have significant toxic effects on proliferation and mitotic activity of cells in vitro. Under the combined effects of ionizing radiation the cell sensitization to nickel ion was detected till following exposure to low dose (0.5 Gy) and reduction of cells tolerance to sublethal doses of irradiation (10 Gy).

Key words: heavy metals, nickel ions, cell culture, proliferation, ionizing radiation, mitosis, apoptosis.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2013;18:313–321.

Постійне зростання масштабів використання радіоактивних речовин та джерел іонізуючого випромінювання (ІВ) у різних галузях промисловості, медицині, науці збільшує вплив радіації на всі компоненти природного середовища. Одночасний вплив радіаційного опромінення та високих концентрацій токсичних металів, зокрема сполук нікелю, вміст яких в атмосфері великих міст досить високий, може суттєво змінити картину у порівнянні з очікуваною, якщо не враховувати нелінійність характеру взаємодії між собою цих шкідливих факторів. За останні 20 років у літературі з'явилась значна кількість повідомлень про результати експериментальних досліджень поєднаної дії важких металів (ВМ) та іонізуючого випромінювання [1–9]. Найчастіше зустрічаються дані про те, що комбінована дія радіаційного та хімічного чинників зумовлює підсилення негативного їх впливу на об'єкти, у порівнян-

The constant increase in the scale of the usage of radioactive substances and ionizing radiation (IR) sources in various fields of industry, medicine, science enhances the effects of radiation on all components of the environment. Simultaneous effects of radiation exposure and high concentrations of toxic metals, including nickel compounds, whose content in the atmosphere of large cities is high, can significantly change the situation compared with the expected, except for the nonlinear nature of the interaction between these hazards. Over the past 20 years a significant amount of literature appeared notifying the results of experimental studies of combined effects of heavy metals (HM) and ionizing radiation [1–9]. The most common evidence shows that the combined effects of radiation and chemical factors lead to amplification of their negative influence on the objects, compared

ні з окремими впливами кожного з них [2, 3, 5–9]. Зокрема, було показано, що при тривалому впливі іонізуючої радіації низької інтенсивності і сполук важких металів на тлі посилення вільнорадикальних процесів відбувається розбалансування ферментативного захисту клітини. Порушення нормальної життєдіяльності клітин обумовлює дисфункцію органів, а в ряді випадків – появу новоутворень.

В останні десятиріччя для вивчення різних аспектів дії хімічних речовин на клітинні та субклітинні структури все ширше використовуються клітини *in vitro* [10]. Переваги цієї моделі – у можливості вивчення прямого впливу хімічного агента на клітину незалежно від тканинних чи органних взаємодій і регуляторного впливу нервової та ендокринної систем.

МЕТА

Метою роботи було дослідити у тест-системі культури клітин цитотоксичність іонів нікелю та встановити особливості клітинних реакцій при комбінованій дії іонів нікелю та іонізуючого випромінювання.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження виконані на перещеплюваній культурі клітин (фібробласти мишей С3Н трансформовані метилхолантеном) – лінія L₉₂₉ (клітинний цикл у середньому 24 год) [11]. Культивування клітин здійснювали у поживному середовищі, такого складу: середовища RPMI-1640 (90 %), ембріональна теляча сироватка (10 %) та антибіотики згідно зі стандартними методами роботи з клітинними штамами [12]. Опромінення клітин здійснювали через 24 год після посадки на апараті “Тератрон” (Канада) (джерело – ⁶⁰Co з енергією γ -квантів 1,2 МеВ, потужність експозиційної дози $4,3 \cdot 10^{-4}$ Кл/(кг·с), відстань до об’єкта 80 см, дози опромінення 0,5; 5,0 та 10,0 Гр). У дослідженнях була використана водорозчинна сіль ацетату нікелю (Ni(CH₃COO)₂). Контролем на ацетат-аніон був ацетат натрію (NaCH₃COO). Метал додавали в культуральне середовище за 1 год перед опроміненням в кінцевій концентрації: 10,0; 1,0; 0,1; 0,01 мкмоль/л. Культивування клітин здійснювали упродовж 5 діб. Морфологічні характеристики клітин в культурі визначали у різні терміни культивування. Проліферативну активність клітин оцінювали за кінетикою росту. Під оптичним мікроскопом “Axioscop” (West Germany) при збільшенні у 1000 разів у межах сітки площею 0,05 мм² підраховували загальну кількість клітин, кількість мітозів і кількість гігантських багатоядерних (2 і більше ядер) клітин. Одно-

to their individual influences [2, 3, 5–9]. It was shown that a prolonged exposure to ionizing radiation of low intensity and heavy metal compounds together at the background of intensified free radical processes increases the imbalance of cellular enzymatic defense. Disruption of normal cellular activity causes organ dysfunction, and in some other cases cause the tumor appearance.

In the last decade the cells *in vitro* are being used to study various aspects of chemical effects on cellular and subcellular structures [10]. Advantages of this model are in the ability to study the direct effects of chemical agents on cells regardless of tissue or organ interactions and regulatory impact of the nervous and endocrine systems.

OBJECTIVE

The objective of this research was to investigate the cytotoxicity of nickel ions and to determine the features of cellular reactions under the combined action of nickel ions and ionizing radiation in the cell culture test system.

MATERIALS AND METHODS

Studies performed on inoculated culture cells (murine fibroblasts transformed by S3N methylcholantren) – line L₉₂₉ (24 h average cell cycle) [11]. Cultivation of cells was carried out in a nutrient medium of such composition: medium RPMI-1640 (90%), fetal calf serum (10%) and antibiotics according to standard methods of work with cell strains [12]. Irradiation of cells was performed 24 h after positioning on the “Teratron” unit (Canada) (source – ⁶⁰Co with γ -rays energy of 1.2 MeV, exposure dose $4,3 \cdot 10^{-4}$ C/(kg·sec), distance to object 80 cm, doses 0.5, 5.0, and 10.0 Gy). In the studies a soluble acetate salt of nickel (Ni (CH₃COO)₂) was used. Sodium acetate (NaCH₃COO) was a control for the acetate anion. Metal was added to the culture medium 1 h prior to irradiation in the final concentration of 10, 1, 0.1, and 0.01 μ mol/L. Cells were cultivated for 5 days. Morphofunctional characteristics of the cells in culture were determined at different periods of cultivation. Cellular proliferative activity was assessed by the growth kinetics. Total number of cells, number of mitoses and giant polynucleated (2 or more nuclei) cells were counted under the optical microscope “Axioscop” (West Germany) with 1000x magnification within grid area of 0.05 mm². Number of apoptotic cells

часно визначали кількість апоптотичних клітин. Аналіз проводили на протоковому цитофлюориметрі FACStar Plus фірми “Becton Dickinson” (США).

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими статистичними методами з використанням t-критерію Стюдента та за допомогою пакетів прикладних програм Microsoft Excel та Biostat.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В контролі клітини лінії L₉₂₉ утворюють щільний моношар з типових фібробластоподібних клітин веретеноподібної, округлої або овальної форми. Більшість клітин має два відростки. Цитоплазмі цих клітин притаманні світлі вакуолі та маленькі гранули. Ядра клітин відносно великі, зустрічаються окремі двоядерні, а також гіперхромні клітини. У полі зору спостерігаються 5–8 клітин на стадії поділу (рис.1, А).

was determined simultaneously. Analysis was performed on FACStar Plus flow cytometry unit (“Becton Dickinson”, USA).

The experimental data were treated with conventional statistical methods using the Student t-test and software packages Microsoft Excel and Biostat.

RESULTS AND DISCUSSION

In the Control L₉₂₉ cells form a dense monolayer of typical fibroblast-type cells of a fusiform, round or oval shape. Most cells contain two processes. The cytoplasm of these cells contains light vacuoles and small granules. Nuclei of the cells are relatively large. There are some binuclear and hyperchromic cells. Usually 5–8 cells under division are observed in the view field (Fig. 1A).

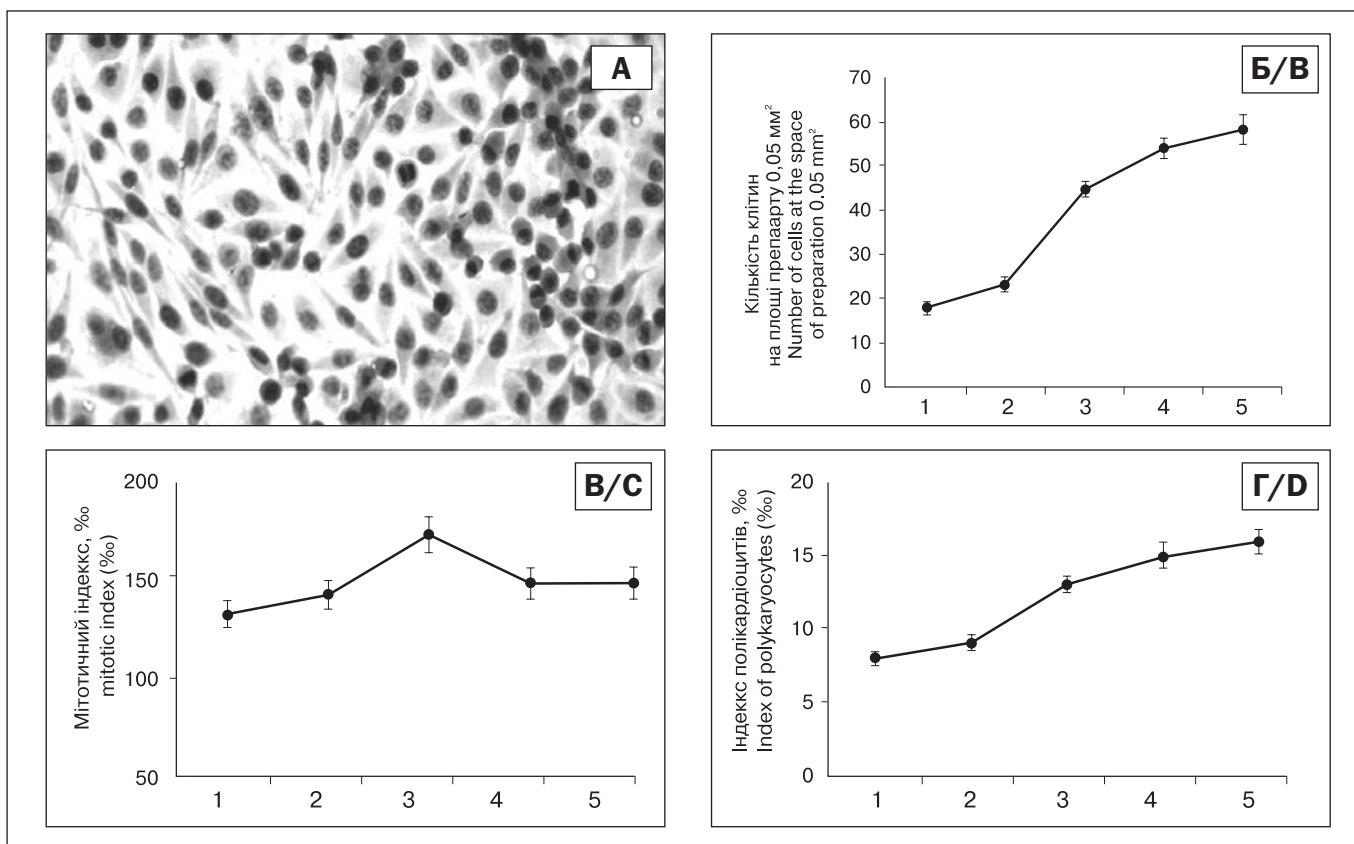


Рисунок 1. Культура інтактних клітин лінії L₉₂₉ на 5-ту добу культивування (А). Форма клітин веретеноподібна та полігональна, овальне ядро з чіткими ядрцями, значна кількість мітотичних клітин. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення x1000. Кінетика росту клітин (Б) оцінювалась за кількістю клітин на площі препарату 0,05 мм², мітотична активність (В) – за мітотичним індексом (‰), кількість атипових багатоядерних клітин (Г) – за індексом полікаріоцитів (‰). На осях абсцис – термін культивування клітин, доба.

Figure 1. Culture of intact L₉₂₉ cells on the 5th day of cultivation (A). Fusiform and polygonal cell form, oval nucleus with distinct nucleolus, a large number of mitotic cells. Coloration with hematoxylin and eosin. Enlargement x1000. Kinetics of cell growth (B) was assessed by the number of cells per 0.05 mm² area of the specimen, mitotic activity (B) – by mitotic index (‰), number of atypical polynuclear cells (D) – by polykaryocytes index (‰). Terms of cellular culturing (days) are plotted along the X-axis.

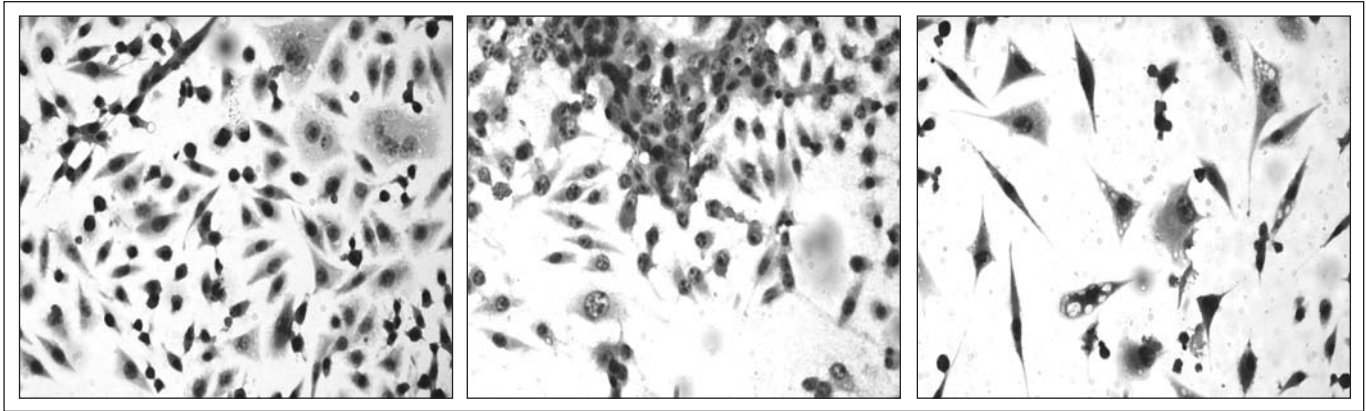


Рисунок 2. Культура клітин лінії L_{929} на 5-ту добу культивування при інкубації з іонами нікелю в концентраціях 0,01 мкмоль/л (А), 0,1 мкмоль/л (Б), 1,0 мкмоль/л (В). Клітини переважно полігональної форми, рідше – веретеноподібні, ядра – овальні, гіперхромні. Цитоплазма клітин переважно гомогенна, при підвищенні концентрації нікелю – вакуолізована. У полі зору 2–3 гігантських полікаріоцити з вакуолізованою цитоплазмою. Спостерігаються мітотичні та апоптотичні клітини. Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 1000$.

Figure 2. Culture of L_{929} cells on the 5th day of cultivation when incubated with nickel ions at concentrations of 0.01 $\mu\text{mol/L}$ (A), 0.1 $\mu\text{mol/L}$ (B), 1 $\mu\text{mol/L}$ (C). Cells are mainly of polygonal shape, more rarely – fusiform, with oval, hyperchromic nuclei. Cells cytoplasm is mostly homogeneous, but vacuolated in higher nickel concentration. The 2–3 giant polykaryocytes with vacuolated cytoplasm are observed in a visual field. Mitotic and apoptotic cells are present. Staining with hematoxylin and eosin, magnification $\times 1000$.

Дослідження кінетики росту контрольних культур клітин (рис. 1, Б) показало, що для них характерне збільшення проліферативної активності впродовж 1–4-ї діб культивування (фаза логарифмічного росту) з поступовим виходом на плато на 5–6-ту добу (фаза стаціонарного росту). У ці терміни щільність моношару клітин досить висока. Максимум мітотичної активності спостерігався на 3-ю добу культивування (рис. 1, В). У подальшому мітотичний індекс зменшувався за рахунок контактного інгібування мітозу та конфлуентного стану культури клітин. Індекс гігантських полікаріоцитів в інтактному контролі становив 8–17 % (рис. 1, Г).

Інкубація клітин з іонами нікелю в різних концентраціях (рис. 2, А–В) викликала в культурі клітин істотні зміни морфофункціональних характеристик: зменшення щільності клітинної популяції, зміну форми клітин, нерівномірний розподіл їх на скляній підложці, скупчення, зменшення кількості цитоплазми, її вакуолізацію, примембранне розміщення ядер, появу значної кількості багатоядерних та апоптотичних клітин. Дослідження кінетики росту, проліферативної та мітотичної активності клітин в культурі за умов інкубації з іонами нікелю (рис. 3, А–В) показали, що при підвищенні концентрації до 10 мкмоль/л щільність клітинної популяції зменшується майже втричі. За даними [41, 42], одноденна інкубація клітин з іонами нікелю в концент-

Study of growth kinetics of the control cell cultures (Fig. 1B) showed that they are characterized by increased proliferative activity during the 1st–4th day of cultivation (logarithmic growth phase) with a gradual plateau release on the 5th–6th day (stationary growth phase). In these terms the monolayer cell density is high enough. Maximum mitotic activity was observed on the third day of cultivation (Fig. 1B). Subsequently, the mitotic index decreased due to a contact inhibition of mitosis and confluent state of cell culture. Index of giant polykaryocytes in the intact control was 8–17% (Fig. 1D).

Incubation of cells with nickel ions at different concentrations (Fig. 2A–C) has caused significant changes in morphological and functional characteristics of the cell culture i.e. decrease in cell population density, cell shape changes, unequal distribution of them on a glass substrate, clustering, cytoplasm reduction and vacuolation, perimembrane nuclei location, the appearance of a large number of polynucleated and apoptotic cells. Study of growth kinetics, proliferation and mitotic activity of cells in culture under conditions of incubation with nickel ions (Fig. 3A–C) showed that when the concentration is 10 $\mu\text{mol/L}$ the density of cell population decreases by almost three times. According to [41, 42] the one-hour incubation of cells with nickel

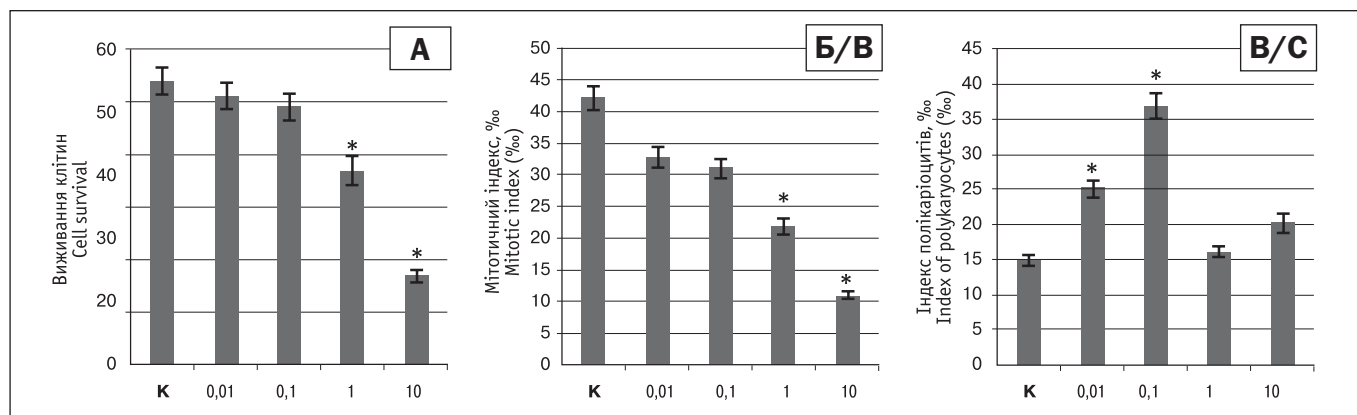


Рисунок 3. Показники життєздатності клітин лінії L₉₂₉ при інкубації їх з іонами нікелю. Виживання клітин (А) оцінювалось за кількістю клітин на площі препарату 0,05 мм² на 5-ту добу культивування, мітотична активність (Б) – за мітотичним індексом (‰), кількість атипичних багатоядерних клітин (В) – за індексом полікаріоцитів (‰). На осях абсцис – концентрація іонів нікелю, мкмоль/л.

Примітка. * – відмінності достовірні порівняно з контролем, p<0,05.

Figure 3. Indicators of L₉₂₉ cells viability when incubated with nickel ions. Cells survival (A) was estimated by the number of cells per 0.05 mm² area of the specimen on the 5th day of cultivation, mitotic activity (B) – by the mitotic index (‰), quantity of atypical polynuclear cells (B) – by the polykaryocyte index (‰). Concentration of nickel ions (μmol/L) is plotted along the X-axis.

Note. * – reliable differences compared with the control, p<0.05.

рації 10 мкг/мл спричиняє затримку їх в лаг-фазі та пригнічення виживання на 5-ту добу культивування до 27 % від контролю.

На нашу думку та за даними [13, 14], нікель пошкоджує систему синтезу ДНК, РНК та затримує клітини в S-фазі поділу. На це вказує індекс полікаріоцитів: при порівняно малих концентраціях кількість полікаріоцитів істотно зростає, а при високих концентраціях загибель клітин відбувається, в основному, в інтерфазі, до першого поділу.

Визначена за концентраційними залежностями середньоефективна концентрація (CE50) для іонів нікелю становила 1,7 мкмоль/л.

Комбінована дія ІВ в малій і сублетальних дозах та іонів нікелю в різних концентраціях на життєздатність клітин представлена на рис. 4. Інкубація клітин з іонами нікелю після опромінення їх ІВ в дозі 0,5 Гр (рис. 4, А) призводить до істотного зменшення (в 1,6 раза) мітотичної активності клітин, а отже і щільності клітинної популяції, у порівнянні з окремим впливом радіації або металу. Тобто, опромінення клітин в присутності іонів нікелю призводить до їх сенсibilізації.

За умов поєднаної дії ІВ в дозі 5 Гр та іонів нікелю (рис. 4, Б) спостерігається лінійна залежність виживання клітин від концентрації металу. При цьому зростає кількість полікаріоцитів у культурі клітин в 2–5 разів у порівнянні з інтактним контролем.

ions at a concentration of 10 mg/mL causes a delay in the lag phase and inhibition of survival on the fifth day of cultivation for 27% relatively to control.

In our opinion and according to [13, 14] the nickel damages system of DNA and RNA synthesis and suspend the cells in S-phase of division. This is indicated by the index of polykaryocytes: at relatively low concentrations the index increases significantly, and at high concentrations, cell death occurs mainly in interphase before the first division.

The average effective concentration (AE50) for nickel ions was 1.7 μmol/L (determined by the concentration dependence).

Combined effect of IR in low and sublethal doses and nickel ions in different concentrations on the cells viability is shown in Figure 4. Incubation of cells with nickel ions after irradiation of at a dose of 0.5 Gy (Fig. 4A) leads to a significant decrease (1.6-fold) of cell mitotic activity, and hence the density of the cell population, compared to the individual exposure to radiation or metal. Thus, exposure of cells in the presence of nickel ions leads to their sensitization.

Under the combined effects of IR at a dose of 5 Gy and nickel ions (Fig. 4B) there is a linear dependence of cell survival on the concentration of the metal. This increases the number of polykaryocytes in cell culture 2–5 times as compared with intact controls.

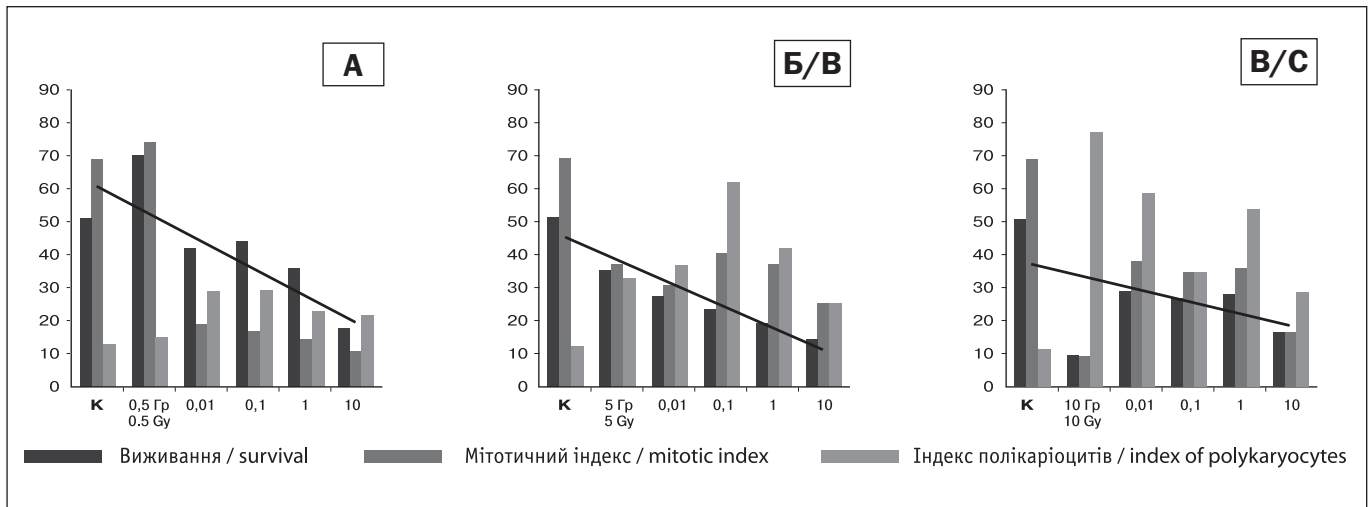


Рисунок 4. Морфофункціональні зміни клітин лінії L₉₂₉ при комбінованій дії іонізуючого випромінювання та іонів нікелю в різних концентраціях (мкмоль/л): А – після опромінення в дозі 0,5 Гр, Б – після опромінення в дозі 5 Гр, В – після опромінення в дозі 10 Гр.

Figure 4. Morphofunctional changes in L₉₂₉ cells under combined action of ionizing radiation and nickel ions in different concentrations (μmol/L): А – after irradiation at a dose of 0.5 Gy, В – after irradiation at a dose of 5 Gy, В – after irradiation at a dose of 10 Gy.

Непередбачуваними виявились результати досліджень за умов поєданого впливу ІВ в сублетальній дозі 10 Гр та різних концентрацій іонів нікелю (рис. 4, В).

Відомо, що опромінення клітин лінії L₉₂₉ в дозі 10 Гр спричиняє 80 % загибелі клітин. Додавання до клітин іонів нікелю підвищує їх виживання в 1,7–2,9 раза (в залежності від концентрації металу) і майже в 3,5 раза зростає мітотичний індекс. Водночас кількість багатоядерних клітин залишається на досить високому рівні. Згідно з даними літератури, іони нікелю затримують клітини в S-фазі мітотичного циклу. За цей час, можливо, й відбувається репарація ДНК в опромінених у сублетальній дозі клітинах, що підвищує їх шанси на виживання.

Основна функція апоптозу – своєрідна клітинна селекція, тобто вилучення із популяції клітин з мутаціями чи іншими явними чи прихованими пошкодженнями.

Загальновідомо, що ІВ є індуктором апоптозу. Інкубація клітин з іонами нікелю теж підвищує кількість апоптотичних клітин в культурі (рис. 5), причому їх кількість збільшена в 3 рази при застосуванні найменшої концентрації нікелю – 0,01 мкмоль/л і в 2 рази – при всіх інших концентраціях металу.

При додаванні різної кількості іонів нікелю рівень апоптозу має тенденцію до зростання при опроміненні клітин ІВ в дозі 0,5 Гр та статистично достовірно ($p < 0,05$) зростає від 2 до 8 разів після опромінення клітин ІВ в дозах 5 та 10 Гр.

Unpredictable results of studies under conditions of combined exposure to sublethal doses 10 Gy of IR and different concentrations of nickel ions (Fig. 4B) were shown.

It is known that exposure of L₉₂₉ cells at a dose of 10 Gy leads to the 80% cell death. Adding nickel ion to the cells increases their survival by 1.7–2.9 times (depending on the metal concentration) and mitotic index almost in 3.5 times. However, the number of polynuclear cells remains at a high level. According to the literature data the nickel ions suspend the cells in S-phase of the mitotic cycle. During this time, perhaps, DNA repair takes place in irradiated at sublethal dose cells, which increases their chances to survive.

The main function of apoptosis resides in a cell selection, i.e. removal from population of cells with mutations or other overt or hidden damage.

It is well known that IR is an apoptosis inducer. Incubation of cells with nickel ions also increases the number of apoptotic cells in a culture (Fig. 5), and their number increases by 3 times when using the lowest concentration of nickel – 0.01 μmol/L and 2 times – at all other concentrations of the metal.

By adding different amounts of nickel ions to the cell culture the apoptosis rate tends to increase when irradiated at a 0.5 Gy dose and statistically significantly ($p < 0.05$) increases from 2 to 8 times after irradiation at 5 and 10 Gy doses.

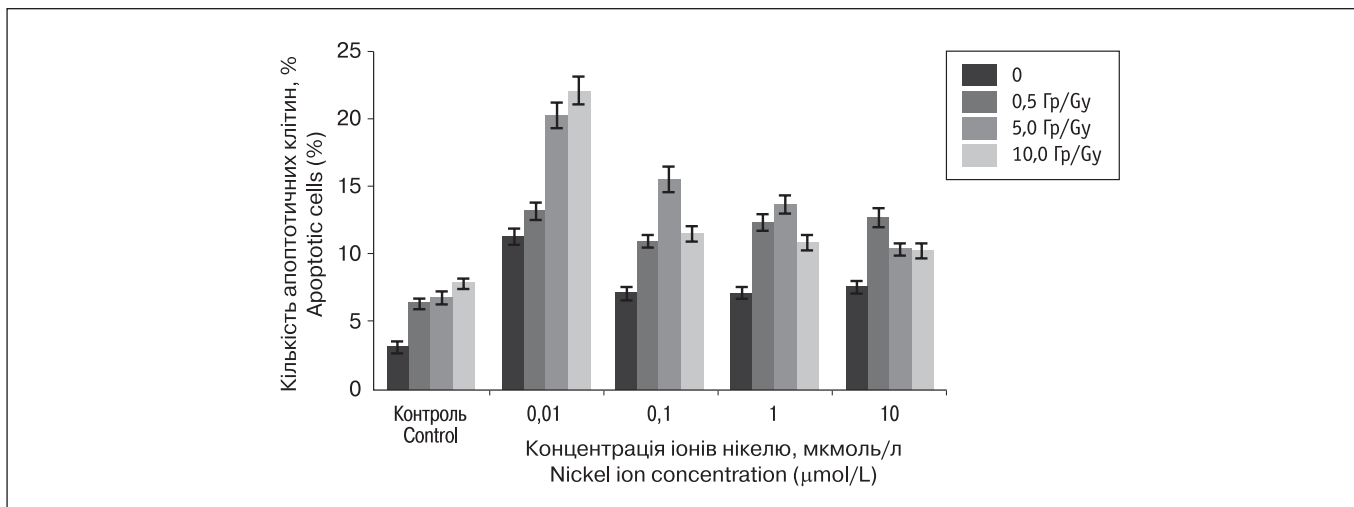


Рисунок 5. Залежність кількості апоптотичних клітин у культурі клітин лінії L₉₂₉ за комбінованого впливу іонізуючого випромінювання в різних дозах та іонів нікелю в різних концентраціях.

Figure 5. Dependence of the number of apoptotic cells in cell culture L₉₂₉ under the combined effects of ionizing radiation in different doses and nickel ions in different concentrations.

ВИСНОВКИ

В результаті роботи було встановлено, що іони нікелю проявляють цитотоксичну дію на клітини *in vitro*: при збільшенні концентрації елемента зростала загибель клітин, пригнічувалась їх проліферативна та мітотична активність. Причому, за низьких концентрацій (0,01–0,1 мкмоль/л) зростала кількість атипівих полікаріоцитів та рівень апоптозу в культурі клітин. При підвищенні концентрації іонів нікелю загибель клітин відбувалась через апоптоз та некроз. При поєднанні радіації та іонів нікелю спостерігали нелінійні клітинні відповіді: при малих дозах радіації (0,5 Гр) відмічали сенсibiliзацію клітин іонами нікелю до опромінення, а при сублетальних дозах (10 Гр) – певний радіозахист. Кількість апоптотичних клітин за цих умов статистично достовірно вища порівняно з контролем.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Скальный А. В. Микроэлементозы человека: гигиеническая диагностика и коррекция / А. В. Скальный // Микроэлементы в медицине.- 2000. – Т. 1, № 1. – С. 2–8.
2. Trakhtenberg I. The ecologic consequences of the Chernobyl disaster: radiation and lead / I. Trakhtenberg, N. Ivanitskaya, Yu. Talakin // Frezenius Envir. Bull. – 1995. – Vol 4. – P. 597–602.
3. Мадонова Ю. Б. Хромосомные нарушения, индуцированные солями тяжелых металлов *in vitro* у населения, проживающего на территориях с повышенной радиационной нагрузкой / Ю. Б. Мадонова, В. А. Трофимов // Успехи совр. естествознания. – 2006. – № 12. – С. 58–59.
4. Трахтенберг И. М. Токсикология в реалиях времени [Электронный ресурс] / И. М. Трахтенберг, Ю. Б. Виленский. – Режим доступа : <http://health-ua.com/articles/866.html>.

CONCLUSIONS

As a result it was found that the nickel ions exhibit cytotoxic effects on cells *in vitro*: an increase in the concentration of the element caused the cell death intensification with proliferative and mitotic activity decrease. Moreover, at a low concentrations (0.01–0.1 μmol/L) the number of atypical polykaryocytes increased as well as the level of apoptosis in cell culture. When nickel ions concentration increased the cell death took place through apoptosis and necrosis. Under the combined influence of radiation and nickel ions the nonlinear cellular responses were observed: under the low-dose radiation (0.5 Gy) the sensitization of cells to radiation was noted, and the sublethal doses (10 Gy) caused a particular radioprotection. Number of apoptotic cells under these conditions was significantly higher compared to controls.

REFERENCES

1. Skalny AV. [Microelementoses of human: hygienic diagnosis and correction]. Mikroelementy v meditsine. 2000;1(1):2–8. Russian.
2. Trakhtenberg I, Ivanitskaya N, Talakin Y. The ecologic consequences of the Chernobyl disaster: radiation and lead. Frezenius Envir Bull. 1995;4:597–602.
3. Madonova YuB, Trofimov VA. [Chromosomal disorders induced by heavy metal salts *in vitro* of the population living in areas with high radiation burden]. Uspekhi sovremennogo estestvoznania. 2006;(12):58-9. Russian.
4. Trachtenberg IM, Wilensky YB. [Toxicology in the realities of the time] [Internet]. Available from: <http://health-ua.com/articles/866.html>. Russian.

5. Комарова Л. Ингибирование восстановления клеток после комбинированного действия различных факторов реализуется через образование необратимых повреждений / Л. Комарова // Актуальные вопросы генетики, радиобиологии и радиэкологии : 2 Чтения, посвященные памяти В. И. Корогодина и В. А. Шевченко, Дубна – Москва, 12–13 янв., 2009 : материалы, тезисы, доклады. – Дубна : [б. и.], 2008. – С. 66.
6. Пчеловская С. А. Оценка синергизма комбинированного действия радионуклидов и тяжелых металлов / С. А. Пчеловская, Ю. А. Кутлахмедов // Радіобіологічні ефекти: ризику, мінімізація, прогноз : матеріали міжнар. конф. – К. : [б. в.], 2005. – С. 141.
7. Поєднаний вплив важких металів та іонізуючого опромінення низької інтенсивності на рівень ферментативного антиоксидантного захисту клітин / О. В. Севериновська, А. І. Дворецкий, О. Г. Єгорова, О. Ю. Зайченко // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. – 2003. – Вип. 9. – С. 115–119.
8. Особливості радіаційно-індукованих ефектів в організмі експериментальних тварин в умовах поєднаного зовнішнього і внутрішнього опромінення в малих дозах / В. В. Талько, Н. П. Атаманюк, Л. П. Дерев'яно [та ін.] // Медичні наслідки Чорнобильської катастрофи: 1986 – 2011 / за ред. А. М. Сердюка, В. Г. Бебешка, Д. А. Базики. – Тернопіль : ТДМУ, 2011. – С. 899–915.
9. Осипов А. Н. Молекулярные и цитогенетические эффекты в клетках системы крови млекопитающих при длительном воздействии низкоинтенсивного ионизирующего излучения и тяжелых металлов / А. Н. Осипов : автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2004. – 41 с.
10. Переваги методу дослідження токсичного впливу сполук важких металів в культурі клітин людини *in vitro* порівняно з традиційним методом *in vivo* на тваринах як більш достовірного та адекватного / І. М. Трахтенберг, М. Л. Марченко, Н. О. Безденєжних, Ю. Й. Кудрявцев // Сучасні проблеми токсикології. – 2010. – № 23. – С. 69–72.
11. L-929 (NCTC-klone929, CloneofstrainL) (Connective tissue, mouse) [Electronic resource]. – Mode of access : <http://www.viomed.com/services/product/l929.htm>. (21 грудня) 2009
12. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / под ред. Л. П. Дьяконова. – М. : Спутник+, 2009. – 656 с.
13. Яковлева М. Н. Генотоксические эффекты соединений никеля и возможности модификации никель-индуцированного мутагенеза в клетках человека / М. Н. Яковлева, Е. В. Перминова // Токсикол. вестн. – 2007. – № 4. – С. 19–22.
14. Cavani A. Breaking tolerance to nickel / A.Cavani // Toxicology. – 2005. – Vol. 209, No. 2. – P. 119–121.
5. Komarova L. [Inhibition of cell recovery after the combined action of various factors is realized through the formation of permanent damage]. In: Actual issues of genetics, the radiobiology and radioecology; 2 Readings dedicated to the memory of VI Korogodin and VA Shevchenko: materials, theses and reports; 2009 Jan 12–13; Dubna – Moscow, Russia. Дубна; 2008. p. 66. Russian.
6. Pchelovskaya SA, Kutlakhmedov Yu.A. [Evaluation of synergism of the combined action of radionuclides and heavy metals]. Radiobiological effects: risk, minimization, forecast. Proceedings of the International conference; 2005; Kyiv, Ukraine. Kyiv; 2005. p. 141. Russian.
7. Severynovska AV, Dvoretzky AI, Egorova OG, Zaychenko OYu. [Combined effects of heavy metals and ionizing radiation of low intensity at the level of enzymatic antioxidant defense of cells]. Problemy radiatsiinoi medytsyny ta radiobiologii. 2003;(9):115–9. Ukrainian.
8. Talko W, Atamanyuk NP, Derev'yanko LP, Gorchakova LA, Rodionova NK, Yanina AM. [Radiation-induced effects in the body of experimental animals under combined external and internal exposure to low doses]. In: Serdiuk AM, Bebeshko VG, Bazyka DA, editors. [Medical consequences of the Chornobyl catastrophe: 1986-2011]. Ternopil: TDMU, Ukrmedknyha; 2011. p. 899–915. Ukrainian.
9. Osipov AN. [Molecular and cytogenetic effects in the cells of the blood of mammals by prolonged exposure to low-intensity ionizing radiation and heavy metals] [The dissertation abstract of candidate of biological science]. Moskva; 2004. 41 p. Russian.
10. Trachtenberg IM, Marchenko ML, Bezdyenyehzhnyh NO, Kudryavets YuJ. [Advantages of method study toxic effects of heavy metal compounds in the culture of human cells *in vitro* compared to traditional method *in vivo* on animals as a reliable and adequate]. Suchasni problem toksykologii. 2010;(23):69–72. Ukrainian.
11. L-929 (NCTC-klone929, CloneofstrainL) (Connective tissue, mouse) [Internet]. Available from: <http://www.viomed.com/services/product/l929.htm>.
12. Dyakonov LP, editor. [Animal cell (Methods and application in biotechnology)]. Moskva: Sputnik+; 2009. 656 p. Russian.
13. Yakovleva MN, Perminova EV. [Genotoxic effects of nickel compounds and the possibility of modifying the nickel-induced mutagenesis in human cells]. Toksikologicheskii vestnik. 2007;(4):19–22. Russian.
14. Cavani A. Breaking tolerance to nickel. Toxicology. 2005; 209(2):119–21.

Стаття надійшла до редакції 22.08.2013

Received: 22.08.2013