

УДК 612.014.48+546.3:576.53+576.353

Д. Д. Гапеенко¹✉, Г. И. Лавренчук¹, В. С. Асмолкова², В. Н. Оксамитный¹

¹Государственное учреждение “Национальный научный центр радиационной медицины Национальной академии медицинских наук Украины”, ул. Мельникова, 53, г. Киев, 04050, Украина

²Институт биохимии им. О. В. Палладина Национальной академии наук Украины, ул. Леонтовича, 9, г. Киев, 01601, Украина

ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ИОНОВ МЕДИ

Целью работы стало исследование особенностей отдельного и комбинированного действия ионизирующего излучения и солей меди на жизнеспособность клеток *in vitro*.

Материалы и методы. Исследования выполнены на перевиваемой культуре клеток линии L₉₂₉. Ионы меди в разных концентрациях добавляли в культуральную среду через 1 час после их облучения в дозах 0,5; 5,0 и 10,0 Гр. Оценивали структуру популяции клеток, их пролиферативную и митотическую активность, апоптоз.

Результаты исследований и выводы. При инкубации клеток с ионами меди в различных концентрациях наблюдали как активацию, так и ингибирование пролиферативной и митотической активности клеток. Выживание клеток и митотическая активность при облучении уменьшаются с увеличением дозы, а индекс поликариоцитов растет. При комбинированном действии ионизирующего излучения и ионов меди на клетки *in vitro* наблюдали изменения морфофункциональных свойств клеток, которые прямо пропорционально не зависели ни от дозы, ни от концентрации ионов меди.

Ключевые слова: тяжелые металлы, ионизирующее излучение, культура клеток, выживание, пролиферация, апоптоз.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2014. Вип. 19. С. 398–406.

D. D. Hapeienko¹✉, H. I. Lavrenchuk¹, V. S. Asmolkova², V. N. Oksamytnyi¹

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, Leontovych str, 9, Kyiv, 01601, Ukraine

Features of biological effects in cell culture in the combined exposure to ionizing radiation and copper ions

The **objective** of the work was to research the features of mono- and combined impact of ionizing radiation and copper salts on cell viability *in vitro*.

Materials and methods. The studies were performed on a passaged line L₉₂₉ cell culture. Copper ions of different concentrations were added to the culture medium 1 hour after exposure to irradiation at doses of 0.5; 5.0 and 10.0 Gy. There were evaluated the structure of the cell populations, the proliferative and mitotic activity and apoptosis.

Results and conclusions. After incubation of the cells with copper ions of various concentrations there were seen both the activation and inhibition of proliferative and mitotic activity. Cell survival and mitotic activity were decreased in exposure to increasing doses of radiation but the polykaryocyte index was increased. After the combined *in vitro* exposure to ionizing radiation and copper ions there were seen morphofunctional changes of cell properties, which were not in direct proportional dependence on the dose or the copper ions concentration.

Key words: heavy metals, ionizing radiation, cell culture, survival, proliferation, apoptosis.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2013;18:398-406.

✉ Гапеенко Дарья Дмитриевна, e-mail: pradacafe@me.com

Постоянный рост масштабов использования химических веществ и источников ионизирующего излучения (ИИ) в различных отраслях промышленности, медицине, науке увеличивает их влияние на все компоненты природной среды [1, 2]. Поэтому возрастает вероятность одновременного воздействия радиационного и химического факторов на биологические объекты, а в связи с этим вопрос особенностей комбинированного действия различных по своей природе факторов становится все более актуальным [3–6]. Наряду с традиционными экспериментами на лабораторных животных, разрабатываются альтернативные методы оценки токсичности ксенобиотиков с использованием культуры клеток. Именно в клетках формируется основа нарушений, которые позже проявляются в виде различных патологических изменений на уровне органов и систем организма [7–9]. Наиболее часто встречаются данные о том, что сочетанное действие радиации и тяжелых металлов (ТМ) приводит к усилению негативного влияния этих факторов на биологические объекты, по сравнению с отдельным воздействием каждого из них [8].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Цель работы состояла в исследовании особенностей отдельного и комбинированного воздействия ионизирующего излучения и соединений меди на морфофункциональные свойства клеток *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования выполнены на культуре клеток линии L₉₂₉. Культивирование клеток осуществляли в полной питательной среде RPMI-1640 (90 %), эмбриональной телячьей сыворотки (10 %) и 40 мкг/мл гентамицина согласно стандартным методам работы с клеточными штаммами [10]. Клетки выращивали при постоянной температуре 37 °C на покровных стеклах размерами 16 × 8 мм, находящихся на дне стеклянных флакончиков, до конфлуентного состояния монослоя (1–5 суток).

В исследованиях была использована водорастворимая соль ацетата меди (Cu(CH₃COOH)₂). Контролем на ацетат-анион был ацетат натрия (NaCH₃COOH). Ионы меди добавляли в культуральную среду через 24 часа после посадки клеток (чтобы ионы ТМ не влияли на адгезию и распластывание клеток на стеклянной подложке) в виде водного раствора в концентрациях 0,01; 0,10; 1,00 и 10,00 мкмоль/л. Культивирование клеток проводили в течение 5 суток в присутствии ионов меди.

Облучение культуры клеток ИИ осуществляли на аппарате “Тератрон” (источник – ⁶⁰Co 1,2 МэВ,

Continued growth in the use of chemical substances and sources of ionizing radiation (IR) in various industries, medicine and science increases their impact on all components of the environment [1, 2]. Therefore, the probability of simultaneous exposure of biological objects to radiation and chemical factors is increasing and the related issue of the features of combined exposure to intrinsically different factors is becoming more relevant [3–6]. Along with traditional experiments on laboratory animals there are being developed some alternative methods of estimating the toxicity of xenobiotics using cell culture. They are the cells where the basis of violations is formed. The violations later result in a variety of pathological changes at organ and system levels [7–9]. The most frequent are reports about the combined exposure to irradiation and heavy metal (HM) leading to enhanced negative influence of these factors on biological objects compared with monoexposure to each of them [8].

OBJECTIVE

To study morphofunctional properties of the cells exposed to mono- and combined impact of ionizing radiation and copper compounds *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Experimental studies were performed on line L₉₂₉ cell culture. The cells were cultured in the medium consisting of RPMI-1640 medium (90%), fetal calf serum (10 %) and antibiotics according to the standard methods of treating cell strains [7]. They were cultivated at the constant temperature of 37 °C on coverslips (16 × 8 mm) left at the bottom of the glass vial to the confluent state of the monolayer (1–5 days).

In the studies there was used a water-soluble salt of copper acetate (Cu(CH₃COOH)₂). Sodium acetate (NaCH₃COOH) served as the control for acetate anion. The copper ions were added to the culture medium 24 hours after cell passaging (to prevent HM ions influence on cell adhesion and cell spreading over a glass substrate) as an aqueous solution at concentrations of 0.01; 0.10; 1 and 10.00 μmol/l. The cells were cultured for 5 days in the presence of copper ions.

The cell cultures were exposed to ionizing radiation using “Teratron” device (source – ⁶⁰Co 1.2 MeV,

мощность экспозиционной дозы $4,3 \times 10^{-4}$ Кл/(кг × с) расстояние до объекта 80 см) в дозах 0,5; 5,0 и 10,0 Гр через 24 часа после посадки. Ионы меди добавляли в культуры клеток через 1 час после их облучения.

Пролиферативную активность клеток оценивали по кинетике роста: под оптическим микроскопом “Axioscop” (West Germany) при увеличении в 1000 раз в пределах сетки площадью 0,05 мм² подсчитывали общее количество клеток, количество митозов и количество многоядерных (2 и более ядер) клеток. Митотический индекс и индекс поликариоцитов рассчитывались на 1 000 клеток (%). Фото получены с помощью цифровой камеры DIGITAL CAMERA for Microscope ScienceLab DCM320(USB 2.0), Resolution 3.5 Mpixels.

В тех же культурах клеток, в которых исследовали показатели их жизнеспособности, определяли количество апоптических клеток. Анализ проводили на проточном цитофлюориметре FACStar Plus фирмы “Becton Dickinson” (США) [11, 12]. Апоптоз фиксировали по гиподиплоидному ДНК-пику, который четко отделялся от нормального (диплоидного) ДНК-пика. Оценивали красную флуоресценцию (FL – 2) пропидиум йодида с длиной волны λ 595 нм не менее, чем для 10 000 клеток.

Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми статистическими методами с использованием t-критерия Стьюдента и с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel и Biostat.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования проводили на модели permanently proliferating cells – линия L₉₂₉. В контроле клетки образовывали плотный монослой из типичных фибробластоподобных клеток веретеновидной и полигональной формы. Большинство клеток имели отростки. Цитоплазма этих клеток содержала светлые вакуоли и маленькие гранулы. Ядра клеток относительно большие, встречались двух- и трехядерные клетки. В поле зрения видны клетки на разных стадиях деления (рис. 1, А).

Исследование кинетики роста контрольных культур клеток (рис. 1, Б) показало, что для них характерно увеличение пролиферативной активности в течение 1–5 суток культивирования (фаза логарифмического роста). В это время плотность монослоя клеток достаточно высокая. Максимум митотической активности наблюдался на третьи сутки культивирования. В дальнейшем митотический индекс уменьшался за счет контактного ингибирования митоза и конфлюентного состояния культуры клеток. Индекс гигантских многоядерных клеток в контроле составлял 9–17 %.

the exposure dose – 4.3×10^{-4} C / (kg × sec) the object distance – 80 cm) at doses of 0.5; 5.0; 10.0 Gy 24 hours after passaging. Copper ions were added to the cell cultures 1 hour after irradiation.

The proliferative activity of the cells was evaluated by the growth kinetics: total cell number as well as number of mitosis and multinucleated (two or more nuclei) cells were counted under “Axioscop” optical microscope (West Germany) at x 1,000 magnification using a 0.01 mm² grid. The mitotic and polykaryocyte indices were calculated per 1000 cells (%). Photo images were taken at the DIGITAL CAMERA for Microscope ScienceLab DCM320(USB 2.0), Resolution 3.5 Mpixels.

The number of apoptotic cells was determined in the cell cultures investigated for the viability. The analysis was performed by flow cytometry on FACStar Plus (Becton Dickinson, USA) [11, 12]. Apoptosis was fixed by hypodiploid DNA peak, which was clearly separated from normal (diploid) DNA peak. The red fluorescence (FL - 2) of propidium iodide with a wavelength of λ 595 nm was assayed for at least 10,000 cells.

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

RESULTS AND DISCUSSION

The investigations were carried out on the model of permanently proliferating cells – line L₉₂₉. Control cells formed a dense monolayer of typical fibroblast-like, spindle- and polygonal-shaped cells. Most cells had processes. The cytoplasm of the cells contained light vacuoles and small granules. The cell nuclei were relatively large; there were seen bi- and trinuclear cells. In the field of view there were cells at different stages of division. (Fig. 1, A).

Investigation of the growth kinetics in control cell cultures (Fig. 1, B) shows that they are characterized by an increase in proliferative activity within 1–5 days of culturing (logarithmic growth phase). At this time, the density of the cell monolayer is quite high. Maximum mitotic activity is seen on the third day of cultivation. Later, the mitotic index decreases due to contact inhibition of mitosis and confluent state of the cell culture. Giant multinucleated cells index is 9–24 % in the control.

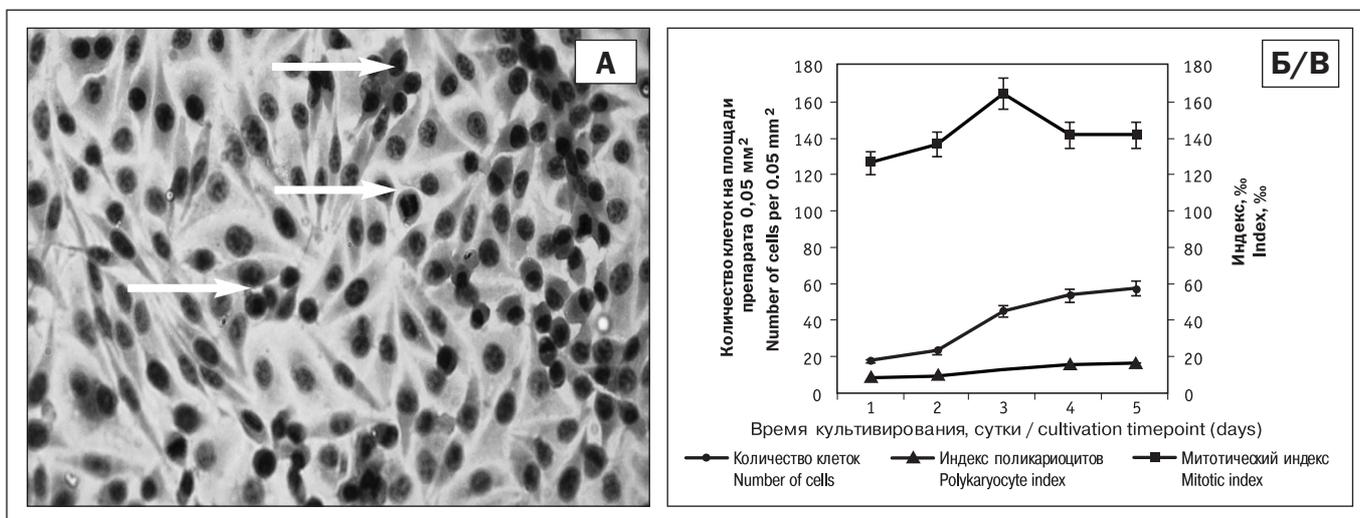


Рисунок 1. Культура клеток линии L929 в контроле.

А – 5-е сутки культивирования. Форма клеток веретеновидная и полигональная, овальное ядро с четкими ядрышками, значительное количество митотических клеток (белые стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 1000$. Кинетика роста интактных клеток (**Б**).

Figure 1. Line L929 cell culture in the control.

А – at 5 day of cultivation. The cells are polygonal- and spindle-shaped; the nucleus is oval with distinct nucleoli; there is seen a significant number of mitotic cells (white arrows). H & E stain. $\times 1,000$ magnification. Growth kinetics of intact cells (**В**).

Как известно, медь – один из важнейших незаменимых и эссенциальных элементов, необходимых для организма [1, 13]. Недостаточное количество меди может нарушить баланс практически всех обменных процессов в организме, поскольку она участвует в биохимических процессах как составная часть электронпереносных белков, осуществляющих реакции окисления органических субстратов молекулярным кислородом, а также в биосинтезе гемоглобина, эластина, каталазы, пероксидазы, необходима для созревания ретикулоцитов в эритроциты. Ионы меди участвуют в процессах транспорта аминокислот и таким образом влияют на скорость белкового обмена. К появлению избытка Cu^{2+} приводят нарушения выделительной функции лизосом в результате дефектов мембран или цитоскелета. Следует отметить, что любая задержка выделения меди из клетки приводит к индукции биосинтеза металлотioneинов, повреждению мембраны и цитоскелета, что в свою очередь сопровождается накоплением Cu^{2+} в клетке.

Инкубация клеток с ионами меди различной концентрации (рис. 2, А–Г) вызвала изменения их морфофункциональных характеристик. Статистически достоверное уменьшение плотности клеточной популяции и, соответственно, выживаемости клеток наблюдали при концентрациях ионов меди 1,00 и 10,00 мкмоль/л. В то же время инкубация клеток с ионами меди вызывала статистически достоверную

Copper is known to be one of the most important essential elements necessary for the body [1]. Insufficient amount of copper can disrupt the balance of virtually all metabolic processes in the body, as it is involved in the biochemical processes as part of electron-transferring proteins enabling the oxidation of organic substrates with molecular oxygen, as well as in the biosynthesis of hemoglobin, elastin, catalase, peroxidase required for maturation of reticulocytes to erythrocytes. Copper ions are involved in amino acids transportation and thus influence the rate of protein metabolism. Excess of Cu^{2+} results from defects in the membrane or cytoskeleton causing violation of excretory function of lysosomes. It should be noted that any delay in the release of copper from cells results in the induction of metallothioneins biosynthesis, damage to the membrane and cytoskeleton, which, in turn, is accompanied by accumulation of Cu^{2+} in cells.

Incubation of cells at various concentrations of copper ions (Fig. 2, A–D) caused changes of the morphological and functional characteristics. Statistically significant decreased cell density of the population and, respectively, cell survival were seen at copper ions concentrations of 1 and 10 $\mu\text{mol/l}$. At the same time, incubation of the cells with copper ions caused a statistically significant

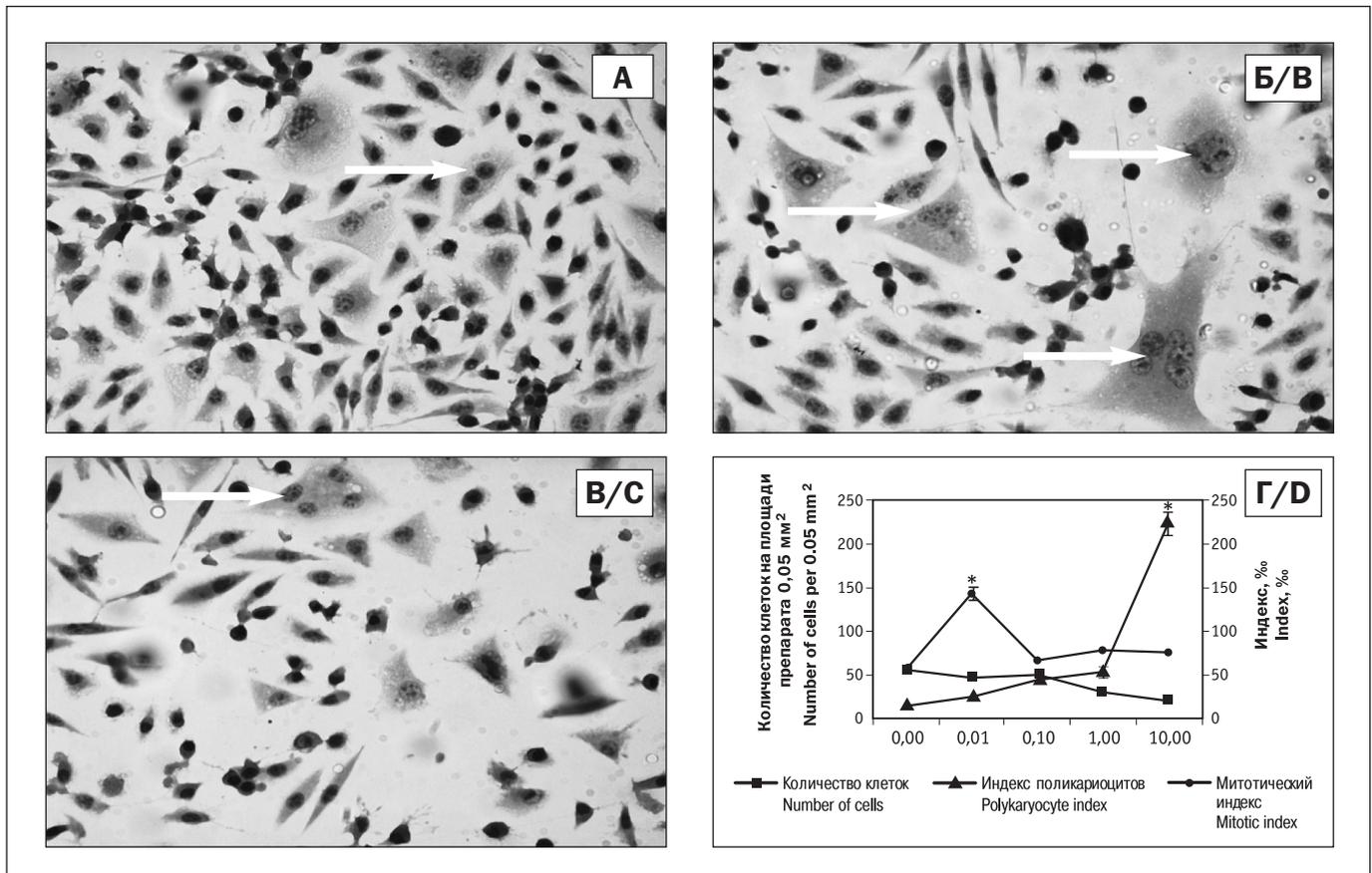


Рисунок 2. Культура кліток лінії L₉₂₉ на 5-е сутки культивування при інкубації з іонами міді в концентраціях 0,01 мкмоль/л (А), 1,00 мкмоль/л (Б), 10,00 мкмоль/л (В). Клітки переважно полігональної форми, рідше – веретеновидної, ядра – овальні, стрілками обозначены гігантські мно-гоядерні клітки. Окраска гематоксилином і еозином, збільшення ×1000. Показатели життєспроможності кліток при впливі іонів міді (Г). На осі абсцисс – концентрація мікроелемента, мкмоль/л. Примечание. * – статистично достовірне відхилення від контролю, $p \leq 0,05$.

Figure 2. CLine L₉₂₉ cell culture on the 5th day of cultivation after incubation with copper ions at the concentration of 0.01 μmol/L (A), 1 μmol/L (B), 10 μmol/L (C). The cells are predominantly polygonal-shaped, rarely – spindle-shaped, the nucleus is oval, the arrows show giant multinucleated cells. H & E stain, ×1,000 magnification. Cell viability indices when exposed to copper ions (D). On the x-axis there is shown the concentration of the trace element (μmol/L).

Note. * – significant difference vs. control, $p \leq 0.05$.

стимуляцію мітотическої активності, яка збільшилась в 3 рази по порівнянню з контролем ($p < 0,05$) при концентрації міді 0,01 мкмоль/л. Слідует також відзначити дозозависиме наростання в культурі кліток кількості полікаріоцитів (в 8,5 рази по порівнянню з контролем) в присутстві мікроелемента в кількості 1,00 мкмоль/л, що свідечує про високому генотоксическому впливі іонів міді в цій концентрації.

По результатам експериментальних досліджень була розрахована CE50, яка становила для кліток лінії L₉₂₉ 8,44 мкмоль/л.

Комбіноване діяння облучення в малій (0,5 Гр), середнелетальної (5,0 Гр) і сублетальної (10,0 Гр) дозах і іонів міді в різних концентра-

stimulation of mitotic activity, which was 3-fold increased compared to the control ($p < 0.05$) at copper concentration of 0.01 μmol/l. It is also worth noting dose-dependent increase in polikaryocytes number (by 8.5 times compared to the control) in the presence of 1 μmol/L of the trace element, which is indicative of a high genotoxic effect of copper ions at this concentration.

According to the results of experimental studies there was calculated the average effective concentration (AE50), which amounted to 8.44 μmol/L for the cell line L₉₂₉.

The combined effect of low irradiation (0.5 Gy), average lethal (5.0 Gy) and sublethal (10.0 Gy) doses and different concentrations of copper ions

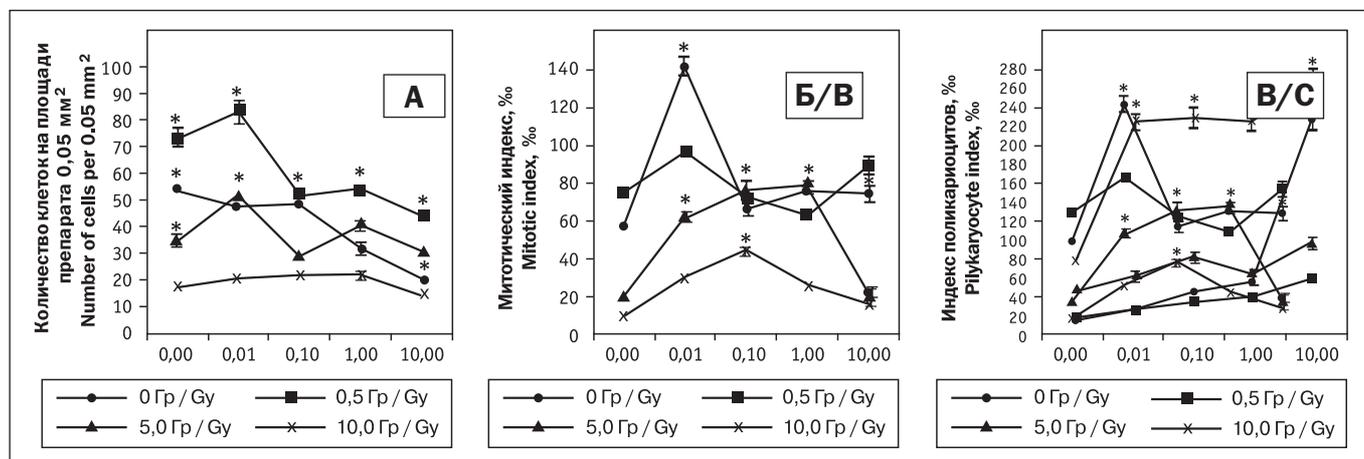


Рисунок 3. Морфофункціональні властивості клітин лінії L929 на 5-е сутки культивування при комбінованому впливі радіації в різних дозах і іонів міді в різних концентраціях. А – кількість клітин, Б – митотична активність і В – кількість многадерних клітин. На осях абсцисс – концентрація іонів міді, мкмоль/л.

Примечание. * – статистически достоверное отличие от контроля, $p \leq 0,05$.

Figure 3. Morphological and functional properties of line L929 cells on the 5th day of culture at the combined exposure to various doses of radiation and copper ions. A – the number of cells, B – mitotic activity, C – the number of multinucleated cells. On the x axes there are shown concentrations of copper ions, $\mu\text{mol/L}$.

Note. * – significant difference vs. control, $p \leq 0.05$.

цях на морфофункціональні властивості клітин представлено на рис. 3, А–В.

Облучение клеток γ -квантами ^{60}Co в дозе 0,5 Гр привело к увеличению количества клеток и их митотической активности. Облучение клеток и инкубация их с ионами меди в концентрации 0,01 мкмоль/л вызвало еще большую активизацию пролиферации клеток в культуре. При дальнейшем увеличении концентрации микроэлемента в питательной среде выживаемость облученных клеток не отличалась от контроля на фоне повышенной митотической активности. Вместе с тем, следует отметить, что индекс поликариоцитов при концентрации 10,00 мкмоль/л был существенно меньше (более чем в три раза) по сравнению с действием только ионов меди. Т. е. облучение в малой дозе как бы снимает токсическое действие избытка ионов меди.

Облучение клеток в дозе 5,0 Гр привело (рис. 3) к ингибированию пролиферативной и митотической активности в 1,7 раза по сравнению с контролем. Добавление в питательную среду ионов меди в концентрации 0,01 и 0,10 мкмоль/л к предварительно облученным в дозе 5,0 Гр клеткам привело к восстановлению показателей жизнедеятельности культур клеток по сравнению с облученными культурами. Повышение содержания ионов меди в среде культивирования до 1,00 и 10,00 мкмоль/л вызвало угнетение пролиферации облученных клеток. Заметно, что при всех концентрациях микроэлемента после облу-

on the morphofunctional cell characteristics is shown in Fig. 3, A–C.

Irradiation of cell by γ -rays of ^{60}Co at a dose of 0.5 Gy led to an increase in cell number and mitotic activity. Irradiation of cells and incubating them with copper ions at a concentration of 0.01 $\mu\text{mol/L}$ caused a greater activation of cell proliferation in the culture. Further increase in the concentration of the trace elements in the medium did not affect survival rate of the irradiated cells which did not differ from controls against the background of increased mitotic activity. However, it should be noted that the index of polikariocytes at a concentration of 10.00 $\mu\text{mol/L}$ was significantly lower (by more than three times) in comparison with monoexposure to copper ions. In other words, low doses of irradiation seem to diminish the toxic effects of copper ions excess.

Irradiation of cells at a dose of 5.0 Gy resulted in inhibition of the proliferative and mitotic activity by 1.7 times compared to the control (Fig. 3). Adding copper ions (0.01 and 0.10 $\mu\text{mol/L}$) to the pre-irradiated cells at of a dose of 5.0 Gy led to restoration of vital signs of the cell cultures compared to irradiated ones. Elevation of copper ions levels in the culture medium to 1.00 and 10.00 $\mu\text{mol/L}$ caused inhibition of irradiated cells proliferation. It is noticeable that at all concentrations of the trace element after irradiation with 5.0 Gy there was seen 2–5-fold increased

чення в дозі 5,0 Гр зростає рівень мнооядерних кліток в 2–5 раз по порівнянню з контролем.

Діяння на клітки γ -радіації в сублетальній дозі 10,0 Гр (рис. 3) викликає угнетення їх виживає-мости і митотическої активності почти на 70 %, кількість полікаріоцитів при цьому збільшувалося в 5 раз по порівнянню з інтактними культурами кліток.

Сочетанне діяння облучення в дозі 10,0 Гр і різних концентрацій іонів міді практически не змінило густоти кліточної популяції і ділення кліток по порівнянню з облученням. Однак образование в культурі атипичних мнооядерних кліток зросло почти в 10 раз, що свідечує про генотоксический вплив радіації і іонів міді.

Общезвестно, що апоптоз при фізіологіческих умовах – це контролюємый процес, направлений на підтримання гомеостазу тканин. Апоптоз ініціюється при діянні екстремальних факторів, таких як іонізуюча радіація [11, 12]. В цьому випадку роль апоптозу в підтриманні гомеостазу тканин являється менше вираженою, однак передполагається, що первоочередное значення приобредает селективне видалення кліток, виживання котрих угрожає для цілого організму.

Исследование біохіміческих механізмів апоптозу на молекулярному рівні показало, що радіація не стільки подавляє проліферацію кліток, скільки селективно діяє на експресію определенных генів, так називаемых генів раннього ответа, котрі відповідають за синтез онкогенів, цитокінів, киназ і других регуляторів проведення сигналів в клітці, а також білків, котрі регулюють проходження клітчного циклу і розвиток апоптозу.

Результати експериментальних досліджень показали, що ІІ індукувало апоптоз в культурі кліток (рис. 4), приче кількість апоптических кліток зростало при підвищенні дози радіації і статистически достовірно відличалося від контролю.

Инкубация кліток з іонами міді викликала статистически достовірно збільшення апоптозу тільки при низких концентраціях – 0,01 і 0,10 мкмоль/л, а при високих концентраціях наблюдалась тільки тенденція к збільшенню. При комбінованному впливі на клітки іонів міді і γ -радіації наблюдали індукцію апоптозу, в основному, при низких концентраціях мікроелемента. При високих концентраціях статистически достовірно збільшення рівня апоптических кліток наблюдали при облученні в дозах 0,5 і 10,0 Гр. Учїтувая то, що Cu^{2+} являється необхідним мікроелементом, такі флуктуації рівня

multinucleated cells level compared to the control.

Exposure of cells to sublethal dose of 10.0 Gy of γ -radiation (Fig. 3) caused inhibition of survival and mitotic activity by almost 70 %, while the number of polikariocytes increased by 5 times compared with intact cell cultures.

The combined exposure to irradiation (10 Gy) and various concentrations of copper ions hardly ever changed density of the cell population and cell division as compared with monoexposure to irradiation. However, the formation of atypical multinucleated cells in the culture increased almost 10-fold, which is indicative of the genotoxic effects of radiation and copper ions.

It is generally known that under physiological conditions apoptosis is a controlled process aimed at maintaining tissue homeostasis. Apoptosis is triggered by the exposure to such extreme factors as ionizing radiation [11, 12]. In this case, the role of apoptosis in the maintenance of tissue homeostasis is less pronounced, but it is assumed that the selective elimination of the cells threatening to the survival of the whole body acquires the highest priority.

Study of the biochemical mechanisms of apoptosis at the molecular level showed that the radiation not only inhibits proliferation of the cells but selectively impacts on the expression of certain genes, the so-called early genes responsible for the synthesis of oncogenes, cytokines, kinases and other regulators of cell signaling, as well as proteins that regulate cell cycle progression and the development of apoptosis.

The results of the experimental studies show that ionizing irradiation induces apoptosis in cultured cells (Fig. 4), the number of apoptotic cells increases with the rise in doses of radiation and is significantly different from the control.

Incubation of the cells with copper ions causes a statistically significant increase in apoptosis only at low concentrations – 0.01 and 0.10 $\mu\text{mol/L}$, whereas at higher concentrations there was seen only a tendency to an increase. Under the combined exposure of the cells to copper ions and γ -rays induction of apoptosis was seen mainly at low concentrations of the trace element. At high concentrations, a statistically significant increase in apoptotic cells was observed upon irradiation at doses of 0.5 Gy and 10.0 Gy. Given that Cu^{2+} is an essential trace mineral, such fluctuations in the level of

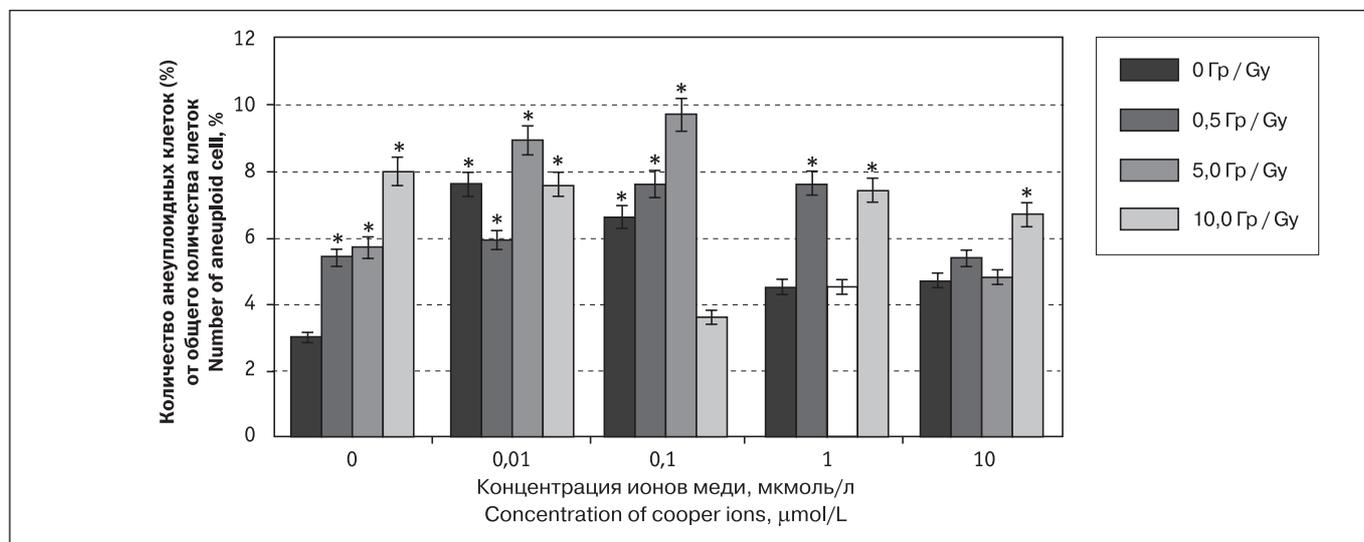


Рисунок 4. Апоптоз в культуре клеток линии L929 на 5-е сутки культивирования при комбинированном действии γ -радиации в разных дозах и ионов меди в различных концентрациях. .

Figure 4. Apoptosis in line L929 cell culture on the 5th day of cultivation under the combined exposure to various doses of γ -radiation and various copper ion concentrations. .

апоптоза в культуре клеток могут свидетельствовать о подключении компенсаторных механизмов, повышающих выживаемость клеток (5,0 Гр) или об альтернативных механизмах гибели клеток (10,0 Гр).

ВЫВОДЫ

Таким образом, экспериментальные исследования цитотоксичности ионов меди и комбинированного их действия с ионизирующим излучением на клетки *in vitro* показали, что инкубация клеток с ионами меди в разной концентрации вызвала разнонаправленные изменения их морфофункциональных характеристик. Комбинированное действие ионизирующего излучения и ионов меди приводило к повышению показателей жизнеспособности клеток в культуре (пролиферативной и митотической активности) по сравнению с отдельным действием радиации, одновременно уровень поликариоцитов оставался на достаточно высоком уровне. Увеличение апоптоза в культуре клеток фиксировали при отдельном и сочетанном действии радиации и ионов меди.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скальный А. В. Микроэлементозы человека: гигиеническая диагностика и коррекция / А. В. Скальный // Микроэлементы в медицине. - 2000. - Т. 1, № 1. - С. 2-8.
2. Ершов Ю. А. Механизмы токсического действия неорганических соединений / Ю. А. Ершов. - М. : Медицина, 1989. - 272 с.
3. Трахтенберг И. М. Приоритетные аспекты проблем медицинской экологии в Украине / И. М. Трахтенберг // Современные проблемы токсикологии. - 1998. - № 1. - С. 5-8.

apoptosis in cultured cells may be indicative of the triggering compensatory mechanisms that enhance cell survival (5.0 Gy) or alternative mechanisms of cell death (10.0 Gy).

CONCLUSIONS

To summarize, the experimental studies of cytotoxicity of copper ions and *in vitro* combined exposure of cells to ionizing radiation showed that incubation of the cells at different concentrations of copper ions caused divergent changes in their morphological and functional characteristics. Combined effects of ionizing radiation and copper ions resulted in the increased rates of cell viability in the culture (proliferative and mitotic activity) as compared with monoexposure to ionizing radiation, simultaneously polikariocyte level remained quite high. Increased apoptosis in cultured cells was seen both in mono- and combined exposure to irradiation and copper ions.

REFERENCES

1. Skalny AV. [Microelementoses of human: hygienic diagnosis and correction]. Mikroelementy v meditsine. 2000;1(1):96. Russian.
2. Ershov YuA. [Mechanisms of toxic action of inorganic compounds]. Moskva: Meditsina; 1989. 272 p. Russian.
3. Trakhtenberg I. [Priority aspects of the problems of medical ecology in Ukraine]. Sovremennyye problemy toksykologii. 1998; (1):5-8. Russian.

4. 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.
5. Свинец и другие тяжелые металлы во внешней среде после Чернобыльской катастрофы (к экологической ситуации в Украине) / И. М. Трахтенберг, В. М. Шестопалов, М. В. Набока, О. А. Бобылева // *Международ. мед. журн.* – 1998. – № 3. – С. 94–98.
6. Valko M. Metals, toxicity and oxidative stress / M. Valko, H. Morris, M. T. Cronin // *Curr. Med.* – 2005. – Vol. 12, No. 10. – P. 1161–1208.
7. 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 современного естествознания.* – 2006. – № 12. – С. 58–59.
8. Поєднаний вплив важких металів та іонізуючого опромінення низької інтенсивності на рівень ферментативного антиоксидантного захисту клітин / О. В. Севериновська, А. І. Дворецький, О. Г. Єгорова, О. Ю. Зайченко // *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології.* – 2003. – Вип. 9 – С. 115–119.
9. Ercal N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage / N. Ercal, H. Gurer-Orhan, N. T. Aykin-Burns // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2001. – Vol. 1, No. 6. – P. 529–539.
10. Животная клетка (методы и применение в биотехнологии) / под общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. – М. : Спутник+, 2009. – 656 с.
11. Riccardo C. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry [Electronic resource] / C. Riccardo, I. Nicoletti. // *Nature protocols.* – 2006. – Vol. 1, no. 3. – Available from : <http://www.nature.com/natureprotocols>. – doi:10.1038/nprot.2006.238.
12. Владимирская Е. Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия / Е. Б. Владимирская // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2002. – № 11. – С. 25–32.
13. Berman E. Toxic metals and their analysis (Heyden International Topics in Science Series) / E. Berman. – London : John Wiley & Sons Canada, Ltd, 1980. – 304 p. – ISBN 047125651X, 9780471256519.
4. Trakhtenberg I, Ivanitskaya N, Talakin Yu. [The ecologic consequences of the Chernobyl disaster: radiation and lead.]. *Frezenius Envir Bull.* 1995; 4: 597-602.
5. Trakhtenberg IM, Shestopalov VM, Naboka MV, Bobyleva OA. [Lead and other heavy metals in the environment after the Chernobyl catastrophe (to the ecological situation in Ukraine)]. *Mezhdunarodnyi meditsinskii zhurnal.* 1998;(3):94-8. Russian.
6. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med.* 2005;12(10):1161-208.
7. Madonova YuB, Trofimov VA. [Chromosomal disorders induced by heavy salts *in vitro* of the population living in areas with high radiation burden]. *Uspekhi sovremennogo estestvoznania.* 2006;(12):58-9. Russian.
8. 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]. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2003;9:115-9. Ukrainian.
9. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem.* 2001;1(6):529-39.
10. Dyakonov LP, editor. [Animal cell (Methods and application in biotechnology)]. Moskva: Sputnik+; 2009. 656 p. Russian.
11. Riccardo C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry [Internet]. Available from: <http://www.nature.com/natureprotocols>.
12. Vladimirskaia EB. [Apoptosis and its role in the regulation of cellular equilibrium]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2002;(11):25-32. Russian.
13. Berman E. Toxic metals and their analysis. London: John Wiley & Sons Canada, Ltd; 1980. 304 p. ISBN 047125651X, 9780471256519.

Стаття надійшла до редакції 15.07.2014

Received: 15.07.2014