
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК: 612.119+576.535+612.014.482

І. З. Борбуляк^{1,*}, Н. К. Родіонова², Н. М. Білько¹

¹Національний університет "Киево-Могилянська академія",
вул. Г. Сковороди, 2, м. Київ, 04655

²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України,
вул. Васильківська, 45, Київ, 03022

КОМПЛЕКСНА ОЦІНКА СТАНУ ГЕМОПОЕТИЧНОЇ СИСТЕМИ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН В УМОВАХ ВНУТРІШНЬОГО ОПРОМІНЕННЯ СТРОНЦІЄМ-90

В роботі досліджені особливості функціонування кровотворної системи на рівні стовбурової клітини і клітин-попередників шурів при дії радіонукліда ⁹⁰Sr в умовах його тривалого і одноразового введення. В результаті культивування кровотворних клітин-попередників тварин, які зазнали внутрішнього опромінення ⁹⁰Sr, виявлені такі особливості, як пригнічення колонієутворюючої здатності кровотворних клітин-попередників кісткового мозку в культурі і поява циркулюючих клітин-попередників у периферичній крові, що вказує на порушення основ гемопоезу. Показано, що в результаті впливу радіонукліда ⁹⁰Sr відбувається пошкодження гемопоетичного мікрооточення, яке характеризується пригніченням колонієутворюючої активності стромальних кістковомозкових клітин-попередників і частковою втрагою їх здатності до підтримки кровотворення в культурі у складі фідерного шару.

Ключові слова: гемопоетичні клітини-попередники, культура клітин *in vitro* та *in vivo*, гемопоетичне мікрооточення, внутрішнє хронічне опромінення, радіонуклід ⁹⁰Sr.

Кровотворна система є однією з найбільш життєво важливих у організмі людини і тварин. Її пул підтримується за рахунок гемопоетичних стовбурових клітин та їхніх найближчих нащадків — клітин-

* Борбуляк Ірина Зіновіївна, e-mail: borbulyak@yahoo.com
© Борбуляк І. З., Родіонова Н. К., Білько Н. М., 2012

попередників, які забезпечують рівновагу шляхом зміни у проліферації та диференціюванні кровотворних клітин [1]. Проте рівновага може бути порушеною внаслідок впливу різноманітних екзогенних чинників, у тому числі дії іонізуючої радіації, оскільки гемопоетична система характеризується високим ступенем радіочутливості [2]. Так, на сьогодні достатньо повно досліджена первинна реакція гемопоетичних клітин і кровотворної системи лабораторних тварин на дію гострого і хронічного опромінення [3]. Проте недостатньо вивченими залишаються наслідки внутрішнього впливу радіонуклідів на організм, і насамперед, на первісні відділи кровотворення, оскільки у віддалені після Чорнобильської катастрофи терміни продовжується надходження радіонуклідів із продуктами харчування та їх накопичення в організмі [4]. Тому метою даного дослідження було визначити особливості функціонування гемопоетичної системи щурів в умовах внутрішнього опромінення ^{90}Sr при його одноразовому та тривалому надходженні.

Матеріали та методи дослідження. У якості моделі внутрішнього хронічного опромінення були використані білі лабораторні щурі Wistar, яким було введено ^{90}Sr . Тварини були розподілені на три групи: 1 — тривале введення ^{90}Sr , 2 — одноразове введення ^{90}Sr , 3 — контроль. Визначали радіоактивність скелету щурів на основі питомої радіоактивності кісткової тканини, а також розраховували поглинуту дозу у скелеті та кістковому мозку щурів. На 180-ту добу дослідження радіоактивність їх скелету становила 2 кБк, поглинута доза у скелеті до кінця періоду затравки складала 1 Гр. З метою вивчення функціональної активності гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку щурів було проведено дослідження ефективності їх колонієутворення (ЕКУ) у культурі клітин у дифузійних камерах *in vivo*. Для виявлення загальної кількості циркулюючих клітин-попередників у організмі опромінених ^{90}Sr щурів було проведено культивування мононуклеарів периферичної крові у культуральній системі *in vivo* та здійснено оцінку показника їх ЕКУ. Для оцінки колонієутворюючої здатності стромальних клітин кісткового мозку проводили їх культивування у культуральній системі *in vitro*. Функціональну оцінку стромальних клітин проводили за здатністю отриманих із них фідерних шарів підтримувати кровотворення у культурі *in vitro*.

Результати та їх обговорення. Аналіз даних, отриманих у результаті культивування гемопоетичних клітин опромінених щурів, показав, що в культурі клітин у дифузійних камерах *in vivo* у 1-й групі тварин визначалося чітко виражене, порівняно з нормою, пригнічення коло-

нієутворення. ЕКУ гранулоцитарних клітин-попередників щурів 1-ї групи знаходилась у межах від 4 до 7 клонів і становила $6,5 \pm 1,2$ на 1×10^5 експлантованих клітин; у 2-й групі показники колонієутворення дорівнювали $10,8 \pm 0,5$ на 1×10^5 експлантованих клітин ($p < 0,05$). У якості контролю було взято показник ЕКУ клітин кісткового мозку неопромінених щурів. У цій групі ефективність клонування клітин кісткового мозку становила $13,4 \pm 2,6$ на 1×10^5 клітин. Таким чином, отримані результати свідчили про те, що ефективність клонування грануломоноцитарних клітин-попередників у опромінених щурів була глибоко пригнічена.

Було виявлено суттєве збільшення кількості циркулюючих клітин-попередників у периферичній крові опромінених щурів. Так, у групі контролю кількість колонієутворюючих одиниць (КУО), виявлених при культивуванні мононуклеарів периферичної крові, становила $0,62 \pm 0,49$. Для 1-ї групи тварин цей показник був у 7 разів вищим та складав $4,22 \pm 0,84$; при цьому у периферичній крові лабораторних тварин 2-ї групи було виявлено менш суттєве підвищення кількості циркулюючих клітин-попередників — показник ЕКУ складав $2,26 \pm 0,50$ ($p < 0,05$). Тобто спостерігалось часткове відновлення параметрів кровотворення тварин цієї групи. У той же час хронічне внутрішнє опромінення ^{90}Sr зумовлювало суттєві порушення у системі гемопоезу, що проявлялися у високих показниках ЕКУ клітин-попередників, які циркулюють у кровоносному руслі.

Стромальні клітини кісткового мозку, порівняно з гемопоетичними клітинами-попередниками, є більш радіорезистентними, проте загалом це гетерогенна група клітин, серед яких існують популяції клітин із вищим ступенем радіочутливості. У результаті культивування клітин кісткового мозку щурів, опромінених ^{90}Sr внаслідок його одноразового та тривалого введення, та групи контролю було виявлено затримку колонієутворення стромальними клітинами-попередниками кісткового мозку опромінених тварин. Зокрема, у групі контролю перші колонії з'являлися вже на 2-гу добу, тоді як культивування клітин кісткового мозку щурів 1-ї групи мало наслідком утворення перших колоній у культурі аж на 4-ту добу культивування. Разом з тим, культивування клітин кісткового мозку тварин 2-ї групи не відображало суттєвого зниження колонієутворюючої здатності стромальних клітин-попередників опромінених щурів порівняно з тваринами групи контролю — перші колонії з'являлися на другу добу культивування, а до закінчення терміну культивування на 14-ту добу показник КУОф у цій групі становив

4,30±0,48 на 1 млн культивованих клітин. При цьому спостерігалось суттєве зниження цього показника у 1-й групі тварин — він становив 3,30±0,48 КУОф на 1 млн культивованих клітин, порівняно з контрольним рівнем 5,10±0,74 КУОф ($p < 0,05$).

При дослідженні здатності фідерних шарів зі стромальних клітин кісткового мозку опромінених тварин було виявлено знижений показник ЕКУ гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку у культуральній системі, де фідерним шаром слугують стромальні клітини, отримані із кісткового мозку опромінених тварин 1-ї групи. Так, показник КУО у цій групі становив 9,60±0,97 на 1×10^5 культивованих клітин, тоді як контрольне значення КУО складало 15,02±0,84, тобто спостерігалось зниження у 1,5 раза здатності стромальних клітин до підтримки кровотворення у культурі ($p < 0,05$). У той же час стромальний шар, сформований клітинами кісткового мозку тварин 2-ї групи, за здатністю до підтримки кровотворення у культурі виявився близьким до контрольного (13,60±0,93). Отже, при одноразовому введенні ^{90}Sr показник функціональної активності стромальних клітин-попередників кісткового мозку у віддалені терміни після введення наближався до норми.

Висновки. Таким чином, у роботі проведена комплексна оцінка складових кровотворної системи, починаючи із стовбурової клітини та її найближчих нащадків (кровотворних, циркулюючих та стромальних клітин-попередників), і закінчуючи зрілими клітинами в організмі тварини, яка зазнала впливу внутрішнього опромінення ^{90}Sr . Представлені результати щодо морфофункціональних особливостей кровотворних клітин в умовах дії ^{90}Sr є співставними з даними, отриманими раніше дослідниками щодо впливу радіаційної компоненти на функціонування первісних відділів гемопоезу людини [5], та можуть бути використані при подальшій інтерпретації показників стану кровотворення у осіб, що мешкають на забруднених радіонуклідами територіях. Виявлені особливості кровотворення у лабораторних тварин при внутрішньому надходженні ^{90}Sr є застереженням у випадку появи подібних змін у кровотворенні опромінених осіб.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Fliedner T. M. Hematopoietic cell renewal systems: mechanisms of coping and failing after chronic exposure to ionizing radiation / T. M. Fliedner, D. H. Graessle // *Radiat. Environ. Biophys.* — 2007. — Vol. 47. — P. 63–69.
2. Dainiak N. Recommendations for assessment of consequences and health risks of low-level exposure to ionizing radiation / N. Dainiak // *Health Phys.* — 2011. — Vol. 100 (3). — P. 311–312.

3. Радіобіологічні ефекти у ссавців: погляд через 20 років після аварії на ЧАЕС / Я. Серкіз, А. Липська, І. Дрозд, Н. Родіонова // Вісн. НАН України. — 2006. — № 4. — С. 14–27.
4. Корзун В. Н. Харчування в умовах широкомасштабної аварії та її наслідків / В. Н. Корзун, В. І. Сагло, А. М. Парац // Укр. мед. часопис. — 2002. — № 11–12. — С. 99–105.
5. Білько Н. М. Кровотворні клітини-попередники при радіаційному опроміненні (експериментально-клінічне дослідження) : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 03.00.01 / НАН України, Ін-т експ. патол., онкол. і радіобіол. — К., 1998. — 31 с.

Стаття надійшла до редакції 29.05.2012.

И. З. Борбуляк¹, Н. К. Родионова², Н. М. Білько¹

*¹Национальный университет “Киево-Могилянская академия”,
ул. Г. Сковороды, 2, г. Киев, 04655*

*²Институт экспериментальной патологии, онкологии
и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины,
ул. Васильковская, 45, г. Киев, 03022*

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ВНУТРЕННЕГО ОБЛУЧЕНИЯ СТРОНЦИЕМ-90

В работе исследованы особенности функционирования кроветворной системы на уровне стволовой клетки и клеток-предшественников крыс при воздействии радионуклида ^{90}Sr в условиях его длительного и однократного введения. В результате культивирования кроветворных клеток-предшественников животных, подвергшихся внутреннему облучению ^{90}Sr , выявлены такие особенности как угнетение колониеобразующей способности кроветворных клеток-предшественников костного мозга в культуре и появление циркулирующих клеток-предшественников в периферической крови, что указывает на нарушение основ гемопоэза. Показано, что в результате действия радионуклида ^{90}Sr происходит повреждение гемопоэтического микроокружения, которое характеризуется угнетением колониеобразующей активности стромальных костномозговых клеток-предшественников и частичной потерей их способности к поддержанию кроветворения в культуре в составе фидерного слоя.

Ключевые слова: *гемопоэтические клетки-предшественники, культура клеток in vitro и in vivo, гемопоэтическое микроокружение, внутреннее хроническое облучение, стронций-90.*

I. Z. Borbulyak¹, N. K. Rodionova², N. M. Bilko¹

*¹National University "Kyiv-Mohyla Academy",
str. Skovoroda, 2 Kyiv, 04655*

*²R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine,
Vasylkivska str., 45, Kyiv, 03022*

**COMPLEX ASSESSMENT OF HEMATOPOIETIC
SYSTEM STATE OF LABORATORY ANIMALS UNDER
INTERNAL STRONTIUM-90 IRRADIATION**

Functional activity of the rat hematopoietic system under prolonged exposure to ⁹⁰Sr was assessed. It was shown using diffusion capsule model that prolonged internal exposure to ⁹⁰Sr has detrimental effects on hematopoietic stem cells and their progenitors. The most common effects include inhibition of the CFU activity of bone marrow hematopoietic progenitor cells in culture, increase in level of circulating progenitor cells in the peripheral blood. Apart from that, exposure to ⁹⁰Sr induces inhibition of the CFU activity of stromal bone marrow progenitor cells and inhibition of their hematopoietic stimulatory capacity as feeder layer cells, which are indicative of the hematopoietic microenvironment disturbance.

Key words: *hematopoietic progenitor cells, in vitro and in vivo cell culture, hematopoietic microenvironment, internal chronic radiation exposure, Strontium-90.*