

ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН МИШЕЙ BALB/C У КУЛЬТУРІ *IN VITRO* ЗА УМОВ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ У РІЗНИХ ДОЗАХ

І. З. Руссу, Д. І. Білько, Н. М. Білько

Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ, Україна

Мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку є важливим елементом кровотворного мікрооточення. Фактори, які синтезуються цими клітинами, напряду впливають на регуляцію гемопоезу, а отже, будь-які зміни у функціональній активності мезенхімальних компонентів мікрооточення відображатимуться у процесі кровотворення. Доволі поширеною є точка зору, що гемопоетичні клітини кісткового мозку є дуже радіочутливими, а стромальні – достатньо радіорезистентні. Проте існують дослідження, які свідчать про наявність серед мезенхімальних стромальних клітин субпопуляцій як із низькою, так і з високою радіочутливістю. Тому метою нашої роботи було дослідити особливості функціонування мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку мишей лінії Balb/C, опромієних іонізуючою радіацією у різних дозах, у культурі клітин *in vitro*.

Тварин було поділено на групи з урахуванням дози та типу опромінення, а саме: перша група – зовнішнє гостре опромінення у дозі 5,95 Гр протягом 8,5 хв; друга група – зовнішнє гостре опромінення у дозі 0,19 Гр протягом 4 год; третя група – зовнішнє довготривале опромінення у дозі 0,24 Гр протягом близько 6 місяців; четверта група – зовнішнє хронічне опромінення у дозі 1,5 Гр протягом 18 місяців; п'ята група – контрольна (інтактні тварини). Моделі опромінення були розроблені в Інституті проблем безпеки атомних електростанцій НАН України.

Після досягнення необхідної дози опромінення для отримання клітин кісткового мозку мишей забивали, використовуючи метод цервікальної дислокації спинного мозку в шийному відділі. Вилучали стегнову кістку таким чином, щоб не пошкодити її епіфізи. В умовах стерильності видаляли епіфізи та відкривали кісткомозковий канал, потім за допомогою шприца вимивали його вміст живильним середовищем у стерильну пробірку. Для того, щоб оцінити колонієутворюючу здатність мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку, проводили культивування їх у системі *in vitro*. Основним середовищем, яке використовували для культивування клітин, було DMEM, що містить солі, L-амінокислоти, вітаміни, глутатіон, феноловий червоний, D-глюкозу, 1 % L-глутаміну (2 мМ) та розчин антибіотиків пеніциліну і стрептоміцину. Клітини культивували протягом 7 діб із постійним контролем за умовами культивування в CO₂-інкубаторі при 37 °C, 100 % вологості та 5 % CO₂. На 7-й день проводили зміну середовища та оцінювали кількість колоній стромальних клітин, що містили не менше 50 клітин (рис. 1), після чого продовжували культивування клітин кісткового мозку до 14-ї (із подальшою заміною середовища) та 24-ї доби з метою оцінити кількість колонієутворюючих одиниць у різні терміни культивування. Для дослідження мезенхімальних стромальних клітин проводили забарвлення за Романовським - Гімза та вивчали кількість та морфологію клітин із використанням інвертованого мікроскопа.

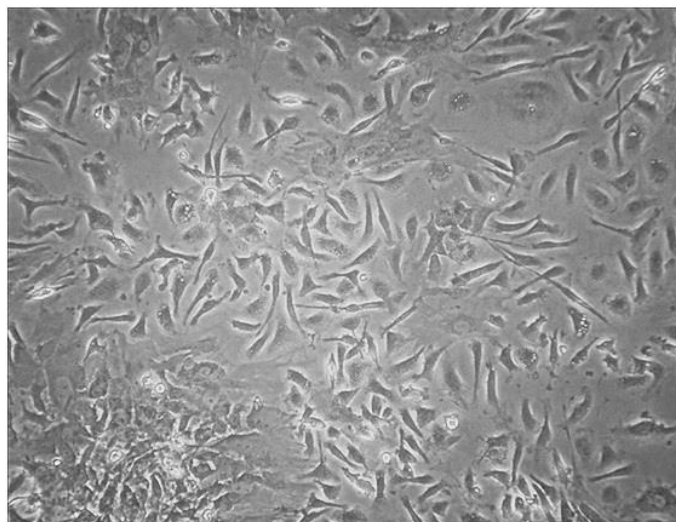


Рис. 1. Мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку миші Balb/C у культурі клітин *in vitro* на 7-му добу культивування. Утворюються клітинні агрегати, що складаються із веретеноподібних клітин. Інвертований мікроскоп, збільшення $\times 200$.

Під час усього процесу культивування *in vitro* проводили визначення кількості колонієутворюючих одиниць фібробластів (КУОф) у культурі кісткомозкових клітин та аналізували динаміку утворення їх і морфологію клітин, що входять до складу клітинних агрегатів. У результаті проведених досліджень було виявлено суттєві відмінності у функціонуванні мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку мишей Balb/C, опромінених у різних дозах, у порівнянні із контрольною групою тварин.

Вивчення динаміки утворення клітинних агрегатів дозволило виявити особливості цих процесів у досліджуваних груп тварин. Так, у контролі перші поодинокі адгезовані веретеноподібні стромальні клітини з'являлися уже на 3-тю добу культивування, а на 8 - 10-ту добу спостерігалася суттєве збільшення кількості стромальних клітин на поверхні культурального пластика. У той же час клітинні агрегати у культурі опроміненого кісткового мозку з'являлися пізніше та містили меншу кількість клітин. Щодо процесу формування моношару клітин на поверхні планшета, то у контролі на 14-ту добу спостерігалася суттєве збільшення кількості стромальних клітин, проте вони розміщувалися не у вигляді суцільного моношару, а доволі невеликими стромальними колоніями. І лише на 18-ту добу культивування мезенхімальні клітини формували моношар на дні культурального планшета. У той же час у 1-й групі (сублетальне опромінення) та 4-й групі (хронічне опромінення) моношар не формувався взагалі, у 3-й групі (довготривале опромінення) цей процес був дещо сповільнений до 20-ї доби, а у 2-й групі (гостре опромінення) моношар формувався аж на 24-ту добу.

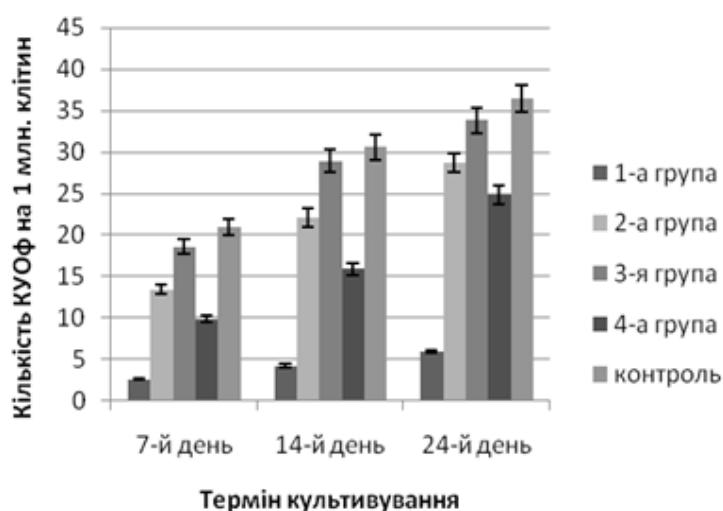


Рис. 2. Ефективність колонієутворення (кількість утворених колонієутворюючих клітин-фібробластів на 1 млн. експлантованих клітин) кісткового мозку мишей Balb/C, опромінених у різних дозах, у порівнянні із контролем, у культурі клітин *in vitro*.

Дослідження кількісних показників функціонування мезенхімальних стромальних клітин у культурі *in vitro* дало змогу визначити особливості впливу іонізуючої радіації у різних дозах на ці клітини (рис. 2). Зокрема, у контролі ці значення становили $20,9 \pm 1,0$ КУОф на 7-му добу культивування, $30,6 \pm 1,5$ на 14-ту добу та $36,5 \pm 1,6$ на 24-ту добу культивування. У той же час у 1-й групі (сублетальне опромінення) ці показники відрізнялися від контрольних найбільшою мірою – $2,6 \pm 0,1$, $4,2 \pm 0,2$ та $5,9 \pm 0,2$ відповідно. Також суттєва різниця із контролем спостерігалася у 4-й групі (хронічне опромінення) – кількість КУОф становила $9,9 \pm 0,4$ на 7-му добу, $15,9 \pm 0,7$ на 14-ту та $24,8 \pm 1,1$ на 24-ту добу культивування. У той же час у 2-й групі (гостре одноразове опромінення) цей показник становив $13,4 \pm 0,6$ на 7-му добу, $22,1 \pm 1,1$ на 14-ту та $28,7 \pm 1,2$ КУОф на 24-ту добу культивування. Деяка різниця із контролем спостерігалася також у 3-й групі (довготривале опромінення) – $18,6 \pm 0,9$ на 7-му добу культивування, $28,9 \pm 1,4$ на 14-ту та $33,8 \pm 1,5$ КУОф на 24-ту добу культивування.

Отже, у результаті проведених досліджень виявлено, що такі наслідки опромінення, як сповільнення процесу формування стромального моношару та зниження кількості колонієутворюючих одиниць (КУОф) у культурі *in vitro* порівняно із контролем, найбільшою мірою проявлялися при сублетальному опроміненні (1-а група), були також доволі суттєвими внаслідок хронічного опромінення (4-а група), та дещо меншою мірою проявлялися у тварин після одноразового гострого опромінення (2-а група) і після довготривалого опромінення (3-я група), що загалом свідчило про високу радіочутливість мезенхімальних стромальних клітин мишей, яку слід брати до уваги при дослідженні реакції кісткового мозку на дію іонізуючої радіації.