

УДК: 577.12:577.112:577.24

**Оцінка цитотоксичності малих концентрацій іонів кадмію на клітини кісткового мозку щурів *in vitro***  
**У Сі, Т.Харченко, К.Кот, Ю.Кот, Є.Перський***Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)*  
*wu.si.biochem2018@gmail.com*

Відомо, що іони кадмію накопичуються в клітинах, призводячи до порушень їх метаболізму. В даній роботі було вивчено вплив малих концентрацій іонів кадмію на культуру клітин кісткового мозку щурів, отриманих з *os femoris*, та оцінено прояви їх цитотоксичності. Для дослідження був обраний діапазон концентрацій іонів кадмію у культуральному середовищі 0,1–10 мкМ/л. Цитотоксичність кадмію оцінювали за ступенем адгезії клітин, їх морфології, щільністю культури, цілісністю мембран клітин, кількістю апоптотичних клітин. Ступінь ушкодження ДНК оцінювали за кількістю клітин з мікроядрами та фрагментацією ядерної ДНК. Показано, що довготривалий вплив іонів кадмію в концентраціях 0,1; 0,5; 1,0 та 10,0 мкМ/л на клітини кісткового мозку *in vitro* несе чіткий цитотоксичний ефект, при цьому ступінь проявів залежить від часу експозиції та концентрації токсиканту. Експозиція з кадмієм у концентраціях 0,1 та 0,5 мкМ/л призводить до невисокого зниження адгезії клітин, не призводить до змін середнього розміру і серйозного пошкодження клітинної мембрани, при цьому збільшується лише кількість клітин, що перебувають на ранній стадії апоптозу (на 11% і 15% при культивуванні клітин у присутності Cd<sup>2+</sup> у концентрації 0,1 і 0,5 мкМ/л відповідно), яка є оборотною і не призводить до фрагментації ядерної ДНК. Експозиція з кадмієм у концентраціях 1,0 та 10,0 мкМ/л призводить до значного зниження адгезії клітин, зменшення середнього розміру клітин у 1,3 і 1,8 разів відповідно, сильного пошкодження клітинної мембрани. Із зростанням концентрації Cd<sup>2+</sup> до 1,0 і 10,0 мкМ/л відбувається зниження кількості клітин з непошкодженою мембраною на 27 і 50% відповідно. При експозиції з Cd<sup>2+</sup> у концентрації 1,0 і 10,0 мкМ/л на 10 і 4 добу спостереження відповідно зростає частка клітин, що перебувають як на ранній, так і на пізній стадіях апоптозу. Вплив іонів кадмію у концентрації 1,0 і 10,0 мкМ/л призводить до суттєвого зростання кількості клітин, що перебувають на необоротній стадії пізнього апоптозу, на 30 добу спостереження. Показано, що довготривалий вплив іонів кадмію в концентраціях 0,5; 1,0 та 10,0 мкМ/л на клітини кісткового мозку *in vitro* має чіткий генотоксичний ефект: зростає кількість мікроядер та ступінь фрагментації ДНК.

**Ключові слова:** кадмій, кістковий мозок, цитотоксичність, генотоксичність, мікроядра, апоптоз, адгезія клітин.

**The cytotoxicity of cadmium ions small doses in culture of rats bone marrow cells****Wu Si, T.Kharchenko, K.Kot, Y.Kot, Ye.Perskyi**

It is known that cadmium ions have the property of accumulating in cells, leading to disturbances in their metabolism. The purpose of this work was to assess the cytotoxicity effects and degree of DNA damage in bone marrow cell culture from the femur of rats during prolonged cultivation in a medium containing small doses of cadmium ions – 0.1; 0.5; 1.0; 10 μM/liter of culture medium. The extent of cell adhesion and their morphology, culture density, cell membrane integrity, and the number of apoptotic cells were analyzed. The extent of DNA damage was assessed by the number of micronuclei, fragmentation of nuclear DNA in cells. It has been shown that prolonged exposure to cadmium ions in concentrations of 0.1; 0.5; 1.0 and 10 μM/L on bone marrow cells *in vitro* has a pronounced cytotoxic effect, and the degree of damage depends on the exposure time and the concentration of the toxicant. Exposure to cadmium for 30 days at a concentration of 0.1 and 0.5 μM/L leads to a low decrease in cell adhesion, does not lead to their average size change and serious damage to the plasma membrane. Exposure to cadmium for 30 days at a concentration of 0.1 and 0.5 μM/L leads to an increase in the number of cells in the early apoptosis stage (by 11% and 15% respectively), which is reversible and does not affect the fragmentation of nuclear DNA. Exposure to cadmium in concentrations of 1.0 and 10.0 μM leads to a significant reduction in cell adhesion, a decrease in the average cell size by 1.3 and 1.8 times, respectively, to severe damage of the cell membrane. With an increase in the concentration of Cd<sup>2+</sup> to 1.0 and 10.0 μM/L, the number of cells with an intact membrane decreases by 27% and 50%, respectively. When exposed to cadmium ions at a concentration of 1.0 and 10.0 μM/L the proportion of cells found at both early and late stages of apoptosis increases on the 10 and 4 days of observation, respectively. By 30 days of observation it has been shown, that exposure to cadmium at a concentration of 1.0 and 10.0 μM leads to a significant increase in the number of cells in the irreversible stage of late apoptosis. It

has been found, that prolonged exposure to cadmium ions in concentrations of 0.5; 1.0 and 10  $\mu\text{M/L}$  per bone marrow cells *in vitro* has a clear genotoxic effect: the number of micronuclei and the degree of DNA fragmentation increase.

**Key words:** *cadmium, bone marrow, cytotoxicity, DNA damage, micronuclei, apoptosis, cell adhesion.*

## Оценка цитотоксичности малых концентраций ионов кадмия на клетки костного мозга крыс *in vitro*

У Си, Т.Харченко, Е.Кот, Ю.Кот, Е.Перский

Известно, что ионы кадмия накапливаются в клетках, приводя к нарушениям их метаболизма. В данной работе исследовано влияние малых концентраций ионов кадмия на культуру клеток костного мозга крыс, полученных из *os femoris*, и проведена оценка проявлений их цитотоксичности. Для исследования был выбран диапазон концентраций ионов кадмия в культуральной среде 0,1–10 мкМ/л. Цитотоксичность кадмия оценивали по степени адгезии клеток, их морфологии, плотности культуры, целостности мембран клеток, количеству апоптотичных клеток. Степень повреждения ДНК оценивали по количеству клеток с микроядрами и фрагментации ядерной ДНК. Показано, что продолжительное воздействие ионов кадмия в концентрациях 0,1; 0,5; 1,0 и 10 мкМ/л на клетки костного мозга *in vitro* имеет выраженный цитотоксический эффект, при этом степень выраженности проявлений зависит от времени экспозиции и концентрации токсиканта. Экспозиция с кадмием в течение 30 суток в концентрации 0,1 и 0,5 мкМ/л приводит к невысокому снижению адгезии клеток, не приводит к изменению их среднего размера и серьезному повреждению плазматической мембраны, при этом увеличивается только количество клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза (на 11% и 15% при культивировании клеток в присутствии  $\text{Cd}^{2+}$  в концентрации 0,1 и 0,5 мкМ/л соответственно), которая является обратимой и не затрагивает фрагментацию ядерной ДНК. Экспозиция с кадмием в концентрациях 1,0 и 10,0 мкМ приводит к существенному снижению адгезии клеток, уменьшению среднего размера клетки в 1,3 и 1,8 раза соответственно, сильному повреждению клеточной мембраны. С увеличением концентрации  $\text{Cd}^{2+}$  до 1,0 и 10,0 мкМ/л происходит снижение количества клеток с неповрежденной мембраной на 27 и 50% соответственно. При экспозиции с  $\text{Cd}^{2+}$  в концентрации 1,0 и 10,0 мкМ/л на 10 и 4 сутки наблюдения соответственно увеличивается доля клеток, находящихся как на ранней, так и на поздней стадиях апоптоза. Влияние ионов кадмия в концентрации 1,0 и 10,0 мкМ/л приводит к существенному возрастанию количества клеток, находящихся на необратимой стадии позднего апоптоза, к 30 суткам наблюдения. Установлено, что продолжительное воздействие ионов кадмия в концентрациях 0,5; 1,0 и 10 мкМ/л на клетки костного мозга *in vitro* имеет четкий генотоксический эффект: возрастает количество микроядер и степень фрагментации ДНК.

**Ключевые слова:** *кадмий, костный мозг, цитотоксичность, генотоксичность, микроядра, апоптоз, адгезия клеток.*

### Введение

Известно, что ионы кадмия имеют свойство накапливаться в клетке, приводя к нарушениям метаболизма и, как следствие, к развитию патологий органов и систем органов (Toxicological Profile for Cadmium; Hart, Keating, 1980; Shadi et al., 2001).

Хорошо изучены многочисленные влияния ударных одноразовых доз кадмия на метаболизм клетки, однако, практически совсем не изучены эффекты, связанные с долгосрочным влиянием малых доз ионов этого металла, хотя именно таким влияниям подвергается организм животных, в т.ч. и человека.

Ранее в экспериментах *in vivo* было показано, что потребление крысами в течение 36 суток питьевой воды, содержащей кадмий в концентрации 1 мкг/мл, приводит к повреждению ДНК в клетках костного мозга (Сі У та ін., 2016). Однако для выяснения концентрационных и временных зависимостей такого эффекта малых доз ионов кадмия, а также для понимания механизмов его цитотоксичности, необходимы исследования на культурах клеток *in vitro*.

В связи с этим целью данной работы являлось оценить степень повреждения ДНК клеток костного мозга крыс при продолжительном культивировании их в среде, содержащей малые дозы ионов кадмия.

Анализ литературы показал, что однократная 1-часовая экспозиция культуры клеток млекопитающих в среде, содержащей ионы кадмия в концентрациях 0.04–1,5 мМ/л, оказывает цитотоксическое действие уже в первые сутки и часы культивирования (Jin Long-Jin et al., 2004; Hui

Wang et al., 2016; Khan et al., 2014). Учитывая запланированный длительный период культивирования (30 суток), постоянный характер экспозиции клеток с ионами кадмия и способность этого металла к аккумуляции в клетках, для исследования был выбран диапазон концентраций ионов кадмия в культуральной среде – 0,1–10 мкМ/л. Цитотоксичность кадмия на клетки костного мозга *in vitro* оценивали по степени адгезии клеток, морфологии и плотности культуры, целостности мембраны клеток, количеству апоптотических клеток. Степень повреждения ДНК оценивали по количеству клеток с микроядрами и фрагментации ДНК, анализируемой методом комет-анализа.

### Методы исследования

Исследования проводили на культуре клеток костного мозга крыс линии Wistar. Клетки костного мозга были получены из большой берцовой кости методом (Benton. 2009) в модификации (Кругляков и др., 2007). Жизнеспособность первичной культуры (составляла 87%) оценивали витальным окрашиванием трипановым синим и анализировали на автоматизированном счетчике клеток Invitrogen Countess (Cadena-Herrera et al., 2015). Клетки высевали в культуральные планшеты Nunc с адгезивной поверхностью Nunclon Delta и культивировали в среде Gibco®  $\alpha$ -MEM, содержащую 20% Gibco® FBS и раствор Gibco® Antibiotic-Antimycotic solution в условиях 37°C, 96% RH, 5% CO<sub>2</sub>. Культивирование производили до достижения клетками монослоя с плотностью 90–94 %, после чего производили замену культуральной среды на среду, содержащую ионы кадмия в концентрациях: 0,1; 0,5; 1,0; 10 мкМ/л. Наблюдения за клетками и забор материала для исследования проводили в течение 30 суток каждые 48 часов до замены среды на свежую, содержащую Cd<sup>2+</sup>.

Оценку степени адгезии клеток и плотность культуры оценивали фазово-контрастной микроскопией на инвертированном микроскопе Zeiss Telaval 31.

Целостность плазматической мембраны клеток и размер клеток оценивали методом их прижизненного окрашивания 0,1% трипановым синим на цитометре Invitrogen Countess.

Количество здоровых клеток и клеток, находящихся на ранней и поздней стадиях апоптоза, определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием цитофлуорометра Guava PCA, программного обеспечения Guava Millipore Software 6.0.2 и набора Guava Millipore Nexin (Guava Millipore Nexin protocol, 2016).

Для детекции микроядер клетки фиксировали на стеклянных слайдах и окрашивали флуоресцентным ДНК-специфичным красителем акридиновым оранжевым (Oliveira-Martins, Grisolia, 2007). Слайды анализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus IMT2 ( $\lambda_{Ex}$ =488 нм,  $\lambda_{Em}$ =605 нм).

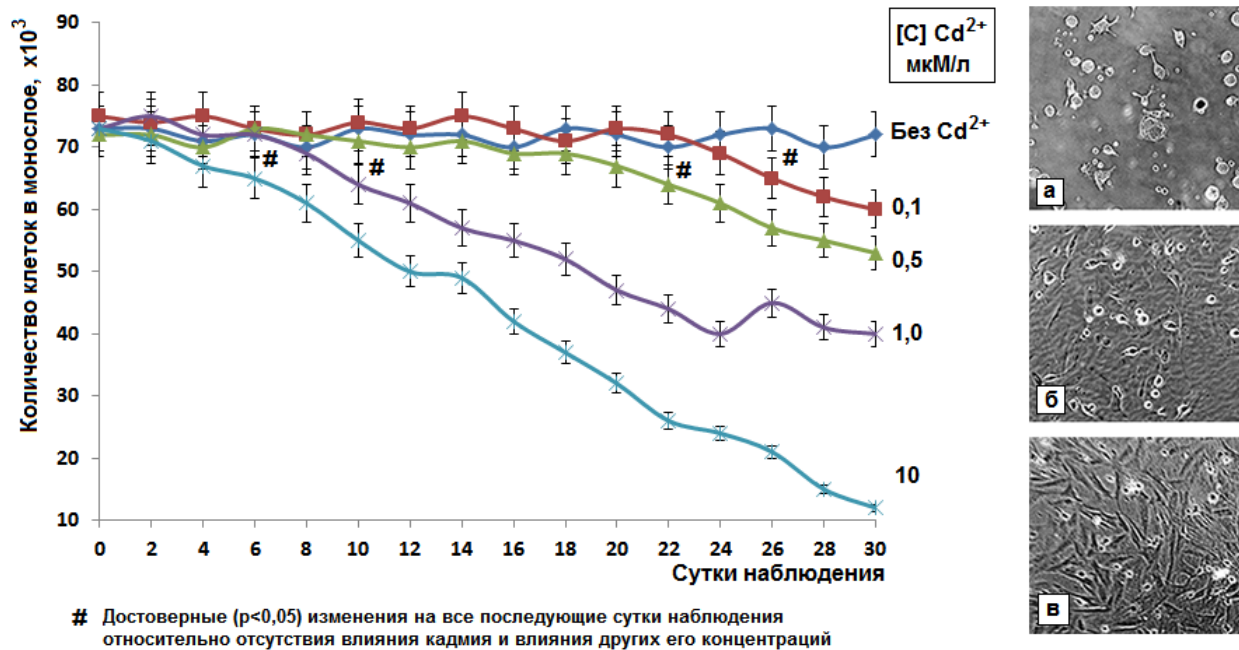
Для оценки степени фрагментации ДНК, клетки иммобилизовали в агарозном геле на стеклянном слайде CometSlides™ и проводили комет-анализ согласно с протоколом (Dhawan et al., 2003). Анализируемые треки ДНК окрашивали пропидием йодидом и анализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus IMT2 ( $\lambda_{Ex}$ =473 нм,  $\lambda_{Em}$ =535 нм) с использованием ПО CASPlab.

Анализ полученных результатов проводили в пакете программ Origin 7.5pro.

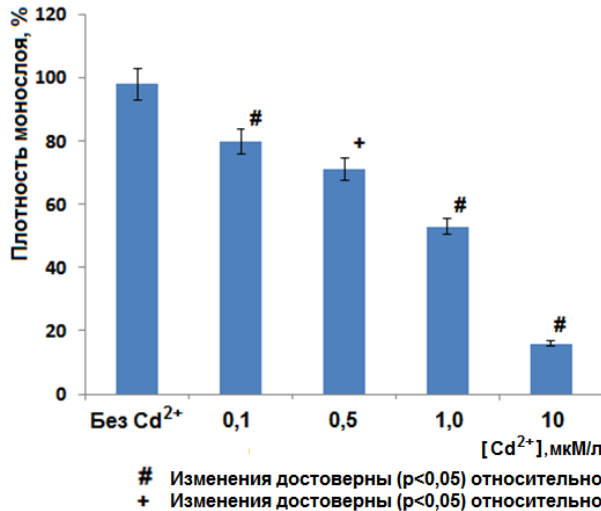
### Результаты исследования

Исследования влияния ионов кадмия на адгезию клеток костного мозга *in vitro* проводили на монослое клеток. Начиная с 24 часов после посева, костномозговые клетки адгезируются (рис. 1а) к 48 часам культивирования распластываются, приобретая фибробластоподобную морфологию (рис. 1б), и через 120 часов после посева образуют монослой с плотностью культуры 90–94 % (рис. 1в). Наблюдения начинали через 48 часов после первой замены культуральной среды на среду, содержащую ионы кадмия (0 час наблюдения), и строили зависимость количества прикрепленных клеток к подложке от времени наблюдения (рис. 1).

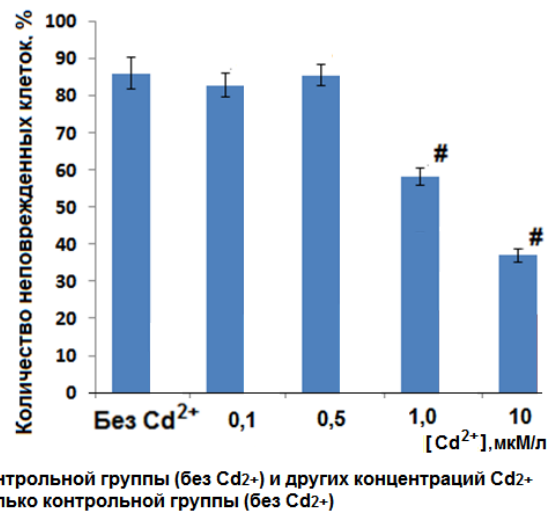
Показано, что культивирование клеток костного мозга в среде, содержащей ионы кадмия во всех исследуемых концентрациях, приводит к снижению адгезивной способности клеток. При этом видно, что такой эффект носит четко выраженную концентрационную зависимость. С увеличением концентрации кадмия к 30 суткам наблюдения непрерывно снижается количество клеток, распластанных и прикрепленных к подложке, а начало потери адгезии наступает на более ранних сроках – 26 сутки (0,1 мкМ/л), 22 сутки (0,5 мкМ/л), 10 сутки (1,0 мкМ/л) и 6 сутки (10 мкМ/л).



**Рис. 1.** Влияние ионов кадмия в различной концентрации на степень адгезии клеток костного мозга *in vitro*. На фото – адгезия и распластывание клеток на подложке (а, б) и образование монослоя (в) на 24, 48 и 120 час культивирования в среде без Cd<sup>2+</sup>



**Рис. 2.** Влияние Cd<sup>2+</sup> в различной концентрации *in vitro* на плотность монослоя клеток костного мозга на 30 сутки культивирования



**Рис. 3.** Влияние Cd<sup>2+</sup> в различной концентрации *in vitro* на количество клеток костного мозга с неповрежденной мембраной на 30 сутки культивирования

Как следствие, плотность монослоя клеток костного мозга снижается с увеличением концентрации кадмия и к 30 суткам культивирования составляет 78% (0,1 мкМ/л), 71% (0,5 мкМ/л), 52% (1,0 мкМ/л), 17% (10,0 мкМ/л), в то время как плотность монослоя клеток, культивируемых в отсутствие кадмия в культуральной среде, составляла 98% (рис. 2). При этом не обнаружено достоверной разницы между изменениями этого показателя при влиянии концентраций кадмия 0,1 и 0,5 мкМ/л.

Также показано, что культивирование клеток с ионами кадмия в концентрациях 0,1 и 0,5 мкМ/л не приводит к нарушению целостности плазматической мембраны клеток костного мозга даже на 30 сутки наблюдения (рис. 3). Однако с увеличением концентрации  $Cd^{2+}$  до 1,0 и 10,0 мкМ/л происходит существенное снижение количества клеток с неповрежденной мембраной на 27 и 50% соответственно (рис. 3).

Анализ распределения клеток костного мозга по их размеру на 30 сутки наблюдения показал, что в отсутствии влияния  $Cd^{2+}$  клеточная популяция сильно гетерогенна по этому показателю (5–40 мкм) и характеризуется средним размером клеток 22 мкм (рис. 4), что в принципе согласуется с данными литературы о существенной фенотипической, морфологической и функциональной гетерогенности клеток костного мозга как в первичной культуре, так и в культуре *in vitro* (Elsafadi et al., 2016).

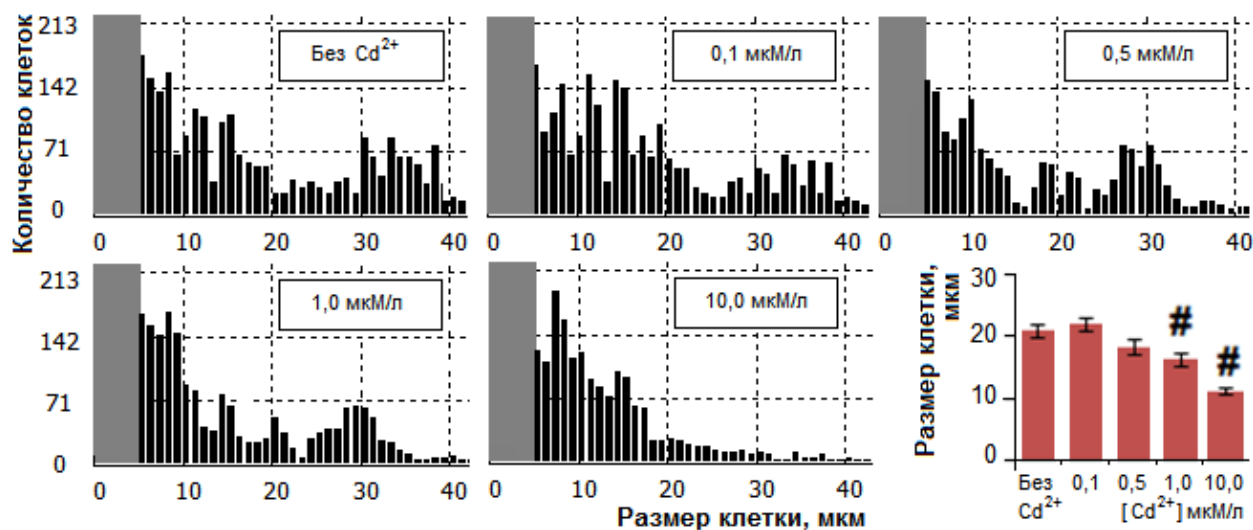


Рис. 4. Влияние  $Cd^{2+}$  в различной концентрации *in vitro* на распределение клеток по их размеру и средний размер клеток костного мозга на 30 сутки культивирования

Культивирование клеток в присутствии  $Cd^{2+}$  в концентрации 0,1 мкМ/л не приводит к изменению среднего размера клетки, в то время как при экспозиции с  $Cd^{2+}$  в концентрации 0,5 мкМ/л наблюдалась тенденция к уменьшению среднего размера, а в концентрациях 1,0 и 10,0 мкМ/л – достоверному уменьшению среднего размера клетки в 1,3 и 1,8 раза соответственно. Такое существенное снижение размера клетки и, по-видимому, их объема является следствием процесса их дегидратации, являющегося одним из признаков апоптотических процессов в клетке (Широкова, 2007).

В табл. 1 приведены результаты анализа количества здоровых клеток и клеток, находящихся на стадиях раннего и позднего апоптоза в культуре, культивируемых без ионов кадмия в среде и в присутствии ионов этого металла.

Видно, что в культуре без воздействия  $Cd^{2+}$  доля апоптотических клеток на различные сроки наблюдения не превышает 5%, что соответствует данным других исследователей для культивируемых клеток костного мозга (Tie-Long Chen et al., 2014; Novoselova et al., 2014; Fenxi Zhang et al., 2015).

Культивирование клеток в присутствии  $Cd^{2+}$  в концентрации 0,1 и 0,5 мкМ/л не приводит к изменению количества апоптотических клеток до 24 и 22 суток наблюдения соответственно, а начиная с этого срока наблюдения их доля начинает возрастать до 11% и 15% на 30 сутки наблюдения. Причем увеличение количества происходит только для клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза, для которых целостность плазматической мембраны сочетается с экспрессией на ее наружную поверхность фосфатидилсерина. Увеличение количество клеток на стадии позднего апоптоза, характеризующихся уже нарушением целостности мембраны и фрагментацией ДНК при действии этой концентрацией кадмия не наблюдалось.

При експозиції с  $Cd^{2+}$  в концентрації 1,0 і 10,0 мкМ/л на 10 і 4 сутки спостереження відповідно збільшується частка кліток, знаходячись як на ранній, так і на пізній стадії апоптозу, причому такий ефект був більш виражений при діянні самої найбільшої дози – 10,0 мкМ/л.

Таблиця 1.

Влияние  $Cd^{2+}$  в различной концентрации *in vitro* на количество здоровых и апоптотических клеток костного мозга, % от общего количества клеток



Здоровые клетки,

- Annexin VPE-
- 7AAD-



Ранние стадии апоптоза,

- Annexin VPE+
- 7AAD-



Поздние стадии апоптоза,

- Annexin VPE+
- 7AAD+

Сутки наблюдения	Концентрация кадмия в среде, мкМ/л														
	Без $Cd^{2+}$			0,1			0,5			1,0			10,0		
2	95	4	1	96	2	2	93	4	3	94	4	2	96	3	1
4	95	3	2	98	2	0	93	3	4	95	3	2	85#	6#	9#
6	97	2	1	95	3	2	95	3	2	92	4	4	82	9	9
8	95	5	0	95	1	4	92	6	2	90	6	4	80	8	9
10	98	2	0	95	2	3	91	6	4	85#	5#	10#	74	6	14
12	95	2	3	95	4	1	93	4	3	87	2	11	77	6	17
14	96	2	2	97	3	0	91	8	1	85	6	9	71	9	20
16	98	1	1	92	4	4	92	5	3	82	6	12	68	8	24
18	97	2	1	95	3	2	91	7	2	71	8	21	66	10	24
20	99	1	0	94	4	2	91	8	1	68	8	24	65	10	25
22	95	1	4	93	6	1	84#	12#	4#	71	9	20	62	11	27
24	98	2	0	87#	9#	4#	85	12	3	67	8	25	59	10	31
26	97	2	1	88	8	4	82	14	4	65	11	24	54	10	36
28	95	3	2	89	9	3	81	16	3	68	8	23	51	12	37
30	94	2	4	85	11	4	81	15	4	70	9	21	52	11	37

Примечание: # – изменения достоверны с обозначенного и во всех последующих сроках наблюдения ( $p < 0,05$ ) по сравнению с предыдущими сутками. Погрешность измерений во всех группах не превышает 1%

На 30 сутки культивирования с кадмием в указанных концентрациях количество микроядер, а, следовательно, и поврежденной ДНК достоверно увеличивается с увеличением дозы кадмия, начиная с концентрации 0,5 мкМ/л (рис. 5, табл. 2).

Таблиця 2.

Влияние  $Cd^{2+}$  в различной концентрации *in vitro* на степень фрагментации ДНК в клетках костного мозга, % от общего количества ДНК

	Концентрация кадмия в среде, мкМ/л				
	Без $Cd^{2+}$	0,1	0,5	1,0	10,0
Нефрагментированная ДНК (Head Comet)	99,0	98,0	95,0#	87,0#	81,0#
Фрагментированная ДНК (Tail Comet)	1,0	2,0	5,0#	13,0#	19,0#

Примечание: # – изменения достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с животными без введения  $Cd^{2+}$  и по сравнению с другими его концентрациями. Погрешность измерений во всех группах не превышает 1%,  $n$  (количество проанализированных ядер) = 100

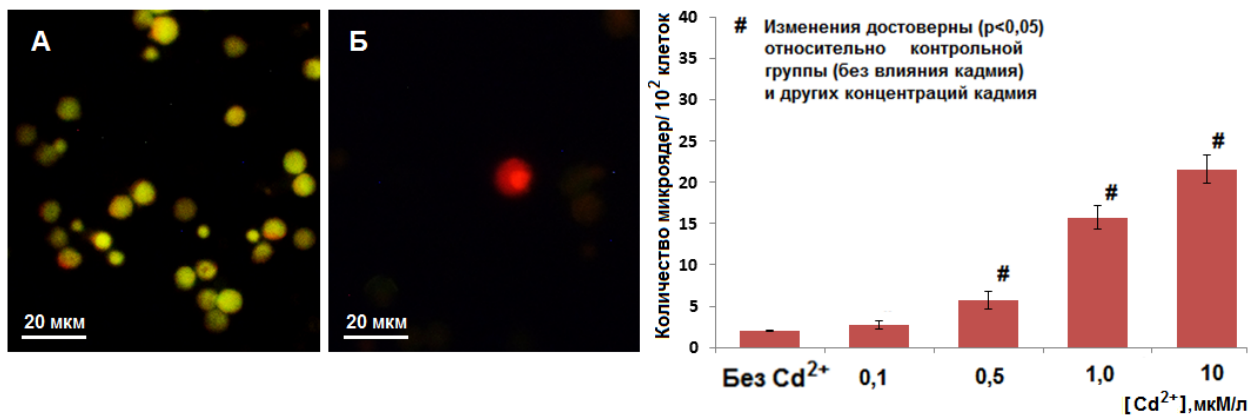


Рис. 5. Влияние  $\text{Cd}^{2+}$  в различной концентрации *in vitro* на количество микроядер в клетках костного мозга на 30 сутки культивирования. А – ядра здоровых клеток, Б – ядра с микроядрами

### Заключение

Таким образом, показано, что длительное воздействие ионов кадмия в концентрации 0,1; 0,5; 1,0 и 10 мкМ/л на клетки костного мозга *in vitro* имеет выраженный цитотоксический эффект. При этом степень выраженности такого эффекта зависит от времени экспозиции и концентрации кадмия. Экспозиция с кадмием в течение 30 суток в концентрации 0,1 и 0,5 мкМ/л приводит к незначительному снижению адгезии клеток, не приводит к повреждению их плазматической мембраны и изменению их среднего размера. При этом увеличивается только количество клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза, которая является обратимой и не затрагивает фрагментацию ядерной ДНК. Экспозиция же с кадмием в концентрации 1,0 и 10,0 мкМ приводит к существенному увеличению количества клеток, находящихся на необратимой стадии позднего апоптоза, характеризующейся повреждением плазматической мембраны клеток, уменьшением их среднего размера, фрагментацией ядерной ДНК и резким снижением адгезионных свойств к 30 суткам наблюдения.

### Список литературы / References

- Кругляков П.В., Полянцев Д.Г., Вийде С.К., Кислякова Т.В. Способ получения мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга млекопитающих и популяция мезенхимальных стволовых клеток, полученная этим способом. Патент RU 2303632, 2007. Заявл. 04.04.2006. Оpubл. 27.07.2007. Бюл. №21. /Kruglyakov P.V., Polyntsev D.G., Viyde S.K., Kislyakova T.V. The method of obtaining mesenchymal stem cells from the mammalian bone marrow and the population of mesenchymal stem cells obtained by this method. Patent RU 2303632. 2007. Declared 04.04.2006. Published 27.07.2007. Bulletin no. 21./
- Сі У, Плотніков А., Пиріна І. та ін. Дослідження ступеня ушкодження ДНК клітин кісткового мозку щурів при довготривалому вживанні ними малих доз кадмію // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2016. – Вип.73. – С. 109–113. /Si Wu, Plotnikov A., Pyrina I. et al. The investigation of damage extent of DNA from rat bone marrow cells under the long-term consumption of low doses of cadmium // Visnyk of the Lviv University. Series Biology. – 2016. – Issue 73. – P. 109–113./
- Широкова А.В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки // Цитология. – 2007. – Т.49, №5. – С. 385–394. /Shirokova A.V. Apoptosis. Signaling network and changes of cell ion and water balance // Tsitologiya. – 2007. – Vol.49, no. 5. – P. 385–394./
- Benton C.B. Bone marrow isolation, crushing technique. Millipore bone marrow harvesting and hematopoietic stem cell isolation kit protocol. 2009. (<http://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/Isolation-of-Bone-Marrow-byBone-Crushing.pdf>)
- Cadena-Herrera D., Esparza-De Lara J.E., Ramírez-Ibañez N.D. et al. Validation of three viable-cell counting methods: Manual, semi-automated, and automated // Biotechnology Reports. – 2015. Vol.7. – P. 9–16.
- Dhawan A., Bajpayee M., Pandey A.K., Parmar D. Protocol for the single cell gel electrophoresis / Comet assay for rapid genotoxicity assessment. – Lucknow, India: Industrial Toxicology Research Centre; 2003. (<http://www.cometassayindia.org/protocol%20for%20comet%20assay.pdf>)

- Elsafadi M., Manikandan M., Atteya M. et al. Characterization of cellular and molecular heterogeneity of bone marrow stromal cells // *Stem Cells International*. – 2016. – <http://doi.org/10.1155/2016/9378081>.
- Fenxi Zhang, Tongming Ren, Junfang Wu TGF- $\beta$ 1 induces apoptosis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via regulation of mitochondrial reactive oxygen species production // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2015. – Vol.10, issue 3. – P. 1224–1228.
- Guava Millipore Nexin protocol. Users Guide. Merck-Millipore, 2016. ([https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Guava-Nexin-Reagent-for-Flow-Cytometry---100-tests,MM\\_NF-4500-0450?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.ua%2F&bd=1](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Guava-Nexin-Reagent-for-Flow-Cytometry---100-tests,MM_NF-4500-0450?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.ua%2F&bd=1))
- Hart B.A., Keating R.F. Cadmium accumulation and distribution in human lung fibroblasts // *Chemico-Biological Interactions*. – 1980. – Vol.29, issue 1. – P. 67–83.
- Hui Wang, Zheng Liu, Wenxiu Zhang et al. Cadmium-induced apoptosis of Siberian tiger fibroblasts via disrupted intracellular homeostasis // *Biol. Res.* – 2016. – Vol.49. – <http://doi.org/10.1186/s40659-016-0103-6>.
- Jin Long-Jin, Lou Zhe-Feng, Dong Jie-Ying et al. Effects of cadmium and mercury on DNA damage of mice bone marrow cell and testicle germ cell in vitro // *J. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*. – 2004. – Vol.16 (2). – P. 94–97.
- Khan H.A., Arif I.A., Sudimack A.G., Williams J.B. Cytotoxic effects of cadmium and paraquat on avian skin fibroblasts // *Annual Research & Review in Biology*. – 20104. – Vol.4 (11). – P. 1757–1768.
- Novoselova K.A., Zlatnik E.Yu., Lysenko I.B. et al. Analysis of apoptotic processes in bone marrow cell culture of lymphoma (L) patients (pts) // *Journal of Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 32, no. 15. – Suppl. – e14018.
- Oliveira-Martins C.R., Grisolia C.K. Determination of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood reticulocytes of mice treated topically with different lubricant oils and cyclophosphamide // *Genet. Mol. Res.* – 2007. – Vol.6 (3). – P. 566–574.
- Shadi Abu-Hayyeh, Minder Sian, Keith J.G. et al. Cadmium accumulation in aortas of smokers // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2001. – Vol.21. P. 863–867.
- Tie-Long Chen, Guang-Li Zhu, Jian-An Wang et al. Apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells caused by hypoxia/reoxygenation via multiple pathways // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2014. – Vol.7 (12). – P. 4686–4697.
- Toxicological Profile for Cadmium*. U.S. Department of Health and Human Services, 2012. (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>)

**Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: A.P.Belozorov**

**Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina**

*Подано до редакції / Received: 02.05.2018*

**About the authors:** Wu Si – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, [wu.si.biochem2018@gmail.com](mailto:wu.si.biochem2018@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-5350-5569>  
T.Kharchenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, [tanyakh1606@gmail.com](mailto:tanyakh1606@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-3082-6340>  
K.Kot – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, [kate.v.kot@gmail.com](mailto:kate.v.kot@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-4814-847X>  
Y.Kot – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, [kot.juriy@gmail.com](mailto:kot.juriy@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-2591-4098>  
Ye.Perskyi – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, [evg.perskyi@gmail.com](mailto:evg.perskyi@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-2492-9741>

**Про авторів:** У Сі – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61022, [wu.si.biochem2018@gmail.com](mailto:wu.si.biochem2018@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-5350-5569>  
Т.Харченко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, [tanyakh1606@gmail.com](mailto:tanyakh1606@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-3082-6340>  
К.Кот – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, [kate.v.kot@gmail.com](mailto:kate.v.kot@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-4814-847X>



Ю.Кот – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, kot.juriy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2591-4098>

Є.Перський – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, evg.persky@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2492-9741>

**Об авторах:** У Си – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, wu.si.biochem2018@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5350-5569>

Т.Харченко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, tanyakh1606@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3082-6340>

Е.Кот – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, kate.v.kot@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4814-847X>

Ю.Кот – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, kot.juriy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2591-4098>

Е.Перский – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, evg.persky@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2492-9741>