

ЗМІНИ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ КІСТКОВОМОЗКОВИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ПРИ ВНУТРІШНЬОМУ ОПРОМІНЕННІ СТРОНЦІЄМ-90

*У роботі проведено оцінку функціональної активності клітин кровотворної системи щурів за умов тривалого внутрішнього опромінення стронцієм-90. В умовах культивування в дифузійних камерах *in vivo* виявлено порушення на рівні відділу стовбурових клітин і клітин-попередників. До найбільш типових із них належать зниження колонієутворювальної ефективності гемопоетичних клітин-попередників у культурі, деструктивні зміни в клітинах клонів, переважання клітин еозинофільного напрямку диференціювання.*

Ключові слова: *кровотворення, клітини-попередники, культура клітин, опромінення стронцієм-90.*

*В работе проведена оценка функциональной активности клеток кроветворной системы крыс при длительном внутреннем облучении стронцием-90. В условиях культивирования в диффузионных камерах *in vivo* обнаружены нарушения на уровне отдела стволовых клеток и клеток-предшественников. К наиболее типичным из них относятся снижение колониеобразующей эффективности гемопоэтических клеток-предшественников в культуре, деструктивные изменения в клетках клонов, преобладание клеток эозинофильного направления дифференцировки.*

Ключевые слова: *кроветворение, клетки-предшественники, культура клеток, облучение стронцием-90.*

*The assessment of functional activity of rat hematopoietic cells was performed under prolonged exposure to Strontium-90. Alterations were revealed on the level of stem and progenitor cells compartment while cultivating cells in diffusion chambers *in vivo*. The most typical deviations are decrease in colony-forming efficiency of hematopoietic progenitor cells in culture, detrimental changes in cell clones, and predominant differentiation into eosinophilic lineage.*

Key words: *hematopoiesis, progenitor cells, cell culture, Strontium-90 irradiation.*

Постановка проблеми та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями. Пошуки найбільш характерних для радіаційної обстановки змін на клітинному і молекулярному рівнях є корисними при розробці терапевтичної тактики супроводу осіб, опромінених у результаті дії іонізуючої радіації. Дані, отримані за останню чверть століття, що стосуються функціонування кровотворної системи людини при опроміненні, стали вагомим внеском у радіобіологію [1; 2]. Разом із тим, унаслідок дії цілого комплексу чинників, притаманних для Чорнобильської катастрофи, та відсутності дозозалежності в деяких випадках, описані зміни потребують експериментального підтвердження їхнього зв'язку з дією іонізуючої радіації.

Аналіз останніх досліджень та публікацій, виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується означена стаття. Досвід, набутий у результаті аналізу наслідків дії іонізуючого випромінювання на біологічні об'єкти в умовах, притаманних для Чорнобильської аварії, підтвердив класичні радіобіологічні істини про те, що

на зміну зовнішньому опроміненню з роками надійде черга внутрішнього опромінення [1]. Причиною стають радіонукліди, зокрема стронцій-90, які здатні накопичуватися в організмі людини та тварин і спричиняти їх тривале хронічне опромінення [3]. При цьому однією із найбільш уражуваних систем організму є гемопоетична система за рахунок високої інтенсивності поділу пулу стовбурових клітин та клітин-попередників кровотворення [4]. Недостатньо дослідженими залишаються питання щодо морфологічних і функціональних особливостей кровотвірних клітин-попередників за таких умов. Усе частіше знаходить своє підтвердження гіпотеза про те, що порушення кістково-мозкового кровотворення внаслідок опромінення є не лише наслідком прямих ушкоджень ДНК гемопоетичних клітин, а й включає зміни в регуляторній дії мікрооточення [5].

Формулювання цілей статті (постановка завдання). Метою роботи є дослідження функціональної активності кровотвірних клітин-попередників лабораторних тварин під впливом стронцію-90. Для реалізації цієї мети було здійснено оцінку кількісних

та якісних показників периферичної крові та кісткового мозку опромінених тварин, а також визначення в культурі клітин функціональної активності клітин-попередників кісткового мозку.

Виклад основного матеріалу дослідження. Для дослідження функціональної активності гемопоетичних клітин-попередників було проведено культивування в дифузійних камерах *in vivo* клітин кісткового мозку опромінених та контрольних щурів. Білих лабораторних щурів-самців Вістар, яких утримували в умовах віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, було розподілено на 2 групи. Першу групу склали здорові тварини, яких утримували на стандартному харчовому раціоні; другій групі щоденно протягом 6 місяців вводили з їжею стронцій-90 активністю 5 кБк/добу. До кінця цього періоду поглинута доза в скелеті тварин складала 1 Гр. Оцінювали кількісні та якісні показники периферичної крові та кісткового мозку контрольних та опромінених тварин, а також показники колонієутворювальної ефективності клітин-попередників кісткового мозку опромінених тварин [6].

Кістковий мозок тварин для культивування отримували із стегнових кісток, вимиваючи клітини середовищем RPMI-1640 із подальшим ресуспендуванням. Проводили культивування кровотворних клітин у гелевих дифузійних камерах, що мають постійний хімічний склад, задані дифузійні параметри і високу прозорість. Внутрішня порожнина камер абсолютно непроникна для клітин ззовні [7]. Суспензію клітин кісткового мозку щурів змішували з основним поживним середовищем, що містить середовище RPMI-1640, 10 % фетальної телячої сироватки, 0,33 % агар Difco та антибіотики (пеніцилін та стрептоміцин), і в напіврідкому агаровому гелі вводили у внутрішню порожнину гелевих дифузійних камер шляхом проколу бічної стінки ін'єкційною голкою.

Камери занурювали в черевну порожнину мишей лінії СВА, оброблених заздалегідь способом, що дозволяє одержати ріст клітин-попередників. Для дослідження гранулоцито-моноцитарних клітин-попередників проводили обробку мишей за допомогою введення їм циклофосфаміду за добу до досліду, що сприяло підвищенню колонієстимулювальної активності і супресії імунологічної реактивності тварини. Облік результатів проводили на 18-й день культивування. Кількість колоній-клонів та кластерів визначали за допомогою інвертованого мікроскопа безпосередньо в камері. Ефективність колонієутворення (ЕКУ) гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників визначали за кількістю колоній-клонів.

Дослідження кількісних та якісних показників периферичної крові та кісткового мозку групи опромінених щурів у порівнянні із контролем виявило різницю між цими групами тварин. Зокрема, у групі опромінених тварин виявляли гематологічні зміни, притаманні для хронічного внутрішнього опромінення в малих дозах – лабільність гематологічних показників із значною гіперпроліферативною реакцією в ранній термін після початку опромінення. Так, на 10-ту добу

в порівнянні із контролем ($8,0 \pm 0,2 \times 10^{12}/л$) вміст еритроцитів у опроміненій групі тварин був суттєво нижчим і становив $7,3 \pm 0,4 \times 10^{12}/л$. Подібним чином вміст гемоглобіну складав $125 \pm 3,9$ г/л у контролі та $110 \pm 6,2$ г/л при опроміненні. У вмісті тромбоцитів у периферичній крові опромінених тварин вираженої різниці при порівнянні із контролем виявлено не було. Щодо вмісту лейкоцитів у периферичній крові щурів – слід зазначити, що впродовж усього періоду спостереження в опроміненій групі порівняно з контролем спостерігався лейкоцитоз.

Зміни в периферичній крові опромінених тварин були наслідком дизгемопоезу в кістковому мозку, який виявлявся при дослідженні мієлограм. Так, у ранні терміни після початку опромінення в кістковому мозку спостерігалася гіперпроліферативна реакція. Загальний мітотичний індекс у опроміненій групі тварин був суттєво підвищеним у порівнянні із контролем ($14,7 \pm 1,7$ %) та становив $25,3 \pm 0,7$ %. Значні відмінності також були присутні в кількості патологічних мітозів серед клітин кісткового мозку – у той час як у нормі вони взагалі не спостерігалися, в опроміненій групі тварин виявляли в середньому $3,7 \pm 0,7$ % патологічних мітозів. Також на тлі повної відсутності двоядерних еритроїдних елементів у кістковому мозку контрольних тварин спостерігалася суттєве підвищення їх кількості в опромінених щурів – $3,7 \pm 0,4$ %.

Окрім кількісних та якісних характеристик периферичної крові та кісткового мозку опромінених тварин, показником стану їх кровотворної системи є функціональна активність кісткомозкових клітин-попередників, а саме кількість колоній, утворених у культурі дифузійних камер *in vivo*. Оцінка цього показника дозволила виявити порушення на рівні відділу стовбурових клітин і клітин-попередників, до найбільш типових із яких належать зниження колонієутворювальної ефективності гемопоетичних клітин-попередників у культурі. Так, у контрольній групі щурів ефективність клонування кісткового мозку в культурі дифузійних камер *in vivo* становила $13,4 \pm 2,6$ на 1×10^5 експлантованих клітин. У той же час ефективність клонування гранулоцитарних клітин-попередників щурів, підданих впливу стронцію-90, знаходилась у межах від 4 до 7 клонів і становила відповідно $6,5 \pm 1,2$ на 1×10^5 експлантованих клітин.

Зниження ефективності клонування супроводжувалося змінами в характері диференціювання клітин у клонах. Так, аналіз препаратів показав, що у щурів дослідної групи серед гранулоцитарних елементів зустрічаються еозинофільні форми.

Еозинофільні колонії та еозинофільні кластери виявлялися в культурах клітин кісткового мозку щурів у контролі у 4 % випадків, а в опромінених тварин – у 20 % випадків. Інші агрегати були представлені нейтрофільними кластерами і нейтрофільними колоніями. Причини цього феномену можуть полягати в захисно-адаптаційній реакції організму, у якій еозинофіли, що переважають усі інші мононуклеари ферментативною активністю, беруть на себе функцію захисту у відповідь на дію іонізуючої радіації [8].

Зниження ефективності колонієутворення клітин кісткового мозку опромінених тварин також поєднувалося зі змінами у складі клітинних агрегатів. Так, аналіз клітинного складу клонів, ізольованих і перенесених на скельця за допомогою цитоцентрифуги Shandon показав, що вони склалися із гранулоцитів різного ступеня зрілості і макрофагальних елементів; зустрічались також гіперсегментовані лейкоцити.

Диференційований підрахунок клітин у клонах свідчив про наявність у них гемопоетичних клітин гранулоцитарно-макрофагального ряду всіх етапів зрілості від бластної клітини до сегментоядерного лейкоцита; також були присутніми плазматичні клітини та макрофаги.

Залежно від ступеня зрілості, гранулоцити було об'єднано у групи ранніх і пізніх гранулоцитів. У групу ранніх віднесено бластні клітини, промієлоцити і мієлоцити, а до пізніх – метамієлоцити, юні, паличкоядерні і сегментоядерні лейкоцити. Аналіз складу клітинних елементів, згрупованих за принципом зрілості, що склали групи ранніх і пізніх гранулоцитів, вказав на наявність різниці в дослідних групах порівняно з контролем. Так, група опромінених тварин характеризувалася зростанням кількості пізніх гранулоцитів – 85 % порівняно із контрольними 76 %. У той же час диференційований підрахунок гранулоцитів у межах вказаних груп залежно від ступеня зрілості свідчив про їх перерозподіл – у межах групи пізніх гранулоцитів спостерігався зсув вліво.

Так, у контрольних культурах зрілі гранулоцитарні елементи (паличкоядерні та сегментоядерні нейтрофіли) становили 52 % від загальної кількості, тоді як у культурах клітин кісткового мозку опромінених тварин диференційований облік гранулоцитів виявив знижену кількість зрілих нейтрофілів – 42 %. Цей

ефект затримки дозрівання клітин у клонах узгоджується із даними інших авторів [9], що пов'язують затримку колонієутворення з дією іонізуючої радіації.

Отже, дія стронцію-90 на кровотворну систему щурів призводила до достовірного зменшення кількості колонієутворювальних одиниць у кістковому мозку. Зниження ефективності клонування гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників у культурі гелевих дифузійних камер пов'язане з їх значною радіоуразуваністю. Інгібуючі ефекти опромінення проявлялися в пригніченні проліферативної активності клітин у клонах.

Висновки дослідження і перспективи подальших розвідок у цьому напрямі. Результати цього дослідження свідчать про те, що внутрішнє опромінення радіонуклідом стронцієм-90 у діапазоні малих доз викликає явища дизгемопоезу зі зміною співвідношення між окремими паростками кровотворення, порушенням процесів проліферації, диференціювання й дозрівання клітин кісткового мозку, появою патологічних форм клітин.

Представлені результати щодо морфофункціональних особливостей кровотворних клітин в умовах дії радіонукліду стронцію-90 є співставними з даними, отриманими раніше дослідниками щодо впливу радіаційної компоненти на функціонування первісних відділів гемопоезу людини [1] та можуть бути використані при подальшій інтерпретації показників стану кровотворення у осіб, що мешкають на забруднених радіонуклідами територіях. Виявлені особливості кровотворення в лабораторних тварин при внутрішньому надходженні радіонукліду стронцію-90 є застереженням у випадку появи подібних змін у кровотворенні опромінених осіб.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бебешко В. Г. Гематологічні ефекти в ранньому та віддаленому періодах після аварії на Чорнобильській АЕС / В. Г. Бебешко, І. С. Дягіль, В. С. Клименко, Ж. М. Мінченко, Д. О. Білий та ін. // Медичні наслідки аварії на Чорнобильській АЕС / За ред. О. Ф. Возіанова, В. Г. Бебешко, Д. А. Базики. – К.: ДІА, 2007. – С. 327–355.
2. Гуськова А. К. Десять лет спустя послеаварии на ЧАЭС. Ретроспектива клинических событий и мер по преодолению последствий / А. К. Гуськова // Мед. радиология и радиационная безопасность. – 1999. – № 11. – С. 23–26.
3. Стариченко В. И. Кинетика стронция-90: генотипическая детерминация / В. И. Стариченко // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2005. – Т. 45. Вып. 3. – С. 328–332.
4. Bilko N. M. Assessment of hemopoietic progenitor cells in patients affected by Chernobyl accident and risk of oncohematological diseases / N. M. Bilko // Rapid Diagnosis in Populations at Risk from Radiation and Chemicals / [Edited by A. Cebulska-Wasilewska, A. N. Osipov, F. Dargoudi]. – Amsterdam, Netherlands : IOS Press, 2010. – P. 95–101.
5. Борбуляк І. З. Стан гемопоетичного мікрооточення при опроміненні стронцієм-90 / І. З. Борбуляк // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2010. – Т. 5. № 4. – С. 24–28.
6. Борбуляк І. З. Комплексна оцінка стану гемопоетичної системи лабораторних тварин в умовах внутрішнього опромінення стронцієм-90 / І. З. Борбуляк, Н. К. Родіонова, Н. М. Білько // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. – 2012. – Вип. 17. – С. 359–364.
7. Bilko N. M. Novel methodological approaches in assessment and enrichment of stem cell population / N. M. Bilko, D. I. Bilko // Stem cells and their potential for clinical application / Ed. by N. M. Bilko, B. Fehse et al. – Springer, 2008. – P. 201–210.
8. Бережная Н. М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. II. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения / Н. М. Бережная // Онкология. – 2009. – Т. 11. № 2. – С. 86–93.
9. Капутьцевич Ю. Г. Количественные закономерности лучевого поражения клеток / Ю. Г. Капутьцевич. – М.: Атомиздат, 1978. – 231 с.

Рецензенти: Ісаєв С. Д., д. хім. н., професор;
Талько В. В., д. мед. н., професор.

© Руссу І. З., Родіонова Н. К., Білько Н. М., 2014

Дата надходження статті до редколегії 20.05.2014 р.

РУССУ Ірина Зіновіївна – кандидат біологічних наук, старший викладач кафедри лабораторної діагностики біологічних систем національного університету «Києво-Могилянська академія», м. Київ.

Коло наукових інтересів: радіаційна медицина.

РОДІОНОВА Наталія Костянтинівна – кандидат медичних наук, старший науковий співробітник відділу радіобіології та екології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, м. Київ.

Коло наукових інтересів: радіаційна медицина.

БІЛЬКО Надія Михайлівна – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри лабораторної діагностики біологічних систем національного університету «Києво-Могилянська академія», м. Київ.

Коло наукових інтересів: радіаційна медицина.