

Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Ірина Руссу

**Експериментальні підходи
у вивченні біологічної дії іонізуючого
випромінювання**

Навчально-методичний посібник

Київ 2020

УДК 612.019.482+576.08/.535+57.085.23

Рецензенти:

Талько В. В., доктор медичних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України, директор Інституту експериментальної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»

Білько Д. І., кандидат біологічних наук, доцент кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могиланська академія»

Руссу І. З.

Експериментальні підходи у вивченні біологічної дії іонізуючого випромінювання : навч.-метод. посіб. / І. З. Руссу. – К., 2020. – 82 с.

У навчально-методичному посібнику представлено основні методи, що застосовуються при дослідженні наслідків дії іонізуючої радіації на живий організм. Посібник рекомендовано студентам-біологам, фахівцям радіобіології, лабораторної діагностики і медицини.

УДК 612.019.482+576.08/.535+57.085.23

Схвалено Вченою радою факультету природничих наук Національного університету «Києво-Могиланська академія» (протокол №4 від 12 червня 2020 р.)

© Руссу І. З., 2020
© НаУКМА, 2020

ЗМІСТ

Вступ.....	4
1. Біохімічні методи дослідження радіаційного ушкодження.....	5
2. Методи визначення наслідків опромінення на рівні ДНК.....	20
3. Цитогенетичні методи оцінки дії іонізуючої радіації	30
4. Дослідження морфології клітин при радіаційному ураженні	41
5. Методи вивчення клоногенної активності клітин	46
6. Визначення форми загибелі клітин при опроміненні.....	60
7. Дослідження кількісних змін у тканинах при дії іонізуючої радіації.....	65
Перелік умовних скорочень	70
Список використаних джерел	71
Додатки.....	79

ВСТУП

Дослідження дії іонізуючої радіації на біологічні системи є актуальним питанням сьогодення, оскільки джерела випромінювання у доволі значній кількості знаходяться безпосередньо у довкіллі, створюючи природній радіаційний фон, виникають унаслідок професійної діяльності людини та широко застосовуються у радіотерапії [8, 37].

Радіаційний чинник суттєвою мірою впливає на живі системи на всіх рівнях їхньої організації – молекулярному, у тому числі на рівні ДНК, субклітинному, клітинному, на рівні тканин, систем та органів, а також на рівні всього організму та популяції.

До основних наслідків дії іонізуючої радіації належать зміни у структурі та активності окремих молекул, у тому числі ферментів та ліпідів мембран, порушення у послідовності ДНК, зокрема, точкові генні мутації, розриви ланцюгів ДНК, зсув рамки зчитування [18, 21]. Зазвичай у опромінених клітинах порушується окисний гомеостаз внаслідок утворення великої кількості вільних радикалів та ураження ендогенних антиоксидантних систем. На рівні хромосом можуть спостерігатися аберації та фрагментації, а на клітинному рівні загалом – зміна морфології та функціональної активності клітин, їх репродуктивна та інтерфазна загибель. На рівні всього організму дія іонізуючої радіації може спричинити імунологічні та нейроендокринні розлади, системне запалення та злоякісну трансформацію клітин [1, 22].

Виявлення наслідків опромінення, їх оцінка та всебічний аналіз сприяють кращому розумінню механізмів дії іонізуючої радіації, а результати таких досліджень можуть стати підґрунтям для розробки засобів захисту організму від небажаних наслідків радіаційного ураження.

Цей посібник є спробою узагальнення даних щодо найпоширеніших методів, які застосовуються на сьогодні для оцінки біологічної дії іонізуючої радіації. Він буде корисним для дослідників у галузях клітинної біології, радіобіології, гематології, цитогенетики та лабораторної діагностики.

1. Біохімічні методи дослідження радіаційного ушкодження

До основних наслідків, що виникають при дії іонізуючої радіації у клітинах та проявляються на рівні окремих молекул, а саме, білків, є втрата активності ферментів та зміна структури окремих білкових молекул. Серед них виділяють ушкодження одиничних амінокислот, розриви поліпептидних ланцюгів, порушення їхньої вторинної і третинної структури, утворення зшивок і агрегатів. У зв'язку з цим було розроблено ряд методів, що дозволяють оцінювати зміни у структурі тих чи інших білків при опроміненні, а також їх загальний метаболізм.

Крім того, під час дії іонізуючого випромінювання зазвичай порушується окисний гомеостаз у тканинах організму внаслідок утворення великої кількості вільних радикалів та ураження ендогенних антиоксидантних систем. Кількість активних форм кисню та сполук, утворених у результаті пероксидного окиснення, буде визначатися активністю систем, що повинні регулювати їх рівень [38].

Антиоксидантні процеси в організмі забезпечуються рядом ферментів, а також вітамінами – аскорбіновою кислотою, ретинолом, токоферолом, каротиноїдами. Тому серед показників, які досліджують з метою виявлення наслідків дії іонізуючої радіації, велику значимість мають дані щодо активності основних антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (1.15.1.1.), каталази (1.11.1.6.), глутатіон-пероксидази (1.11.1.9.), а також ряду інших пероксидаз.

1.1. Визначення активності супероксиддисмутази

Внаслідок дії іонізуючої радіації у клітині, поряд з іншими активними формами кисню, зазвичай утворюється супероксидний радикал. Супероксиддисмутаза, у свою чергу, сприяє перетворенню двох молекул супероксидного радикалу на молекулу пероксиду водню та молекулярний кисень.

Слід зазначити, що дослідження супероксидного радикалу в біологічних системах є доволі складним завданням, оскільки у нього висока реакційна здатність та короткий період напівіснування. У системі *in vitro* визначення здійснюється за умов високого рівня рН та із застосуванням ксантиноксидази [33].

Принцип методу

Метод визначення активності супероксиддисмутази базується на здатності цього ферменту інгібувати реакцію відновлення нітросинього тетразолію супероксидним радикалом, утвореним *in vitro* в системі ксантин–ксантиноксидаза [14].

Матеріали та реактиви

Спочатку готують 0,05 М натрій-фосфатний буфер (рН 7,8) з 1 мМ EDTA. Для цього 6 г дигідрофосфату натрію і 292 мг EDTA розчиняють у 500 мл дистильованої води та доводять рН до 7,8 за допомогою 0,1 М розчину гідроксиду натрію. Об'єм розчину доводять до 1 л дистильованою водою.

Після цього готують субстратну суміш безпосередньо перед дослідженням шляхом додавання до 100 мл буфера 1,52 мг ксантину, 460 мкг феназинметасульфату та 5,71 мг нітросинього тетразолію, а також 1 г желатину.

Безпосередньо перед дослідженням готують робочий розчин ферменту із розчину очищеної ксантиноксидази (50 МО/мл), взявши 5 мл цього розчину та 70 мкл 0,05 М натрій-фосфатного буфера.

Об'єкт дослідження

Об'єктом для дослідження слугують тканини опромінених тварин, наприклад, клітини печінки, з яких отримують цитозольну фракцію шляхом диференційного центрифугування.

Хід дослідження

У дослідну та контрольну кювету вносять по 3 мл субстратної суміші, прогрівають при 37 °С протягом 5 хв. У контрольну кювету вносять 100 мкл води, у дослідну – 100 мкл цитозольної фракції клітин печінки та зразу після цього додають по 5 мкл робочого розчину ксантиноксидази. Протягом наступних 10 хв. слід зареєструвати зміну екстинкції проб при довжині хвилі 540 нм проти інкубаційного середовища, яке не містить ксантину і ксантиноксидази.

Оцінка результатів

У контрольному зразку між 5-ю та 10-ю хв. спостережень рівномірно зростає вміст формазану завдяки генерації супероксидного радикалу системою ксантин–ксантиноксидаза, який, у свою чергу, зумовлює утворення формазану. Це проявляється у лінійному рості екстинкції. У той же час у дослідному зразку присутність супероксиддисмутази сповільнює утворення цієї речовини.

У результаті проведених досліджень визначають активність супероксиддисмутази за ступенем пригнічення процесу утворення забарвленого продукту реакції. За одиницю активності ферменту

приймають таку його кількість, яка здатна на 50% інгібувати утворення формагану під впливом супероксидного радикалу.

1.2. Визначення активності каталази

Унаслідок дії певних факторів, зокрема іонізуючої радіації, у клітинах організму ссавців може суттєво знижуватися активність каталази. Іншими чинниками, які також можуть зумовлювати зниження активності каталази, є інтоксикація організму та запальні процеси [43].

Принцип методу

Визначення активності каталази базується на її здатності розщеплювати пероксид водню на воду і молекулярний кисень. Швидкість цієї реакції визначається за ступенем зниження екстинкції реакційної суміші, у якій присутній пероксид водню та каталаза, отримана із клітин опромінених тварин.

Матеріали та реактиви

Спочатку готують 0,1 М калій-фосфатний буфер із рН 7,4. Для цього 13,6 г дигідрофосфату калію розчиняють у 500 мл дистильованої води. Після цього 0,1 М розчином гідроксиду натрію доводять рН до 7,4. До розчину додають воду до обсягу 1 л.

Безпосередньо перед дослідженням на основі цього буферного розчину готують 0,3% розчин пероксиду водню шляхом розведення із пергідролу. Також для подальших досліджень необхідна 50% трихлороцтова кислота.

Об'єкт дослідження

Об'єктом досліджень слугують еритроцити тварин, яких було піддано дії іонізуючої радіації.

Хід дослідження

Отримують периферійну кров експериментальних тварин, виділяють із неї еритроцити та здійснюють їх гемоліз додаванням дистильованої води. У дослідну пробірку до 2,5 мл 0,3% розчину пероксиду водню додають 200 мкл гемолізату еритроцитів. У контрольну пробірку додають 2,5 мл пероксиду водню, 0,3 мл 50% трихлороцтової кислоти та 200 мкл гемолізату еритроцитів.

За кімнатної температури протягом 10 хв. у дослідному зразку відбувається реакція розщеплення пероксиду водню каталазою, після чого її зупиняють додаванням 0,3 мл 50% розчину трихлороцтової кислоти.

Проводять центрифугування розчинів протягом 10 хв. при 3000 об./хв. (1310 g) та вилучають супернатант, який фотометрують при довжині хвилі 260 нм проти 5% розчину трихлороцтової кислоти.

Оцінка результатів

Активність каталази визначають за різницею екстинкції у дослідному та контрольному зразках з урахуванням молярного коефіцієнта світлопоглинання пероксиду водню за даних умов [14].

1.3. Визначення вмісту малонового діальдегіду

Як відомо, унаслідок впливу іонізуючої радіації проходить процес радіолізу води та утворюється велика кількість активних форм кисню. У

свою чергу, ці сполуки запускають процеси окиснення основних молекул, що входять до складу мембран, зокрема, жирних кислот [21].

Загалом продукти окиснення жирних кислот, а також утворені гідроперекиси, альдегіди та кетони іноді називають ліпідними радіотоксинами, що запускають подальший каскад реакцій, які виникають при радіаційному ураженні.

Накопичення у організмі значної кількості продуктів пероксидного окиснення зумовлює виснаження систем антиоксидантної дії.

Первинними продуктами окиснення жирних кислот є гідроперекиси (дієнові кон'югати), які згодом перетворюються на вторинні (малоновий диальдегід) та третинні (шифові основи) продукти пероксидного окиснення ліпідів [55]. Слід зазначити, що процеси пероксидного окиснення проходять у клітині і в нормі, проте це відбувається контрольовано завдяки певним ферментам та не становить небезпеки для нормального метаболізму. У той же час неферментативний шлях окиснення, зумовлений, наприклад, іонізуючою радіацією, запускає каскад реакцій радіаційного ушкодження та може сприяти злоякісній трансформації опромінених клітин.

Малоновий диальдегід (МДА) поруч із деякими іншими продуктами пероксидного окиснення ліпідів є найчастіше використовуваним біомаркером оксидативного стресу [57]. Відомо, що малоновий диальдегід зменшує проникність та погіршує плинність мембран, спричиняючи появу зшивок між ліпідами та білками, що зумовлює порушення таких процесів, як ендо- та екзоцитоз і міграція клітин.

Принцип методу

Визначення вмісту МДА базується на тому, що у кислому середовищі при температурі 95 °С МДА реагує з 2-тіобарбітуровою

кислотою з утворенням комплексу, що має червоне забарвлення та володіє максимумом поглинання при довжині хвилі 532 нм, а також здатний до флуоресценції [25] .

Матеріали та реактиви

Для визначення вмісту МДА необхідний розчин PBS, трихлороцтова кислота та 2-тіобарбітурова кислота.

Об'єкт дослідження

Об'єктом для досліджень виступають клітини, які було піддано дії іонізуючої радіації. Джерелом клітин можуть бути тканини опромінених тварин або клітинні лінії, які опромінюють *in vitro*. Крім того, визначення вмісту МДА може проводитись у сироватці венозної крові осіб, що були піддані дії іонізуючої радіації.

Хід дослідження

Клітини вилучають шляхом трипсинізації. Готують суспензію клітин із концентрацією 1 млн./мл на основі розчину PBS. У дослідну пробірку вносять 100 мкл суспензії, 400 мкл розчину PBS та 200 мкл 17% трихлороцтової кислоти. У контрольну пробірку вносять 500 мкл фізіологічного розчину та 200 мкл 17% трихлороцтової кислоти. Після осадження білків проводять центрифугування протягом 15 хв. при 1500 об./хв. (325 g). Відбирають 500 мкл супернатанту та додають 250 мкл 0,8% 2-тіобарбітурової кислоти. Після перемішування розчин у закритих пробірках інкубують на киплячій водяній бані протягом 10 хв. для розвитку забарвлення.

Оцінка результатів

Для детекції сигналу застосовують спектрофотометр та проводять визначення екстинкції дослідного і контрольного зразка при довжині хвилі 532 нм. Концентрацію МДА визначають за співвідношенням цих показників та вимірюють у мкмоль/л.

Слід проте зауважити, що результати таких досліджень не можуть вважатися високоспецифічними, оскільки ряд інших речовин із карбонільними групами, наприклад, поліненасичені жирні кислоти, здатні давати таку ж реакцію із 2-тіобарбітуровою кислотою. Тому доцільним є попереднє відокремлення саме сполук із МДА за допомогою високоефективної рідинної хроматографії для значного підвищення специфічності цього методу.

1.4. Дослідження метаболізму колагену як структурного білка сполучної тканини

Колаген як основний білок сполучної тканини ссавців знаходиться в організмі у доволі високій кількості та може зазнавати ушкодження при впливі іонізуючої радіації. Стан пулу колагену в опроміненому організмі може свідчити про ступінь ураження сполучної тканини загалом та функціонування її окремих компартментів зокрема, у тому числі кровотворного мікрооточення.

Активність колагенази може виступати показником стану метаболічних процесів, пов'язаних із колагеном. Цей фермент бере активну участь у катаболізмі колагену. Зазвичай відзначають певні відмінності активності колагенази залежно від характеру ураження сполучної тканини.

Гідроксипролін є амінокислотою, що виявляється зазвичай лише у складі колагену та відіграє вирішальну роль у підтримці стабільності його структури. Вміст гідроксипроліну та його фракцій характеризує загальний метаболізм колагену, який відбувається у сполучній тканині [53]. При ряді патологічних станів відзначають зміни цього показника, а саме, підвищення концентрації вільного гідроксипроліну та зниження білковозв'язаного, що свідчить про переважання процесів розпаду колагену над синтезом.

1.4.1. Визначення активності колагенази

Принцип методу

Даний метод базується на виявленні вільного гідроксипроліну, що вивільняється колагеназою досліджуваного зразка сироватки шляхом розщеплення колагену із реакційної суміші. В основі методу лежить вимірювання оптичної щільності червоного хромогену, що утворюється при окисненні та декарбоксилуванні вільного гідроксипроліну та взаємодії продукту із парадиметиламінобензальдегідом.

Зміна активності колагенази зазвичай виступає маркером порушень, пов'язаних із функціонуванням колагену.

Матеріали та реактиви

Для дослідження колагеназної активності зарані готують буфер, окислювач і барвник.

Приготування ацетат-цитратного буфера передбачає змішування 30 г ацетату натрію, 8,5 г NaOH, 12,5 г лимонної кислоти та 3 мл льодяної оцтової кислоти. Обсяг буфера доводять до 250 мл дистильованою водою (рН має бути 6,0).

Для отримання окислювача 8 мл ацетат-цитратного буфера змішують із 107 мг хлораміну Б, 1 мл пропанолу та 1 мл дистильованої води. Зберігають у темному посуді протягом не більше 7 днів.

З метою приготування барвника змішують 1,5 г парадиметил-амінобензальдегіду, 10 мл 3,15 М перхлоратної кислоти і доводять обсяг до 20 мл пропанолом.

Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження слугує сироватка крові дослідних тварин або осіб, що зазнали впливу іонізуючої радіації.

Хід дослідження

Активність колагенази визначають за методом S. Lindy, J. Halme [45].

Сироватку крові експериментальних тварин отримують наступним чином. Негепаринізованим шприцом проводять забір периферійної крові із правого передсердя, переносять її у негепаринізовану пробірку та поміщають на 10 хв. у термостат при 37 °С. Після цього вміст пробірки центрифугують 10 хв. на центрифuzі при 1500 об./хв. (325 g). Отриману сироватку переносять у стерильну пробірку.

Для приготування дослідної проби у пробірку для гідролізу вносять 15 мг колагену, 4 мл буферу трис-НСІ, 1 мл 0,03 М розчину хлориду кальцію та 1 мл сироватки. У контрольну пробу замість сироватки додають 1 мл дистильованої води. Після цього проводять інкубацію при 37 °С протягом 20 год. Вміст фільтрують, додають 5 мл 6 н розчину НСІ та проводять гідроліз при 107 °С протягом 16 год. Випарюють вміст із відкритих пробірок при 136 °С за допомогою гліцеринової бані.

Проби охолоджують та визначають їх рН; у разі потреби доводять рН до 7 за допомогою 1 н NaOH чи 1 н HCl. Обсяг доводять дистильованою водою до 5 мл. Додають 0,25 г активованого вугілля та фільтрують через 15 хв.

Для подальшого дослідження готують чотири зразки. У першу пробірку (дослід) вносять 1 мл розчину із дослідної проби, у другу (контроль досліду) – із контрольної. У третю (стандарт) – 2 мл стандартного розчину гідроксипроліну, розведеного заздалегідь у 10 разів. У четверту (загальний контроль) – 2 мл дистильованої води.

У кожен зразок додають 1 мл окислювача, закривають та інкубують 20 хв. Після цього вносять по 2 мл барвника та струшують. Інкують 20 хв. у термостаті при 60 °С, 5 хв. охолоджують до кімнатної температури у проточній воді.

Оцінка результатів

За допомогою спектрофотометра визначають вміст гідроксипроліну та на основі цього – активність колагенази у контрольних та дослідних зразках, що вимірюється у мкмоль/л×год. Вимірювання екстинкції (E) здійснюють при довжині хвилі 555 нм.

Активність колагенази (АК) розраховують за формулою

$$AK = ((E_{\text{дослід}} - E_{\text{контроль досліду}}) \times 5000) / (E_{\text{стандарт}} \times 131),$$

де 5000 – коефіцієнт, що включає перерахунок кількості та концентрації стандартного розчину, 131 – молярна маса гідроксипроліну (г/моль).

Вища активність колагенази у сироватці крові опромінених тварин буде свідчити про зміщення рівноваги між процесами синтезу і розпаду колагену у бік розпаду, що в підсумку дозволяє оцінити ступінь ураження сполучної тканини.

1.4.2. Визначення фракцій гідроксипроліну

Вивчення концентрацій вільної і білковозв'язаної фракцій гідроксипроліну, тобто співвідношення між синтезом і розпадом колагену, використовується для оцінки глибини метаболічних порушень при певних патологічних станах. Зміна цих показників метаболізму колагену може опосередковано свідчити про ушкодження сполучної тканини під дією іонізуючого опромінення [53].

Принцип методу

Метод визначення гідроксипроліну, аналогічно до попереднього, базується на вимірюванні оптичної щільності червоного хромогену, що утворюється у реакціях із гідроксипроліном.

Матеріали та реактиви

Для дослідження фракцій гідроксипроліну необхідний ацетат-цитратний буфер, окислювач та барвник, аналогічні до вищеописаних.

Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження слугує сироватка крові дослідних тварин або осіб, що зазнали впливу іонізуючої радіації.

Хід дослідження

Фракції гідроксипроліну виділяють за методом J. Frey [42], вміст у зразках гідроксипроліну визначають за Н. Stegemann [56].

Фракцію вільного гідроксипроліну вилучають наступним чином. До 1 мл сироватки периферійної крові додають 4 мл етилового спирту (96%) та інкубують 1 год. при 4 °С. Центрифугують 15 хв. при 6000 об./хв. (5230 g). Вилучають надосадову рідину, фільтрують та

переносять у пробірку для гідролізу. Потім двічі додають до осаду по 1 мл етилового спирту, центрифугують за тих же умов та вилучають надосадову рідину. Всю отриману рідину випарюють при 136 °С на гліцериновій бані.

Для вилучення фракції білковозв'язаного гідроксипроліну до осаду додають 6 н розчин HCl та проводять гідроліз щонайменше протягом 16 год. при 107 °С. Випарюють вміст із відкритих пробірок при 136 °С за допомогою гліцеринової бані.

Після цього в обидва зразки додають 4 мл дистильованої води та визначають їх рН; у разі потреби доводять рН до 7 за допомогою 1 н NaOH чи 1 н HCl. Обсяг доводять дистильованою водою до 5 мл. Додають 0,25 г активованого вугілля та фільтрують через 15 хв.

У пробірку відбирають 2 мл дослідної проби (у контрольну – 2 мл води). У кожен зразок додають 1 мл окислювача, закривають та інкубують 20 хв. Після цього вносять по 2 мл барвника та струшують. Інкують 20 хв. у термостаті при 60 °С, 5 хв. охолоджують до кімнатної температури у проточній воді.

Оцінка результатів

Виміри екстинкції (E) проводять на спектрофотометрі при довжині хвилі 555 нм.

Розрахунок вмісту гідроксипроліну (ВГ), що вимірюється в мкмоль/л, в обох випадках проводять за формулою:

$$ВГ = (E_{\text{дослід}} \times 5000) / (E_{\text{стандарт}} \times 131),$$

де 5000 – коефіцієнт, що включає перерахунок кількості та концентрації стандартного розчину, 131 – молярна маса гідроксипроліну (г/моль).

При виявленні переважання фракції вільного гідроксипроліну над білковозв'язаним роблять висновки про підвищене руйнування молекул

колагену, а високий вміст білковозв'язаного гідроксипроліну свідчить про активний синтез колагену.

Джерела

Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике. Под ред. А. И. Карпищенко. ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 472 с.

Серкіз Я. 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.

Шелест Д. В., Колотій О. В., Свиридова К. О., Гарманчук Л. В. Рівень малонового діальдегіду в культивованих клітинах за впливу сполук зі стимулюючою та інгібуючою дією на проліферацію. // ScienceRise: Biological Science. – 2016. – N 3(3). – С. 61-64.

Bolann BJ, Tangerås A, Ulvik RJ. Determination of manganese superoxide dismutase activity by direct spectrophotometry. // Free Radic Res. – 1996. – Vol. 25(6). – P.541-546.

Eltahawy N. Synergistic effect of aluminum and ionizing radiation upon ultrastructure, oxidative stress and apoptotic alterations in paneth cells of rat intestine / N. Eltahawy, S. Elsonbaty, S. Abunour, W. Zahran // Environ Sci Pollut Res Int. – 2017. – Vol. 24(7). – P. 6657-6666.

Frey J, Chamson A, Raby N. Separation of amino acids using ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography with special reference to collagen hydrolysate. // Amino Acids. –1993. – Vol. 4(1-2). – P. 45-51.

Hadwan MH, Ali SK. New spectrophotometric assay for assessments of catalase activity in biological samples. // Analytical Biochem. – 2018. – Vol. 542. – P. 29-33.

Lindy S., Halme J., Turto H. et al. Collagenolytic activity in rheumatoid synovial tissue // Clin. Chim. Acta. – 1973. – Vol. 47, N 2 – P. 153–157.

Siddiqi N. J. Investigation into the distribution of total, free, peptide-bound, protein-bound, soluble- and insoluble-collagen hydroxyproline in various bovine tissues / N. J. Siddiqi, A. S. Alhomida // J Biochem Mol Biol. – 2003. – Vol. 36(2). – P. 154–158.

Skalicka Z. Indicators of oxidative stress after ionizing and/or non-ionizing radiation: superoxid dismutase and malondialdehyde / Z. Skalicka, F. Zolzer, L. Beranek, J. Racek // J Photochem Photobiol B. – 2012. – Vol. 117. – P. 111-114.

Stegemann H, Stalder K. Determination of hydroxyproline. // Clin Chim Acta. – 1967. – Vol. 18(2). – P. 267-273.

Tsikias D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. // Analytical Biochem. – 2017. – Vol. 524. – P. 13-30.

2. Методи визначення наслідків опромінення на рівні ДНК

Іонізуюча радіація може ушкоджувати генетичний матеріал клітин напряду або через опосередкований вплив на ДНК продуктів радіолізу води; такому ж впливу можуть піддаватися молекули РНК та інші біополімери, наявні у клітині.

Прямий та непрямий вплив іонізуючої радіації на ДНК зумовлює ряд ушкоджень, таких як одностркові розриви ланцюгів, двостркові розриви ланцюгів, ушкодження основ та зшивки ДНК-ДНК чи ДНК-білок [15].

Слід також зазначити, що такі ушкодження генетичного матеріалу можуть спостерігатися і за звичайних умов, коли на ДНК діють ендогенні чинники – активні форми кисню, що утворюються, наприклад, під час окисативного дезамінування.

Оцінку ушкодження та репарації ДНК можна здійснювати кількома способами. Серед них комет-метод, тобто гель-електрофорез одиничних клітин, флуориметричний аналіз розкручування ДНК (FADU), метод лужної елюції ДНК із фільтра (AFE) та метод оцінки одностркових розривів, який отримав назву Fast Micromethod [58].

Серед недоліків даних методів є те, що, наприклад, комет-метод не дозволяє досліджувати зразки тканин, лише поодинокі клітини. Натомість метод FADU не дає змоги тривалого дослідження кінетики розкручування ДНК та потребує значної кількості клітин. У той же час метод лужної елюції AFE володіє дуже високою чутливістю, проте потребує багато часу, кропіткий та дозволяє одночасно аналізувати лише

обмежену кількість зразків. Проте усі зазначені методи здатні належним чином оцінювати ушкодження ДНК, а вибір певного методу залежить від задач конкретного експерименту.

2.1. Оцінка одностранных та двостранных разрывов ДНК за допомогою барвника PicoGreen

Наслідками дії іонізуючого випромінювання на ДНК, серед іншого, є поява одностранных та двостранных разрывов ланцюга нуклеїнових кислот, що лежать в основі порушення процесів реплікації та транскрипції.

Відомо, що частота утворення одностранных разрывов ДНК, як і ушкодження азотистих основ, лінійно залежить від дози опромінення у доволі широкому діапазоні доз.

Одностранные разрывы ДНК зазвичай виправляються шляхом ексцизійної репарації завдяки тому, що другий ланцюг слугує матрицею для відновлення пошкоджених нуклеотидів. Двостранные разрывы ДНК та порушення у структурі азотистих основ значно небезпечніші для клітини, оскільки їх складніше репарувати, тож наслідком такого ушкодження можуть стати суттєві геномні перебудови. У результаті цих процесів можуть спостерігатися арешт клітинного циклу, затримка поділу клітини, апоптоз та ряд інших наслідків.

Варто зазначити, що на рівні ДНК одним із найтипівіших наслідків дії іонізуючої радіації, зокрема, гамма- та рентгенівського випромінювання, є саме одностранные разрывы ДНК, у той час як двостранные разрывы чи окиснення пуринів і піримідинів є більш рідкісними явищами [52].

Для визначення рівня одностранных разрывов доцільним є застосування методу, що базується на розкручуванні ДНК у лужному

середовищі та забарвленні флуоресцентним барвником, який зв'язується тільки із двонитковою ДНК, але не з одонитковою ДНК, РНК чи протеїном. Такими барвниками можуть бути, наприклад, Hoechst 33258 або PicoGreen.

Завдяки цим методам можна здійснювати оцінку одониткових розривів ДНК, а також виявляти ступінь їх репарації за сприятливих для неї умов.

Перевагами методу із використанням барвника PicoGreen, який отримав назву Fast Micromethod, є можливість виконувати дослідження на невеликій кількості матеріалу (30 нг ДНК або близько 3000 клітин на лунку), змога вивчати не лише поодинокі клітини, а й зразки тканин, а також порівняно незначна тривалість процесу (близько 3 год.) [29].

Методи виявлення одониткових розривів ДНК є високоінформативними та дозволяють вивчати не лише наслідки радіаційної дії, а й вплив багатьох інших мутагенних та канцерогенних речовин, у тому числі ультрафіолетового світла, та оцінювати результати хемотерапії.

Принцип методу

Метод базується на тому, що поява одониткових розривів ДНК внаслідок дії іонізуючої радіації сприяє швидшому розкручуванню ДНК, а флуоресцентний барвник зв'язується лише із ДНК у нативній, дволанцюговій формі [40]. Завдяки цьому немає необхідності у попередньому видаленні із суміші РНК чи білків. У лужному середовищі (рН близько 12) водневі зв'язки між двома ланцюгами ДНК дестабілізуються. Кінетика розкручування напряму залежить від кількості одониткових розривів ДНК, а також від довжини молекули ДНК. Використання флуоресцентного барвника дозволяє напряму

оцінити кількість зв'язаної із ним дволанцюгової ДНК, що зберегла свою структуру.

Матеріали і реактиви

Зарані слід приготувати розчин PBS, вільний від кальцію та магнію, що містить 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KH₂PO₄. Крім того, заздалегідь готують стоковий розчин NaOH, що містить 1,0 М NaOH та 20 мМ EDTA.

Зразу перед використанням готують лізуючий розчин на основі 9,0 М розчину сечовини, 0,1% SDS, 0,2 М EDTA, доводять рН до 10 за допомогою NaOH. Також додатково готують лізуючий розчин із барвником PicoGreen, що містить 20 мкл барвника на 1 мл вищеописаного лізуючого розчину.

Безпосередньо перед дослідженням готують робочий розчин NaOH. Для цього 2 мл стокового розчину NaOH змішують із 18 мл 20 мМ розчину EDTA. Дуже важливо, щоб отриманий розчин мав рН=12,4. Для його визначення слід змішати 5 мл даного розчину та 0,5 мл PBS, вільного від кальцію та магнію. Якщо рН не відповідає бажаному, додають, відповідно, кілька крапель 20 мМ розчину EDTA або стокового розчину NaOH.

Об'єкт дослідження

Клітинні лінії, лімфоцити, спленоцити, гепатоцити, мононуклеари периферійної крові, біоптати пухлин, гомогенізати тканин.

Хід дослідження

Дослідження передбачає два етапи. Спочатку проводять лізис клітин, які були опромінені іонізуючою радіацією. Суспензію клітин у PBS обсягом 25 мкл (150 тис. клітин/мл, тобто 3000 клітин на лунку)

переносять у лунки темного 96-лункового планшета. У пусті лунки додають 25 мкл розчину PBS. У кожну лунку додають 25 мкл лізуючого розчину, що містить флуоресцентний барвник. Після цього інкубують на льоду протягом 40-60 хв., закриваючи планшет фольгою для захисту від світла.

Наступним етапом є денатурація ДНК. Для цього у лунку із лізатом клітин додають підготовлений робочий розчин NaOH із рН=12,4. Зразу ж після цього планшет переносять у рідер для оцінки флуоресценції. Вимірювання проводиться протягом 40 хв. за таких умов: довжина хвилі збудження $\lambda_{ex}=480$ нм, довжина хвилі емісії $\lambda_{em}=520$ нм. Кожен зразок, а також лунки із PBS оцінюють щонайменше у чотирьох повторях.

Оцінка результатів

За даних умов зростання флуоресценції пропорційне до концентрації дволанцюгової ДНК. Внесок одноланцюгової ДНК до загальної флуоресценції зазвичай менший за 10%, тому корекція щодо урахування її вмісту непотрібна, принаймні за умов дотримання вищезазначених характеристик експерименту.

Розраховують SSF (strand scission factor), тобто фактор розщеплення ланцюга ДНК, за формулою

$$SSF = \log_{10}(\%dsDNA_{\text{опромінення}} / \%dsDNA_{\text{контроль}}),$$

тобто як десятковий логарифм від співвідношення вмісту (у відсотках) дволанцюгової ДНК опромінених клітин до вмісту дволанцюгової ДНК у контролі. Результати зазвичай представляють як залежність SSF від дози опромінення. При цьому наявність розривів ланцюга робить значення SSF від'ємним, тому для зручнішого представлення даних на графіку його зазвичай множать на -1 .

Ряд факторів можуть вплинути на процес розкручування ДНК, та, в підсумку, на отримані результати щодо вмісту одониткових розривів. Це концентрація клітин у суспензії, рН та іонна сила розчину. Зокрема, якщо кількість клітин у лунці буде збільшена до 5000, це знизить чутливість методу.

2.2. Метод ДНК-комет (гель-електрофорез лізованих одиничних клітин) для оцінки ушкоджуючої дії іонізуючої радіації

З метою дослідження ушкоджень ДНК, зумовлених іонізуючою радіацією, доволі широко застосовують метод ДНК-комет. Він також дає змогу оцінювати ефективність дії речовин, що можуть бути радіопротекторами.

Перевагами методу є його відносна швидкість та доволі висока чутливість. Можливим є виявлення пошкоджень навіть на рівні однієї клітини, до того ж для аналізу буде достатньо лише кількох тисяч клітин [28]. Проте слід брати до уваги, що виявлені цим методом ушкодження ДНК клітин можуть в нормі проходити репарацію та ніяк не проявлятися в організмі.

Чутливість методу ДНК-комет щодо низьких доз іонізуючої радіації зростала завдяки поступовим його удосконаленням, зокрема, зараз можливим є виявлення одониткових пошкоджень ДНК внаслідок дії рентгенівського опромінення у дозі близько 3 рад [54].

Як правило, ступінь ушкодження ДНК, який можна оцінити за допомогою методу ДНК-комет, зростає лінійно при збільшенні дози.

Принцип методу

Даний метод базується на тому, що негативно заряджена ДНК рухається під впливом струму до анода. Чим менші фрагменти ДНК утворюються внаслідок руйнівної дії іонізуючої радіації та чим більше таких фрагментів, тим більш виразний буде «слід», який умовно можна назвати «хвостом комети». Крім того, у його утворенні також беруть участь релаксовані ділянки ДНК [36].

Матеріали та реактиви

Розчин PBS, 1% агароза із низькою температурою плавлення, 1% агароза із звичайною температурою плавлення; лізуючий розчин, що містить NaCl, NaOH, трис, EDTA та володіє лужним рН=10.

Об'єкт дослідження

Матеріалом для досліджень можуть бути первинні культури еукаріотичних клітин, клітинні лінії, піддані дії іонізуючої радіації, а також нативні клітини, вилучені із організму опромінених тварин. Також у деяких випадках метод придатний для вивчення клітин рослин.

Хід дослідження

На перших етапах дослідження проводять підготовку клітин до електрофорезу. Якщо це первинний матеріал, то його слід вилучити за умов мінімальної кількості застосованих процедур, щоб не пошкодити клітини. Необхідно отримати суспензію, що складається з поодиноких клітин, тож доцільним є ретельне ресуспендування та, в деяких випадках, використання трипсину чи колагенази. Також матеріалом для дослідження можуть слугувати лімфоцити периферійної крові, які виділяють за допомогою центрифугування у градієнті щільності, наприклад, Lymphoprep.

При дослідженні клітин, попередньо культивованих *in vitro*, вилучення проводять за допомогою трипсину, а іноді додатково синхронізують культуру, наприклад, із застосуванням блокаторів мітозу.

Слід також взяти до уваги, що застосування живильного середовища із фетальною телячою сироваткою для приготування дослідної суспензії сприятиме проходженню процесів репарації ушкоджень ДНК, на відміну від застосування звичайного буферного розчину (PBS).

Клітини у буферному розчині змішують із 1% агарозою з низькою температурою плавлення, нагрітою до 50 °С. Зручною для подальших досліджень концентрацією клітин у результуючому розчині буде 5000 на 1 мл. Попередньо готують скельця, покриті 1% агарозою із звичайною температурою плавлення. На них наносять клітинну суспензію, покривають покривними скельцями та залишають при 4 °С щонайменше на 5 хв. для застигання агарози, після чого покривні скельця видаляють.

Наступним етапом є поміщення препаратів у лізуючий розчин. Інкубація у лужному середовищі повинна тривати від 20 до 40 хв. Завдяки цьому відбувається лізис клітинних мембран. Після цього проводять електрофорез протягом 30 хв. у розчині із рН>13 та здійснюють забарвлення флуоресцентними барвниками для візуалізації ДНК, наприклад, пропідій йодидом.

Оцінка результатів

Мікроскопія отриманих препаратів передбачає оцінку від 100 до 500 клітин на кожному з них у двох повторах. Кількість ДНК, яка мігрувала під дією струму, свідчить про рівень ушкоджень у досліджуваних клітинах внаслідок дії іонізуючої радіації. Серед показників, які визначають, у першу чергу беруть до уваги довжину «комети», довжину «хвоста», діаметр «голови», відсотковий вміст ДНК

у «голові» і «хвості». Також визначають т. зв. «момент хвоста», тобто добуток довжини «хвоста» та відсотку ДНК у ньому [39]. Як правило, для оцінки препаратів застосовують відповідні програми автоматизованого аналізу зображень.

Оскільки можливою є оцінка окремих клітин у зразку, результатом дослідження може бути виокремлення субпопуляцій клітин із більшою та меншою радіочутливістю. Крім того, цей метод дає змогу виявити тип загибелі ушкоджених клітин, адже при апоптозі спочатку руйнується ДНК, а потім – клітинні мембрани, тоді як при некрозі мембрана руйнується раніше. Дуже характерною є вид ДНК-комети при апоптозі – виразний «хвіст» та практично відсутня «голова».

Джерела

Осипов А. Н. Оценка молекулярных и цитогенетических эффектов хронического воздействия низкоинтенсивного γ - излучения у мышей / А. Н. Осипов, А. Л. Елаков, П. В. Пучков, М. Д. Померанцева // Генетика. – 2002. – Т.38, № 10. – С. 1345–1350.

Azqueta A., Gutzkow K.B., Brunborg G., Collins A.R. Towards a more reliable comet assay: optimizing agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. // Mutat Res. – 2011. – Vol. 724(1-2). – P. 41-45.

Batel R., Jaksic Z., Bihari N., Hamer B. et al. A Microplate Assay for DNA Damage Determination (Fast Micromethod) in Cell Suspensions and Solid Tissues // Analytical Biochemistry. – 1999. – Vol. 270. – P.195–200.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. // Mol Biotechnol. 2004 Mar;26(3):249-61.

Enciso JM, Gutzkow KB, Brunborg G, Olsen AK, López de Cerain A, Azqueta A. Standardisation of the in vitro comet assay: influence of lysis time and lysis solution composition on the detection of DNA damage induced by X-rays. // Mutagenesis. 2018 Feb 24;33(1):25-30.

Eyvazzadeh N., Neshasteh-Riz A., Mahdavi S. R. DNA Damage of Glioblastoma Multiform Cells Induced by Beta Radiation of Iodine-131 in The Presence or Absence of Topotecan: A Picogreen and Colonogenic Assay // Cell J. – 2015. – Vol.17 (1). – P. 99-110.

Singh N. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage / N.P. Singh, R.E. Stephens & E.L. Schneider // International Journal of Radiation Biology. – 1994. – Vol.66 (1). – P. 23-28.

Schroder H. C., Batel R., Schwertner H., Boreiko O., Muller W. E. Fast micromethod DNA single-strand-break assay. // Methods Mol Biol. – 2006. – Vol. 314. – P. 287-305.

Zhang S. PicoGreen assay of circular DNA for radiation biodosimetry / S. B. Zhang, S. Yang, S. Vidyasagar, M. Zhang // Rad Res. – 2015. – Vol. 183. – P. 188-195.

3. Цитогенетичні методи оцінки дії іонізуючої радіації

Серед методів, що застосовуються у радіобіології, одне з провідних місць належить цитогенетичним методам, що базуються на аналізі аберацій хромосом у соматичних клітинах, утворених внаслідок дії іонізуючої радіації [4]. Одним із наслідків такого впливу можуть бути дволанцюгові розриви ДНК, а саме вони лежать в основі багатьох хромосомних перебудов.

Цитогенетичні методи виявлення радіаційних ушкоджень досить часто називають «золотим стандартом» у радіобіології, оскільки такі дослідження високочутливі та дуже ефективні у вивченні впливу опромінення на клітину [2, 17].

Джерелом клітин для цитогенетичного дослідження може слугувати кістковий мозок, периферійна кров та ряд інших тканин, коли ідеться про клінічну діагностику певних захворювань органів і систем організму людини [12]. Цитогенетичні методи дають змогу здійснити кількісну оцінку впливу іонізуючої радіації на організм.

В основі застосування цих методів лежить наявність специфічних для опромінення хромосомних аберацій, а саме дицентриків та транслокацій, а також чітка залежність між дозою іонізуючого випромінювання та отриманим ефектом на рівні хромосом [16]. Було виявлено, що ушкодження хромосом – це один з найбільш ранніх та специфічних наслідків опромінення, який можна оцінити кількісно із високою точністю [3].

3.1. Виявлення нестабільних хромосомних аберацій у лімфоцитах шляхом аналізу метафаз

Нестабільні хромосомні аберації – це зазвичай ацентрики, поліцентрики та кільця, що, як правило, несумісні з подальшим нормальним функціонуванням клітини. Близько 50% таких аберацій елімінуються при кожному мітозі.

Методи виявлення нестабільних хромосомних аберацій, а також дослідження мікроядер, є дуже ефективними для біологічної дозиметрії, проте, на відміну від FISH та G-бендінгу, зовсім не можуть виконувати функції ретроспективної біодозиметрії. Перевагами цих методів у порівнянні із описаними нижче є можливість деякої автоматизації процесу досліджень, а також менша їх вартість. Крім того, у дослідженнях, що базуються на виявленні мікроядер, важливою є їх порівняно незначна тривалість [44].

Принцип методу

Дослідження нестабільних хромосомних аберацій базується на виявленні, в основному, дицентриків (а також поліцентричних хромосом) та кільцевих хромосом, що є проявами суттєвого порушення нормальної морфології хромосом.

Матеріали та реактиви

Для культивування лімфоцитів необхідним є фітогемаглютинін (ФГА) та живильне середовище RPMI-1640.

Готують фіксатор, що складається із метанолу і льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1. Гіпотонічний розчин отримують шляхом розчинення 55 мг хлориду калію у 10 мл дистильованої води. Розчин колхіцину готують додаванням 3 мг колхіцину до 10 мл буферного

розчину. Робочий барвник Гімза готують безпосередньо перед використанням шляхом змішування основного розчину із дистильованою водою у співвідношенні 1:4.

Об'єкт дослідження

Об'єктом у таких дослідженнях виступають лімфоцити периферичної крові опромінених осіб.

Хід дослідження

У пробірку для подальшого культивування вносять 0,5 мл периферійної крові, 4,5 мл живильного середовища та 0,1 мл ФГА. Пробірки поміщають у CO₂-інкубатор у штативі із нахилом 45° та проводять культивування протягом 52 год. при 5% CO₂ та 37 °С.

За 4 год. до закінчення цього терміну у культуру додають 20 мкл розчину колхіцину. Паралельно з цим готують 10 мл розчину хлориду калію і теж переносять у термостат на 2 год.

Після інкубування у термостаті зразок центрифугують 10 хв. при 1500 об./хв. (325 g), відбирають супернатант, залишаючи 1 мл середовища, ретельно розмішують осад на шейкері та додають 8 мл розчину хлориду калію, після чого поміщають зразок у термостат при 37 °С на 20 хв. і центрифугують за тих же умов. До осаду з 1 мл середовища додають 5 мл фіксатора, інкубують 20 хв. при кімнатній температурі та центрифугують за тих же умов.

Процедуру фіксації повторюють тричі. Після останнього центрифугування залишають 0,3 мл супернатанту, ретельно розмішують у ньому осад та зберігають зразок при +4 °С.

Приготування препаратів проводять на знежирених холодних вологих скельцях, наносячи по 2 краплі зразка на кожне з висоти 30-40 см. Препарати підсушують на повітрі і забарвлюють розчином

барвника Гімза протягом 15 хв. Забарвлені препарати хромосом висушують та досліджують.

Оцінка результатів

Аналіз метафазних пластинок проводять за допомогою світлового мікроскопа, підбираючи їх на збільшенні $\times 200$, та з подальшим вивченням хромосом на збільшенні $\times 1000$ з імерсією. Для отримання достовірних результатів слід проаналізувати не менше 2-3 сотень метафазних пластинок. Вимогами до їх відбору є рівномірний розкид та відсутність накладань хромосом одна на одну.

Проводять кількісний та якісний аналіз нестабільних хромосомних аберацій та порівнюють отримані дані із контролем.

3.2. Виявлення стабільних хромосомних аберацій методом флуоресцентної гібридизації *in situ*

Стабільні хромосомні аберації, як правило, не спричиняють загибелі клітини та передаються дочірнім клітинам при поділі. До них належать транслокації, тобто обмін ділянками, інсерції та інверсії. При цьому загальна морфологія хромосом не змінюється суттєвою мірою, тому для їх виявлення необхідні методи із особливими підходами до забарвлення конкретних ділянок хромосом.

Для визначення частоти стабільних хромосомних аберацій застосовуються методи FISH (fluorescent *in situ* hybridization) та G-бендінг. За умов застосування флуоресцентних зондів до цілих хромосом виокремлюють т. зв. FISH-WCP (whole chromosome painting), що є методом молекулярної цитогенетики [17]. Перевагами цих методів, у порівнянні із описаними вище, є їх придатність для ретроспективної

біологічної дозиметрії, проте вони характеризуються високою вартістю, доволі значною тривалістю процесу досліджень, а також відсутністю змоги автоматизувати його [44].

Одними із найпоширеніших FISH-методів є множинна флуоресцентна гібридизація *in situ* (mFISH) та спектральне каріотипування (SKY).

Принцип методу

Метод mFISH ґрунтується на селективному забарвленні пар хромосом за допомогою суміші молекулярних зондів, високоспецифічних до певних послідовностей ДНК.

Матеріали та реактиви

Слід приготувати 0,05% розчин колхіцину на основі розчину PBS, вільного від кальцію і магнію. Для розділення клітин застосовують градієнт щільності Histopaque. Необхідним також буде 0,075 М розчин хлориду калію для гіпотонії. Готують фіксатор, що складається із метанолу і льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1.

Для гібридизації потрібен цитратний буфер SSC, стоковий розчин якого (20X) готується із 3 М розчину хлориду натрію та 300 мМ розчину цитрату натрію, із доведенням рН до 7 за допомогою HCl.

Готують 70%, 80% та 100% розчини етанолу. Денатуруючий розчин містить 70% формаміду у 2X буфері SSC. Розчин для промивання препаратів містить 0,1% Tween-20 у 4X буфері SSC [50].

Об'єкт дослідження

Об'єктом у таких дослідженнях може виступати кістковий мозок лабораторних тварин (наприклад, мишей), яких було піддано дії іонізуючої радіації.

Хід дослідження

Забарвлення mFISH проводять за R. Pathak [50]. Опроміненим мишам інтраперитонеально вводять розчин колхіцину в обсязі 100 мкл та залишають тварин на 2 год. Після цього проводять евтаназію та вилучають кістковий мозок за допомогою 3 мл PBS із 4% фетальної телячої сироватки. Нашаровують отриману суспензію на градієнт щільності, наприклад, Histopaque, та центрифугують при 400 g протягом 30 хв. Вилучають ядровмісні клітини та двічі відмивають центрифугуванням у 10 мл PBS протягом 5 хв. при 400 g.

Після останнього центрифугування додають 4 мл теплового гіпотонічного розчину та інкубують 20 хв. при 37 °C. Додають 4 мл фіксатора, перемішують та центрифугують 5 хв. при 400 g. Видаляють супернатант, додають 3 мл фіксуючого розчину, інкубують 30 хв. при кімнатній температурі та центрифугують 5 хв. при 400 g. Далі 4 рази проводять наступні дії: видаляють супернатант, додають 3 мл фіксуючого розчину та центрифугують 5 хв. при 400 g. Після останнього центрифугування видаляють супернатант, додають 500 мкл фіксуючого розчину та перемішують.

Препарати готують нанесенням на знежирені вологі скельця 30 мкл суспензії та висушуванням щонайменше протягом 12 год.

Наступний процес забарвлення складається з трьох етапів: денатурація хромосом, денатурація суміші зондів і гібридизація, а також промивання препаратів та детекція флуоресцентних сигналів.

Для денатурації хромосом препарати вносять у 2X буфер SSC на 2 хв., після чого проводять серійне промивання у 70%, 80% та 100% етанолі протягом 2 хв. кожне. Здійснюють інкубацію при 65 °C протягом 1 год. У заздалегідь нагрітій до 70 °C денатуруючий розчин вносять препарати на 1 хв., після чого негайно переносять їх у льодяний 70% розчин етанолу на 2 хв., 80% розчин етанолу на 2 хв. та

100% розчин етанолу на 2 хв. Повністю висушують при кімнатній температурі.

На наступному етапі 10 мкл суміші зондів переносять у 500 мкл мікроцентрифужну пробірку та інкубують на водяній бані, спочатку при 80 °С 7 хв., а потім при 37 °С 10 хв. Переносять суміш на препарат, покривають покривним скельцем, притискають та закривають його краї клеєм типу Rubber Cement. Інкують 12 год. у темряві при 37 °С у вологій камері.

Останній етап передбачає вилучення клею та покривного скельця, поміщення препаратів у заздалегідь нагрітий до 74 °С 0,4X буфер SSC на 5 хв. та промивання препаратів у розчині із Tween-20 протягом 2 хв.

На препарати поміщають 20 мкл середовища для заливки, що запобігатиме вигоранню препаратів, із контр-барвником DAPI (1,5 мкг/мл). Покривають покривним скельцем, притискають та закривають його краї клеєм типу Rubber Cement.

Проводять мікроскопіювання отриманих препаратів за допомогою флуоресцентного мікроскопа та відповідних фільтрів.

Оцінка результатів

Аналіз зображень, отриманих за допомогою флуоресцентної мікроскопії, передбачає виокремлення конкретних хромосом, забарвлених за допомогою специфічних до них зондів. Решта хромосом забарвлюється контр-барвником DAPI. Цей метод дає змогу дослідити навіть незначні транслокації в окремих хромосомах. Забарвлення хромосом вищеописаним методом дозволяє виявити та оцінити ризик ряду радіаційно-індукованих порушень.

3.3. Виявлення аберацій хромосомного та хроматидного типу у клітинах кісткового мозку

При опроміненні лабораторних тварин уражуються, в першу чергу, найбільш чутливі до дії радіації тканини, зокрема, червоний кістковий мозок. Тому оцінка ушкоджень хромосом у клітинах кісткового мозку дозволить отримати інформацію про ступінь його ураження внаслідок опромінення.

Принцип методу

Метод оцінки хромосомних аберацій при дії іонізуючої радіації базується на дослідженні метафазних пластинок клітин кісткового мозку опромінених експериментальних тварин.

Матеріали та реактиви

Для отримання суспензії кістковомозкових клітин необхідний фізіологічний розчин NaCl. Готують стоковий розчин колхіцину шляхом змішування 1 мг колхіцину та 10 мл дистильованої води. Для клітин необхідним буде середовище 199 або RPMI-1640.

Крім того, застосовується гіпотонічний розчин хлориду калію, який готують змішуванням 55 мг KCl та 10 мл дистильованої води, а також фіксатор, що складається із метанолу і льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1. Для забарвлення отриманих препаратів використовують барвник Гімза, розведений у буферному розчині (50 мл) із трипсином (0,2 мл).

Об'єкт дослідження

Для вивчення наслідків дії іонізуючої радіації на організм експериментальних тварин (мишей, щурів) використовують ядровмісні клітини їх кісткового мозку.

Хід дослідження

Після вилучення стегнових кісток лабораторних тварин в умовах ламінарного боксу відрізають епіфізи та промивають кістковомозковий канал фізіологічним розчином (1 мл). Отриману суспензію ресуспендують, пропускаючи через голки зменшеного діаметра, та переносять у пробірку із 2 мл середовища та колхцином (2 краплі). Після цього суспензію клітин кісткового мозку поміщають у термостат при 37 °С на 2 год. Паралельно з цим готують 10 мл розчину хлориду калію і теж переносять у термостат на 2 год.

Після інкубування у термостаті зразок центрифугують 10 хв. при 1500 об./хв. (325 g), відбирають супернатант, залишаючи 0,2 мл середовища, ретельно розмішують осад на шейкері та додають 5 мл розчину хлориду калію, після чого поміщають зразок у термостат при 37 °С на 15 хв. і центрифугують за тих же умов. До осаду з 0,2 мл середовища додають 5 мл фіксатора, інкубують 20 хв. при кімнатній температурі та центрифугують за тих же умов. Процедура фіксації повторюють тричі. Після останнього центрифугування залишають 0,3 мл супернатанту, ретельно розмішують у ньому осад та зберігають зразок при +4 °С.

Приготування препаратів проводять на знежирених холодних вологих скельцях, наносячи по 2 краплі зразка на кожне з висоти 30-40 см. Препарати підсушують на повітрі і забарвлюють розчином барвника Гімза. Забарвлені препарати хромосом висушують та досліджують.

Оцінка результатів

Аналіз отриманих цитогенетичних препаратів клітин кісткового мозку проводять шляхом мікроскопіювання на великому збільшенні із застосуванням імерсії ($\times 900$ чи $\times 1000$). Належну якість результатів дає підрахунок щонайменше кількох сотень метафазних пластинок для кожного дослідного матеріалу. Беруть до уваги аберації хроматидного та хромосомного типу [15].

Джерела

Баранцева М. Ю. Хромосомные нарушения при изолированном и сочетанном воздействии химических веществ и ионизирующего излучения / М. Ю. Баранцева, Л. Н. Мухамедиева, Б. С. Федоренко, С. В. Ворожцова // Гигиена и санитария. – 2009. – Т. 1. – С. 67–70.

Баріляк І. Р. Біологічна індикація та дозиметрія за частотою нестабільних аберацій хромосом у лімфоцитах людини / І. Р. Баріляк, Е. А. Дьоміна // Цитология и генетика. – 2004. – 38, № 1. – С. 72-84.

Бебешко В. Г. Биологические маркеры ионизирующих излучений / В. Г. Бебешко, Д. А. Базыка, К. Н. Логановский // Український медичний часопис. – 2004. – № 1 (39). – С. 85–104.

Дьоміна Е. А. Індивідуальна радіочутливість людини: цитогенетичні аспекти / Е. А. Дьоміна, Н. М. Рябченко, І. Р. Баріляк // Цитология и генетика. – 2007. – 41, № 5. – С. 32-35.

Осипов А. Н. Оценка молекулярных и цитогенетических эффектов хронического воздействия низкоинтенсивного γ - излучения у мышей / А. Н. Осипов, А. Л. Елаков, П. В. Пучков, М. Д. Померанцева // Генетика. – 2002. – Т.38, № 10. – С. 1345–1350.

Пилинская М. А. Цитогенетические эффекты в соматических клетках лиц, пострадавших вследствие Чернобыльской катастрофы, как биомаркер действия ионизирующих излучений в малых дозах / М. А.

Пилинская // *Международный журнал радиационной медицины*. – 1999.
– № 2. – С. 60–66.

Радиационная цитогенетика / Э. А. Дёмина, М. А. Пилинская, Ю. И. Петунин, Д. А. Ключин; под ред. Н. А. Дружины. – К.: Здоров'я, 2009. – 368 с.

Leonard A. Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods / A. Leonard, J. Rueff, G. Gerber, E. Leonard // *Rad Prot Dosim.* – 2005. – Vol. 115 (1-4). – P. 448-454.

Pathak R. Detection of inter-chromosomal stable aberrations by multiple fluorescence in situ hybridization (mFISH) and spectral karyotyping (SKY) in irradiated mice / R. Pathak, I. Koturbash, M. Hauer-Jensen // *J Vis Exp.* – 2017. – Vol.119. – e55162.

4. Дослідження морфології клітин при радіаційному ураженні

Вплив іонізуючої радіації на організм зазвичай супроводжується ураженням органів і систем, що володіють високою сприйнятливістю до її дії. Серед них виділяють гемопоетичну систему як одну з найбільш радіочутливих, що пов'язано із високим ступенем її клітинного оновлення, а отже, значною частотою поділу стовбурових клітин та клітин-попередників [18]. При цьому наслідки ураження проявляються і у морфології клітин, що входять до складу периферійної крові та кісткового мозку.

Найбільш чутливими до опромінення виявляють стовбурові гемопоетичні клітини, а також клітини-попередники [7]. Серед зрілих клітин крові найвищою сприйнятливістю до дії радіації характеризуються лімфоцити. Більш резистентними є усі інші зрілі клітини крові. Крім того, відомо, що еритроїдні клітини кісткового мозку є чутливішими за мієлоїдні [26].

Внаслідок опромінення у кровотворних клітинах спостерігаються морфологічні зміни, які зумовлені патологічними порушеннями процесів у клітинах. Наприклад, при ушкодженні ферментативних систем клітини відбувається зміна кількості гранул у її цитоплазмі. Вакуолізація опроміненої клітини буде зумовлена порушеннями нормального обміну води та зміною осмотичних процесів. Зміна рН внутрішньоклітинних рідин може призвести до порушення здатності клітин до нормального забарвлення. Також внаслідок дії радіації можуть

спостерігатися порушення процесу поділу клітини, наприклад, двоядерні та гігантські клітини [20].

Для оцінки стану гемопоетичної системи тварин при дії опромінення доволі інформативним методом є дослідження препаратів їх периферійної крові та кісткового мозку.

Принцип методу

Метод базується на дослідженні морфологічних проявів радіаційного ураження у кровотворних клітинах після приготування та забарвлення їх препаратів відповідним чином. Застосовується мікроскопія з імерсією.

Матеріали та реактиви

Для приготування суспензії кістковомозкових клітин лабораторних тварин необхідним є фізіологічний розчин (PBS).

Барвник Май-Грюнвальда є сумішшю барвників метиленового синього, еозину і азуру I, а також у ньому присутній метанол (0,25%) у якості фіксатора.

Барвник Романовського-Гімза – забарвлює ацидофільні утворення у червоний колір (ядро), а базофільні – у фіолетово-синій (цитоплазма).

Робочий розчин барвника Романовського-Гімза готують зразу перед використанням шляхом розведення із водою (pH=7) у співвідношенні 1:10.

Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження виступає периферійна кров та кістковий мозок лабораторних тварин. У випадку дослідження стану кровотворення людини зручним способом є забір периферійної крові, а в

деяких випадках доцільним є отримання зразків кісткового мозку шляхом, наприклад, аспіраційної біопсії з грудини або тазової кістки.

Хід дослідження

Для приготування препаратів периферійної крові тварин проводять забір крові із хвостової вени із дотриманням правил асептики. Препарати-мазки готують за стандартною методикою на попередньо знежирених скельцях та висушують на повітрі.

Для отримання клітин кісткового мозку вилучають стегнові кістки, відрізають епіфізи та вимивають їх вміст розчином PBS. Препарати кісткового мозку можна приготувати двома способами. Мазки отримують шляхом нанесення на знежирене скло краплі суспензії клітин кісткового мозку та краплі фізіологічного розчину, змішування та подальшого проведення по скельцю склом із зашліфованим краєм. Крім того, висока якість препаратів досягається, коли для їх приготування використовують цитоцентрифугу. Для цього суспензію клітин кісткового мозку центрифугують при 1000 об./хв. (280 g) протягом 1 хв. Отримані препарати висушують на повітрі.

Забарвлення препаратів кровотворних клітин проводять під витяжною шафою із використанням гематологічних барвників. Попередньо зафіксовані препарати периферійної крові та кісткового мозку забарвлюють за методом Паппенгейма барвником-фіксатором Май-Грюнвальда та барвником Романовського-Гімза.

Для цього на нефіксовані препарати гемопоетичних клітин наносять барвник Май-Грюнвальда на 3 хв. Після цього додають невелику кількість води. Через 1 хв. на препарат наносять робочий розчин барвника Романовського-Гімза на 10-12 хв. Препарати добре споліскують водою із рН близьким до 7, висушують та мікроскопіюють.

Оцінка результатів

Готові препарати досліджують під світловим мікроскопом. На основі препаратів периферійної крові визначають гемограму експериментальних тварин, а також оцінюють морфологічну будову клітин крові. При дослідженні препаратів кісткового мозку опромінених тварин підраховують морфологічний склад клітин кісткового мозку (мієлограму) та аналізують морфологічну будову мієлокаріоцитів. Лейкограми підраховують на 200 клітин, мієлограми – на 400 клітин [19]. Крім того, зазвичай визначають загальний мітотичний індекс у кістковому мозку експериментальних тварин, мітотичні індекси гранулоцитарного та еритроїдного рядів на 1000 елементів мієлограми. Разом з тим визначають кількість патологічних мітозів – асиметричні метафази, неправильну розбіжність хромосом, вакуолізацію тощо [23].

Характерними наслідками дії іонізуючої радіації, що проявляються у морфології клітин периферійній крові, зазвичай є токсигенна зернистість нейтрофілів, гіпер- і гіпосегментація ядра гранулоцитів, вакуолізація чи дегрануляція цитоплазми ядровмісних клітин, фрагментація їх ядра [34]. Крім того, може спостерігатися гіпербазофілія цитоплазми лімфоцитів, наявність у них ворсинчастих відростків, розсічене ядро (рідерівська форма лімфоцитів) [13]. У клітинах кісткового мозку може спостерігатися патологічна зернистість, наявність патологічних форм мітозів, і, як наслідок, двоядерних клітин, клітини на стадії апоптозу з типовими ознаками «блебінгу».

Джерела

Білько Н. М. Методи експериментальної гематології / Н. М. Білько // Навчально-методичний посібник. – К.: Видавничий дім «Києво-Могиланська академія», 2006. – 66 с.

Ионизирующая радиация и онкогематологические заболевания / под. ред. В. Ф. Чехуна и Д. Ф. Глузмана. – НАН України, ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького. – К. : ДІА, 2016. – 282 с.

Радиобиологические аспекты аварии на Чернобыльской АЭС / Я. И. Серкиз, В. Г. Пинчук, Л. Б. Пинчук, Н. А. Дружина, Г. Г. Пухова. – К.: Наукова думка, 1992. – 172 с.

Руководство по гематологии : в 3 т. Т. 1. Под ред. А. И. Воробьева. 3-е изд., перераб. и допол. – М.: Ньюдиамед. – 2002. 280 с.

Руссу І. З., Родіонова Н. К., Білько Д. І., Білько Н. М. Закономірності змін кількісних і якісних показників гемопоетичних стовбурових клітин у культурі клітин в умовах дії радіонукліду стронцію-90 // Проблеми радіаційної медицини і радіобіології. – 2015.

Третяк Н. М. Гематологія. – К.: Зовнішня торгівля, 2005. – 240 с.

Akleyev A. V. Early hematopoietic effects of chronic radiation exposure in humans / A. Akleyev, I. Akushevich, G. Dimov, G. Veremeyeva, T. Varfolomeyeva, S. Ukraintseva, A. Yashin // Health Phys. – 2010. – Vol. 99(3). – P. 330–336.

Borbulyak I., Rodionova N., Bilko N. Complex assessment of hematopoietic system state of laboratory animals under internal strontium-90 irradiation / Problems of radiation medicine and radiobiology. – 2012. – Vol. 17. – P. 359-364.

5. Методи вивчення клоногенної активності клітин

Високоінформативними методами, що дозволяють вивчати наслідки опромінення на клітинному рівні, є методи дослідження клоногенної активності клітин, тобто їх здатності до поділу за різних умов. Вони базуються на здатності клітин утворювати клони, тобто компактні скупчення нащадків, кількість яких можна оцінити за допомогою інвертованого мікроскопа. Більшість таких методів базуються на тому, що клітини поміщають у культуру в чітко визначеній кількості, створюють для них оптимальні умови, культивують протягом певного часу та оцінюють утворені клітинні агрегати. Слід зазначити, що культивування може відбуватися як у системі *in vitro*, так і *in vivo*. Дані, отримані за умов *in vivo*, добре узгоджуються із даними з культур клітин *in vitro*.

Такі клоногенні дослідження поділяють на кілька типів. Це, в першу чергу, культури клітин *in vitro*, у відповідному культуральному посуді, із певними живильними середовищами та ростовими факторами, а іноді і фідерними шарами, що зазвичай підтримуються у CO₂-інкубаторі при 5% CO₂ та 100% вологості. Другий тип культур – це культивування клітин у дифузійних камерах *in vivo*, тобто розміщення клітин у напіврідкому агарі у камерах із мембранними фільтрами, та внесення їх в організм тварин-реципієнтів, де й створюються належні умови [6]. Третій тип культур – це культури *in vivo*, коли досліджувані клітини вводяться безпосередньо в організм тварин та при цьому вивчається їх здатність давати колонії, наприклад, гемопоетичні, у селезінці, або утворення пухлин у певних органах.

5.1. Оцінка виживаності клітин за клоногенною активністю (clonogenic survival assay)

Для дослідження наслідків дії іонізуючої радіації на організм загалом або на культуру клітин широко застосовуються методи оцінки клоногенної активності клітин, наявність якої трактується як виживаність, тобто відсутність т. зв. репродуктивної загибелі [46].

Окрім оцінки впливу іонізуючого випромінювання цей метод дозволяє вивчати наслідки дії різноманітних цитотоксичних агентів, зокрема, ряду хіміотерапевтичних препаратів, комбінований ефект радіації та певних потенційно токсичних речовин, а також можливість модифікації уражувального впливу досліджуваного фактора [41].

Принцип методу

Метод базується на здатності клітин у культурі *in vitro* до багаторазового поділу та утворення клітинних агрегатів, які вважають колоніями за умов вмісту близько 40 клітин чи більше. У випадку репродуктивної загибелі клітини після опромінення, тобто її нездатності до багаторазового поділу, її не зараховують до фракції клітин, що вижили (незначна кількість поділів, близько 2-3, із утворенням кластерів у даному разі не береться до уваги) [48].

Матеріали та реактиви

Для даного дослідження необхідним є культуральне середовище, відповідне для обраного типу клітин, що містить 10% фетальної телячої сироватки для пухлинних клітинних ліній та 15% для фібробластів, а також L-глутамін та антибіотики пеніцилін-стрептоміцин.

Крім того, потрібен розчин PBS, вільний від кальцію та магнію, що містить 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KH₂PO₄.

У випадку застосування клітинних ліній необхідний також розчин трипсин-EDTA (0,5% трипсин із тетранатрієвою сіллю EDTA), що готується безпосередньо перед експериментом та повинен містити 0,5 г/л трипсину, 0,2 г/л EDTA та 0,85 г/л NaCl.

Для фіксації та забарвлення отриманих колоній застосовують розчин, що містить 6,0% глутаральдегіду та 0,5% барвника генціанового фіолетового, розчинених у воді.

Об'єкт дослідження

Зазвичай об'єктом дослідження виступають клітинні лінії, зокрема, це може бути лінія фібробластів людини AG1522, лінія клітин легеневої карциноми SW1573, клітини гліобластоми Gli-6, лінія, отримана із пухлини простати DU-145, клітини карциноми людини DLD-1 тощо. При цьому слід зазначити, що ефективність клонування для пухлинних клітин, як правило, висока та сягає 80-90%, тоді як для фібробластів цей показник доволі низький (близько 15%).

Первинні культури клітин потребують особливих умов культивування, зокрема, додавання кондиційованого середовища, що буде містити ростові фактори, використання фідерного шару із фібробластів або застосування напіврідкого агару [41]. В останньому випадку суспензія клітин у 0,3% агарі розташовується на агаровому шарі, де його вміст 2%.

Хід дослідження

Для отримання клітин слід спершу вилучити середовище із культурального посуду з культивованою клітинною лінією та промити розчином PBS, після чого здійснити трипсинізацію до моменту, коли клітини відкріпляться від поверхні, що можна відстежувати за допомогою мікроскопа. Далі слід зупинити дію трипсину додаванням

середовища із сироваткою в обсязі щонайменше утричі більшому за розчин трипсину, а також ретельно ресуспендувати його.

На цьому етапі дуже важливим є правильний розрахунок клітин для подальшого культивування, для чого необхідним буде використання гемоцитометра або автоматизованого підрахунку клітин.

Для культивування, як правило, застосовують 6-лункові культуральні планшети або 10 см чашки Петрі.

Кількість клітин, яку слід помістити у кожен лунку, буде залежати у тому числі від виду клітин та від типу опромінення, яке планується застосувати. Як уже було зазначено раніше, у нормі (за відсутності опромінення) ефективність клонування для клітинних ліній, отриманих із пухлин, – 80-90%, тоді як для фіброblastів – 10-15%. Найчастіше застосовують кількості від 100 до 10000 клітин. Слід взяти до уваги, що кількість колоній-клонів, яку можна адекватно оцінити в одній лунці 6-лункового планшета, не перевищує близько 200. У випадку експлантації, наприклад, 400 клітин лінії із високою ефективністю клонування утворені колонії почнуть зливатися та перекривати одна одну. Разом з тим, при застосуванні опромінення іонізуючою радіацією у високих дозах (5-10 Гр) ефективність клонування падатиме до 10% чи навіть 1-2%. Тому у контрольних лунках придатною кількістю буде 100 клітин, тоді як для оцінки опромінення, наприклад, у 5 Гр необхідна експлантація 4000 клітин.

Даний метод дозволяє вивчати не лише наслідки радіаційної дії на клітини, експлантовані вищеописаним чином, а й репаративні процеси, які відбуваються у клітинах після опромінення.

Для дослідження впливу іонізуючої радіації слід спочатку помістити бажану кількість клітин у культуральний посуд та дати їм змогу прикріпитися до пластику, що при 37°C займає близько 2 год. (цей процес можна контролювати за допомогою інвертованого мікроскопа).

Після цього клітини опромінують вибраним чином та поміщають у CO₂-інкубатор при 5% CO₂ та 100% вологості для подальшого культивування.

Для дослідження репаративних процесів проводять паралельне культивування двома способами клітин, які було опромінено. У першому випадку клітини негайно після опромінення переносять у культуральні планшети у необхідній кількості та поміщають у CO₂-інкубатор. Якщо з об'єктивних причин експлантація затримуються, опромінені клітини слід тримати при температурі танучого льоду. У другому випадку клітини протягом щонайменше 6 год. після опромінення мають змогу здійснити репараційні процеси, і лише після цього їх переносять у планшети у відповідній до обраної дози кількості для подальшого культивування. Термін культивування буде залежати від показників ефективності клонування у контрольних зразках: результати оцінюють тоді, коли у них сформується достатня кількість колоній.

Загалом тривалість культивування буде залежати від типу клітин, а саме, від тривалості періоду подвоєння популяції. Для клітин із часом генерації менше 13 год. достатньо 10-12 днів культивування, а якщо період подвоєння більше 14 год., слід культивувати 14 діб.

По закінченню терміну культивування видаляють середовище, промивають культуру клітин за допомогою PBS та додають 2-3 мл розчину фіксатора-барвника, який залишають щонайменше на 30 хв. Після цього видаляють барвник і занурюють планшети у ємкість із проточною водою, ретельно промиваючи їх.

Культуральні планшети висушують на повітрі при кімнатній температурі. Якість препаратів зберігається протягом доволі тривалого часу (близько 50 тижнів).

Оцінка результатів

Підрахунок кількості утворених колоній здійснюють за допомогою стереомікроскопа, хоча забарвлені клітинні агрегати помітні і неозброєним оком.

Визначають показник PE (plating efficiency), тобто ефективність клонування, за формулою

$PE = \text{кількість утворених колоній} / \text{кількість експлантованих клітин}$,
що виражається у відсотках.

Далі визначають показник SF (surviving fraction), тобто частку клітин, що вижили (та зберегли репродуктивний потенціал), за формулою

$SF = PE \text{ опромінені} / PE \text{ контроль}$,

що теж виражається у відсотках.

Отримані дані дозволяють оцінити ступінь ураження клітин внаслідок дії іонізуючої радіації, що проявляється у нездатності до нормального поділу; поодинокі клітини або невеликі групи клітин не беруться до уваги, оскільки в даному разі клітини не реалізували свій репродуктивний потенціал належним чином.

5.2. Методи дослідження опромінених стромальних клітин у культурі *in vitro*

Мезенхімальні стромальні стовбурові клітини дають початок зрілим стромальним клітинам, що входять до складу, зокрема, кровотворного мікрооточення. Вони характеризуються доволі високим ступенем радіочутливості, тож доцільним є визначення характеру їх ушкодження в результаті дії іонізуючої радіації [51]. Для цього вивчають функціональну активність стромальних клітин-попередників, отриманих із кісткового мозку, яка виражається у колонієутворенні

in vitro, а також здатність строми підтримувати гемопоез неопроміненого кісткового мозку у культурі *in vitro* в якості фідерного шару.

5.2.1. Оцінка колонієутворюючої здатності стромальних клітин

Для визначення колонієутворюючої здатності стромальних клітин кісткового мозку опромінених тварин проводять їх культивування у культуральній системі *in vitro* [6].

Принцип методу

Метод визначення впливу іонізуючого опромінення на стромальні клітини базується на оцінюванні ефективності їх колонієутворення у системі *in vitro*.

Матеріали та реактиви

Для культивування стромальних клітин застосовують середовище DMEM без сироватки, із 1% L-глутаміну та розчином антибіотиків пеніциліну і стрептоміцину.

Об'єкт дослідження

Джерелом стромальних клітин виступає кістковий мозок опромінених тварин.

Хід дослідження

Клітинну суспензію, отриману із кісткового мозку, поміщають у концентрації 1×10^6 клітин/мл у 25 см² культуральні флакони по 5 мл та інкубують в умовах CO₂-інкубатора при 37 °C, 100% вологості та 5% CO₂. Для культивування клітин використовують середовище DMEM.

Для оцінки кількості колонієутворюючих одиниць, утворених у різні терміни культивування, клітини інкубують протягом 7 діб, після чого проводять зміну середовища і продовжують культивувати клітини кісткового мозку до 14-16-ої доби.

Для підрахунку колоній культури промивають розчином Хенкса, фіксують 96% етанолом і забарвлюють барвником Гімза.

Оцінка результатів

Кількість колонієутворюючих одиниць визначають підрахунком колоній, що містять не менше, ніж 50 клітин, використовуючи інвертований мікроскоп. Роблять перерахунок на 1 млн. культивованих клітин та порівнюють ці показники із контрольними.

5.2.2. Оцінка здатності стромальних фідерних шарів до підтримки кровотворення у культурі *in vitro*

Як модель оцінки здатності опроміненої строми підтримувати гемопоєз використовують дифузійні камери з міліпоровими фільтрами, у яких знаходиться кістковий мозок неопромінених тварин, занурені у планшети із зарані приготованим фідерним шаром зі строми опромінених тварин [32].

Принцип методу

Метод передбачає застосування культури гемопоетичних клітин *in vitro* та фідерних шарів, отриманих зі стромальних клітин-попередників, як основи для подальшого культивування гемопоетичних клітин, та оцінка їхньої здатності до утворення клітинних агрегатів за даних умов [24].

Матеріали та реактиви

Для культивування стромальних клітин застосовують середовище DMEM без сироватки, із 1% L-глутаміну та розчином антибіотиків пеніциліну і стрептоміцину. Відкріплення клітин проводять за допомогою 0,25% розчину трипсину-EDTA. Для блокування поділів стромальних клітин застосовують розчин Мітоміцину С у концентрації 2 мкг/мл.

Гемопоетичні клітини культивують у повному живильному середовищі RPMI, що має містити 10% фетальної телячої сироватки, 1% L-глутаміну, розчин пеніциліну-стрептоміцину 100 Од/мл, та агаром з кінцевою концентрацією 0,33%

Об'єкт дослідження

Джерелом стромальних та гемопоетичних клітин виступає кістковий мозок опромінених тварин.

Хід дослідження

Для отримання моношару кістковий мозок вилучають із стегнових кісток тварин та готують суспензію. Клітини змішують із культуральним середовищем DMEM і переносять у пластикові культуральні 6-лункові планшети. Заміну половини обсягу середовища проводять через 1 добу, таким чином видаляючи неадгезовані клітини. Після цього кожні 72 год. половину обсягу середовища замінюють свіжим. Культивування здійснюють у CO₂-інкубаторі із 5% CO₂ при 37 °C і 100% вологості.

Потім проводять субкультивування стромальних клітин. Клітини знімають з поверхні пластику розчином трипсину-EDTA, відмивають центрифугуванням протягом 10 хв. при 1000 об./хв. (145 g), додають середовище і перемішують. Для наступного пасажу суспензію клітин поміщають у планшети по 1 мл у лунку та культивують 10 діб.

Сформований моношар знімають розчином трипсин-EDTA, додають культуральне середовище та експлантують у 6-лункові пластикові планшети у концентрації 1×10^5 клітин на лунку.

Після досягнення моношару клітини обробляють Мітоміцином С у концентрації 2 мкг/мл протягом 2 год. для зупинки процесу клітинного поділу. Після цього отриманий моношар відмивають розчином PBS п'ять разів, додають культуральне середовище і використовують як фідерний шар.

Гемопоетичні клітини культивують на отриманих фідерних шарах, поміщаючи їх зарані у дифузійні камери із міліпоровими фільтрами. Для цього готують суспензію кістковомозкових клітин шляхом їх змішування із повним живильним середовищем RPMI та агаром. Отриману культуральну суспензію вносять у порожнину дифузійної камери в обсязі 0,2 мл на 1 камеру. Потім дифузійні камери переносять у 6-лункові пластикові матраци із заздалегідь приготованими фідерними шарами, з розрахунку 1 камера на 1 лунку.

Кожну культуральну лунку заповнюють живильним середовищем в об'ємі 8 мл так, щоб дифузійна камера була повністю зануреною. Культуральне середовище міняють кожні 72 год. шляхом зміни половини супернатанту свіжим середовищем. Культивування проводять у CO₂-інкубаторі при 5% CO₂, 100% вологості та 37°C [7].

Оцінка результатів

Для дослідження процесу гемопоезу у дифузійних камерах *in vitro* на опромінених фідерних шарах здійснюють підрахунок кількості отриманих клітинних агрегатів за допомогою інвертованого мікроскопа. Цей показник буде свідчити про функціональну активність стромальних клітин, що формують фідерний шар, та її зміни внаслідок дії іонізуючої радіації.

5.3. Методи дослідження колонієутворення у селезінці опромінених тварин

Методи дослідження колонієутворення в селезінці летально опромінених тварин були одними із найперших, що давали змогу оцінити функціональну активність гемопоетичних клітин-попередників, зокрема, при дії іонізуючої радіації [47]. Існує пряма залежність між кількістю введених опроміненим тваринам клітин та кількістю утворених у селезінці мишей-реципієнтів колоній. Отримані колонії, як показують гістологічні дослідження, складаються із мієлоїдних, еритроїдних та мегакаріоцитарних клітин.

Дані методи поділяються на ті, що передбачають отримання екзогенних селезінкових колоній, та методи ендogenous селезінкового колонієутворення. У першому випадку є змога кількісно оцінити ступінь ураження гемопоетичної системи тварин-донорів кісткового мозку внаслідок дії іонізуючої радіації. Друга група методів застосовується для дослідження джерел гемопоетичних клітин в організмі, міграції цих клітин та відновлення гемопоезу після опромінення [10].

5.3.1. Екзогенне селезінкове колонієутворення

Принцип методу

Введення клітин кісткового мозку летально опроміненим тваринам супроводжується колонієутворенням гемопоетичних клітин-попередників у придатних для цього умовах в організмі реципієнтів, зокрема, у селезінці. Продукуються зрілі клітини крові, що супроводжується підвищенням рівня виживаності опромінених тварин.

Матеріали та реактиви

Суспензію клітин кісткового мозку готують на основі фізіологічного розчину NaCl.

Оцтово-спиртовий розчин для фіксації селезінок готують шляхом змішування 1 частини льодяної оцтової кислоти та 3 частин 96% етилового спирту.

Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження є кровотворні клітини-попередники кісткового мозку експериментальних тварин.

Хід дослідження

Для отримання екзогенних селезінкових колоній кістковий мозок опромінених тварин-донорів, який виступає джерелом кровотворних клітин-попередників для подальших досліджень, вилучають із стегових кісток, вимиваючи його середовищем із додаванням фетальної телячої сироватки, із дотриманням умов стерильності. Готують суспензію гемопоетичних клітин шляхом ресуспендування через голки зменшеного діаметра.

Тварин-реципієнтів зарані опромінують у сублетальній або летальній дозі, залежно від цілей експерименту. Через 24 год. після опромінення тваринам-реципієнтам внутрішньовенно (у хвостову вену) вводять суспензію кістковомозкових клітин, зазвичай в обсязі 0,2 мл, щонайбільше – 0,5 мл.

При застосуванні методу екзогенних колоній для оцінки функціонального стану введених кровотворних клітин оцінюють кількість та тип колоній, отриманих у селезінці, а іноді – 30-денну виживаність тварин-реципієнтів.

Для виявлення отриманих колоній тварин-реципієнтів забивають методом цервікальної дислокації у термін, який визначається цілями експерименту, вилучають у них селезінки та фіксують їх протягом 30 хв. у оцтово-спиртовому розчині.

Оцінка результатів

Колонії, які утворюються у селезінці і можуть бути виявлені візуально, доволі гетерогенні та поділяються на кілька типів. Перш за все, слід зазначити, що клоногенні клітини, які дають початок колоніям, володіють різним ступенем зрілості, та, відповідно, проліферативним потенціалом. Зокрема, у першу чергу (на 7-8-му добу після введення) себе проявляють більш зрілі клітини-попередники, а пізніше (на 11-12-ту добу) в селезінці утворюються колонії, сформовані більш ранніми клітинами із вищим проліферативним потенціалом, що здатні до довготривалої самопідтримки. Розмір утворених колоній теж може свідчити про особливості клітин, які їх сформували – вважається, що т.зв. мікроколонії утворюються зрілішими клітинами-попередниками, а макроколонії – більш ранніми.

5.3.2. Ендогенне селезінкове колонієутворення

Дослідження, які передбачають отримання ендогенних селезінкових колоній, поділяються на два типи. У першому випадку проводять тотальне опромінення всього організму у сублетальній дозі, яку визначають із врахуванням виду та лінії експериментальних тварин. У другому випадку здійснюють опромінення у летальній дозі, проте екранують певну ділянку тіла тварини (наприклад, одну із кінцівок) свинцевим екраном. В обох випадках утворені на селезінках колонії реєструють на 9-ту добу після опромінення.

Проведені таким чином дослідження дозволяють оцінити стан гемопоетичної системи при дії іонізуючої радіації, як однієї із найбільш радіочутливих в організмі ссавців [7]. Крім того, подібні методи дозволяють вивчати функціональну активність кровотворних клітин тварин-донорів і при дії інших чинників, що потребують кількісної оцінки.

Джерела

Білько Д. І. *Методи культури клітин і тканин у біології, біотехнології та медицині: навч.-метод. посіб. / Д.І. Білько.* – К. : НаУКМА, 2017. – 88 с.

Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Шахов В. П. *Методы культуры ткани в гематологии.* – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1992. – 264 с.

Чертков И. Л., Гуревич О. А. *Стволовая кроветворная клетка и её микроокружение.*— М. : Медицина, 1984.— 238 с.

Bilko N. M., Votjakova I. A., Vasilovska S. V., Bilko D. I. *Characterization of the interaction between stromal and haematopoietic progenitor cells in expansion cell culture models // Cell Biol. Int., 2005. – Vol. 29 (1). – P. 83–86.*

Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., van Bree C. *Clonogenic assay of cells in vitro. // Nat Protoc. – 2006. – Vol. 1(5). – P. 2315-2319.*

Lu F. *A clonogenic survival assay of neural stem cells in rat spinal cord after exposure to ionizing radiation / F. Lu, C. Shun Wong // Rad Res. – 2005. – Vol. 163. – P. 63-71.*

McCulloch E. A., Till J. E. *The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice // Radiation Research. – 1960. – Vol. 13, No 1. – P. 115-125.*

Munshi A., Hobbs M., Meyn R.E. *Clonogenic cell survival assay. // Methods Mol Med. – 2005. – Vol. 110. – P. 21-28.*

Russu I, Rodionova N, Bilko D, Bilko N. *Mesenchymal stem and progenitor cells of rats' bone marrow under chronic action of ionizing radiation. – Problems of radiation medicine and radiobiology. – 2017. - Vol. 22. – P. 224-230.*

6. Визначення форми загибелі клітин при опроміненні

Внаслідок дії іонізуючої радіації на живі системи, особливо у високих дозах, спостерігаються різні види загибелі клітин. При цьому можуть паралельно відбуватися такі процеси, як апоптоз, некроз та аутофагія, тому дослідники схильні називати це явище «mixed death», тобто змішаний тип загибелі [35, 49]. Також слід взяти до уваги, що за таких умов може спостерігатися т.зв. репродуктивна загибель клітини, коли вона втрачає здатність до поділу, що теж має оцінюватись як результат опромінення за допомогою відповідних методів, наприклад, дослідженням клоногенної активності.

Для визначення ступеню впливу іонізуючої радіації на клітини та організм в цілому застосовують ряд методів, що дозволяють виокремити клітини на стадії апоптозу та некрозу, поряд із клітинами, що залишились інтактні [38]. Оцінка наслідків опромінення відбувається на основі підрахунку частки клітин, що втратили життєздатність.

Найпоширеніші методи, що використовуються для виявлення клітин, які перейшли до апоптозу чи некрозу, передбачають застосування певних специфічних барвників, як правило, флуоресцентних, та флуоресцентної мікроскопії або проточної цитофлуориметрії [27].

Флуоресцентні барвники, що забарвлюють ядро, включають DAPI, Hoechst 33342, пропідій йодид окремо або у поєднанні, акридин оранжевий–етидій бромід, барвники надродина SYTO. До нефлуоресцентних барвників належать гематоксилін-еозин, метиленовий зелений та трипановий синій. Барвники, що не забарвлюють ядро, включають анексин-V–FITC, лектин та сульфат нільський синій.

Принцип методів

Більшість методів, що визначають тип клітинної загибелі, базуються на ідентифікації характерних молекул, пов'язаних із конкретним типом клітинної загибелі. Наприклад, на ранніх стадіях апоптозу відбувається специфічна інверсія фосфатидилсерину на клітинній мембрані, із яким зв'язуються деякі барвники [27]. На рівні ДНК відбувається конденсація хроматину, що може бути виявлена за допомогою відповідних ДНК-споріднених барвників та подальшої мікроскопії. Морфологічними ознаками апоптозу є фрагментація ядра, зменшення об'єму клітини та формування везикул на поверхні клітини, т. зв. «блебінг».

6.1. Забарвлення барвником DAPI

Барвник DAPI (4',6-діамідино-2-феніліндол) вибірково зв'язується з дволанцюговою ДНК в регіонах, багатих на А-Т, та дає флуоресценцію у синьому кольорі. Слід взяти до уваги, що він може зв'язуватися з РНК, проте у цього комплексу довжина хвилі емісії більша [59].

Матеріали та реактиви

Для приготування барвника DAPI необхідною є деіонізована вода та розчин PBS.

Розчин барвника готують шляхом додавання 2 мл деіонізованої води у флакон із 10 мг барвника DAPI, отримуючи таким чином 14,3 мМ стоковий розчин (5 мг/мл). Ресуспендувати слід дуже ретельно, оскільки у барвника низька розчинність у воді. Стоковий розчин варто зберігати за низької температури.

Для отримання робочого розчину барвника спочатку готують проміжне розведення, додаючи 2,1 мкл стокового розчину до 100 мкл PBS та отримуючи 300 мкМ розчин DAPI. Після цього слід розвести проміжний розчин у PBS 1:1000 та отримати 300 нМ робочий розчин DAPI.

Об'єкт дослідження

Об'єктом досліджень можуть бути клітинні лінії чи первинні культури клітин.

Хід дослідження

Клітини вилучають із культури, обравши спосіб, придатний для даного типу культур (суспензійних чи адгезивних) та готують препарати. Клітини фіксують, як правило, формальдегідом; у деяких випадках необхідною є пермеабілізація мембран за допомогою, наприклад, метанолу, Тритону X-100, ацетону чи Tween-20. Після цього препарат промивають двічі розчином PBS та додають 300 нМ розчин DAPI у кількості, необхідній для покриття препарату повністю. Інкують 1-5 хв., захищаючи від світла. Вилучають барвник, промивають двічі-тричі розчином PBS та мікроскопіюють за допомогою флуоресцентного мікроскопа. Довжина хвилі збудження $\lambda_{ex}=358$ нм, довжина хвилі емісії $\lambda_{em}=461$ нм.

Оцінка результатів

Завдяки даному забарвленню чітко візуалізуються клітини, що перейшли до стадії клітинної загибелі. Зокрема, при апоптозі спостерігаються фрагменти ядерного хроматину та його конденсація, а при некрозі – атипова деформація ядра.

6.2. Забарвлення барвником Hoechst 33342

Барвник Hoechst 33342 (2'-[4-етоксифеніл]-5-[4-метил-1-піперазиніл]-2,5'-бі-1Н-бензімідазол тригідрохлорид тригідрат) проникає у клітину, вибірково зв'язується з дволанцюговою ДНК в регіонах, багатих на А-Т, та флуоресцює у синьому кольорі (460-490 нм) [59]. Іноді використовуються також споріднені з ним барвники Hoechst 33258 та Hoechst 34580.

Матеріали та реактиви

Для приготування барвника Hoechst 33342 необхідною є деіонізована вода та розчин PBS.

Стоковий розчин барвника Hoechst 33342 готують шляхом розчинення 100 мг у 10 мл деіонізованої води, у результаті чого отримують розчин із концентрацією барвника 10 мг/мл (16,23 мМ). Слід взяти до уваги, що дана речовина має низьку розчинність у воді. Стоковий розчин зберігають при 4 °С протягом 6 міс.

Безпосередньо перед використанням готують робочий розчин барвника, здійснюючи розведення стокового розчину 1:2000 за допомогою PBS.

Об'єкт дослідження

Об'єктом досліджень можуть бути клітинні лінії чи первинні культури клітин.

Хід дослідження

Вилучають середовище із культуральних флаконів із досліджуваними клітинами. Додають таку кількість робочого розчину барвника, що покриває повністю клітини. Інкують 5-10 хв.,

захищаючи від світла. Вилучають розчин барвника та промивають тричі у PBS.

Забарвлені клітини мікроскопіюють за допомогою флуоресцентного мікроскопа при довжині хвилі збудження $\lambda_{ex}=35$ нм та довжині хвилі емісії $\lambda_{em}=461$ нм.

Оцінка результатів

Серед досліджуваних клітин виявляють ті, що демонструють ознаки ущільнення ядерного матеріалу (пікноз). Дволанцюгова ДНК, зв'язуючись із барвником Hoechst 33342, дає характерне синє світіння. Пікнотичне ядро клітини є свідченням того, що вона перебуває на стадії апоптозу.

Джерела

Atale N., Gupta S., Yadav U. C. S., Rani V. Cell-death Assessment by Fluorescent and Nonfluorescent Cytosolic and Nuclear Staining Techniques // J Microsc. – 2014. – Vol. 255(1). – P. 7-19.

Chen Q. Apoptosis, necrosis and autophagy in mouse intestinal damage after 15 Gy whole body irradiation / Q. Chen, X. Xia, S. Wu, A. Wu et al. // Cell Biochem and Func. – 2014. – Vol. 32. – P. 647-656.

Eltahawy N. Synergistic effect of aluminum and ionizing radiation upon ultrastructure, oxidative stress and apoptotic alterations in paneth cells of rat intestine / N. Eltahawy, S. Elsonbaty, S. Abunour, W. Zahran // Environ Sci Pollut Res Int. – 2017. – Vol. 24(7). – P. 6657-6666.

Panganiban R. Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells / R. Panganiban, A. Snow, R. Day // Int J Mol Sci. – 2013. – Vol. 14. – P.15931-15958.

<https://www.thermofisher.com/ua/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/>

7. Дослідження кількісних змін у тканинах при дії іонізуючої радіації

Наслідки дії іонізуючої радіації проявляються не лише на рівні клітин, а й на рівні тканин, окремих органів та систем організму. Одним із проявів такого уражувального впливу можуть бути зміни співвідношення між кількостями тих чи інших клітинних популяцій, що входять до складу радіочутливих тканин [11].

Однією із найбільш радіочутливих систем в організмі людини та ссавців є гемопоетична система. Кількісний аналіз клітин крові та кісткового мозку дозволяє виявити наслідки впливу іонізуючої радіації та оцінити ступінь ураження всього організму [5, 30]. Одним із проявів багатьох патологічних змін, що спостерігаються при опроміненні, є також поява доволі значної кількості гемопоетичних клітин-попередників, які циркулюють у периферійній крові, що в нормі трапляється вкрай рідко [31].

Принцип методу

Метод кількісного аналізу периферійної крові та кісткового мозку передбачає мікроскопіювання з імерсією препаратів гемопоетичних клітин із подальшим аналізом їхньої морфології та підрахунком різних типів клітин, що присутні на препараті. У випадку дослідження периферійної крові аналізують не менше як 200 ядровмісних клітин та представляють результати як їхнє відсоткове співвідношення (гемограма). При дослідженні кісткового мозку слід проаналізувати не

менше як 400 ядровмісних клітин та представити їх вміст у відсотках (мієлограма).

Матеріали та реактиви

Для приготування суспензії клітин кісткового мозку необхідний буферний розчин типу PBS. Крім того, для забарвлення препаратів використовуються гематологічні барвники Май-Грюнвальда і Романовського-Гімза. Необхідною є також імерсійна олія для мікроскопіювання.

Об'єкт дослідження

Об'єктом для досліджень стану гемопоетичної системи може бути периферійна кров та кістковий мозок лабораторних тварин; для оцінки кровотворення у людини зазвичай здійснюють забір периферійної крові, а в деяких випадках – і кісткового мозку шляхом аспіраційної біопсії.

Хід дослідження

Для приготування препаратів периферійної крові тварин проводять забір крові, як правило, із хвостової вени із дотриманням правил асептики. Готують препарати-мазки за стандартною методикою на попередньо знежирених скельцях та висушують на повітрі.

Для отримання клітин кісткового мозку вилучають стегнові кістки, відрізають епіфізи та вимивають їх вміст розчином PBS. Препарати кісткового мозку можна приготувати двома способами. Мазки отримують шляхом нанесення на знежирене скло краплі суспензії клітин кісткового мозку та краплі фізіологічного розчину NaCl, змішування та подальшого проведення по скельцю склом із зашліфованим краєм. Вищу якість препаратів забезпечує цитоцентрифуга (Cytospin), що дає змогу готувати препарати із суспензії клітин кісткового мозку. Для цього

клітини у спеціальних кюветах центрифугують при 1000 об./хв. (280 g) протягом 1 хв. Препарати висушують на повітрі.

Забарвлення отриманих препаратів проводять під витяжною шафою із використанням гематологічних барвників. Попередньо зафіксовані препарати периферійної крові та кісткового мозку забарвлюють за методом Паппенгейма [7] барвником-фіксатором Май-Грюнвальда та барвником Романовського-Гімза.

Готові препарати досліджують під світловим мікроскопом із використанням імерсії. На основі препаратів периферійної крові визначають гемограму експериментальних тварин, а також оцінюють морфологічну будову клітин крові. При дослідженні препаратів кісткового мозку опромінених тварин підраховують морфологічний склад клітин кісткового мозку (мієлограму).

Для визначення ступеня проліферації гемопоетичних клітин у кістковому мозку зазвичай визначають загальний мітотичний індекс усіх клітин, а також окремо мітотичні індекси гранулоцитарного та еритроїдного рядів на 1000 елементів мієлограми [19, 23]. Разом з тим визначають кількість патологічних мітозів – асиметричні метафази, неправильну розбіжність, конденсацію хромосом, вакуолізацію тощо.

Оцінка результатів

Кількісні дослідження складу периферійної крові та кісткового мозку при дії іонізуючої радіації дають змогу виявити зміни співвідношення між окремими паростками кровотворення, оцінити ступінь прояву дизгемопоезу, а також дослідити процеси проліферації та диференціювання стовбурових клітин та клітин-попередників за умов впливу уражувального фактора. Зміни мітотичного індексу серед незрілих форм клітин кісткового мозку свідчать про пригнічення або

навпаки, активацію поділу клітин внаслідок опромінення, залежно від його дози та форми опромінення [20].

Особливої уваги заслуговує наявність у периферійній крові опромінених тварин незрілих клітин – а саме, клітин попередників типу мієлоцитів та метамієлоцитів.

Показники відсоткового співвідношення форм лейкоцитів у крові, а також ядровмісних клітин у кістковому мозку дорослих осіб у нормі представлено у Додатках.

Джерела

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, І. А. Крячок, Н. М. Білько та ін. // У кн.: Медичні наслідки аварії на Чорнобильській АЕС / За ред. О.Ф.Возіанова, В.Г.Бебешка, Д.А.Базики. – К.: ДІА, 2007. – С. 327–355.

Білько Н. М. Методи експериментальної гематології / Н. М. Білько // Навчально-методичний посібник. – К.: Видавничий дім «Києво-Могилянська академія», 2006. – 66 с.

Дягіль І. С. Стан гемопоєзу та закономірності формування онкогематологічної патології в учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕСу віддалений період : автореф. дис. д-ра мед. наук. / І. С. Дягіль. – АМН України, НЦРМ. – К., 2006. – 44 с.

Руководство по гематологии : в 3 т. Под ред. А. И. Воробьева. 3-е изд., перераб. и допол. Т. 1. – М.: Ньюдиамед. – 2002. – 280 с.

Руссу І. З., Родіонова Н. К., Білько Д. І., Білько Н. М. Закономірності змін кількісних і якісних показників гемопоетичних стовбурових клітин у культурі клітин в умовах дії радіонукліду стронцію-90 // Проблеми радіаційної медицини і радіобіології. – 2015. – Вип. 20. – С. 533-542.

Третьяк Н. М. Гематология. – К.: Зовнішня торгівля, 2005. – 240 с.

Bilko N. Assessment of hemopoietic progenitor cells in patients affected by Chernobyl accident and risk of oncohematological diseases // In: Rapid Diagnosis of a Population in an Emergency and at Risk after Exposure to Ionizing Radiation and Chemicals. A. Cebulska-Wasilewska, A. Osipov (eds). – IOS Press, 2010. – P.95–101.

Bilko N. M. Circulating hematopoietic progenitor cells in patients affected by Chornobyl accident / N. M. Bilko, I. S. Dyagil, I. Z. Russu, D. I. Bilko // Experimental Oncology. - 2016. - Vol. 38, N 4. - P. 242-244.

Перелік умовних скорочень

МДА – малоновий диальдегід

ФГА – фітогемаглютинін

AFE – метод лужної елюції ДНК із фільтра (alkaline filter elution)

DAPI – барвник 4',6-діамідино-2-феніліндол (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DMEM – середовище Ігла у модифікації Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium)

DNA – дезоксирибонуклеїнова кислота (deoxyribonucleic acid)

EDTA – етилендіамінтетраоцтова кислота (ethylenediaminetetraacetic acid)

FADU – флуориметричний аналіз розкручування ДНК (fluorometric analysis of DNA unwinding)

FISH – флуоресцентна гібридизація *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization)

FITC – ізотіоціанат флуоресцеїну (fluorescein isothiocyanate)

PBS – натрій-фосфатний буфер (phosphate-buffered saline)

PE – ефективність клонування (plating efficiency)

RPMI – культуральне живильне середовище, розроблене в Інституті Roswell Park (Roswell Park Memorial Institute medium)

SDS – додецилсульфат натрію (sodium dodecyl sulfate)

SF – частка клітин, що вижили (surviving fraction)

SKY – спектральне каріотипування (spectral karyotyping)

SSC – натрій-цитратний буфер (saline-sodium citrate)

SSF – фактор розщеплення ланцюга ДНК (strand scission factor)

Список використаних джерел

1. Абилев С. К., Глазер В. М. Мутагенез с основами генотоксикологии. – М.:, СПб.: Нестор-История, 2015. – 304 с.
2. Баранцева М. Ю. Хромосомные нарушения при изолированном и сочетанном воздействии химических веществ и ионизирующего излучения / М. Ю. Баранцева, Л. Н. Мухамедиева, Б. С. Федоренко, С. В. Ворожцова // Гигиена и санитария. – 2009. – Т. 1. – С. 67–70.
3. Барияк І. Р. Біологічна індикація та дозиметрія за частотою нестабільних аберацій хромосом у лімфоцитах людини / І. Р. Барияк, Е. А. Дьоміна // Цитология и генетика. – 2004. – 38, № 1. – С. 72-84.
4. Бебешко В. Г. Биологические маркеры ионизирующих излучений / В. Г. Бебешко, Д. А. Базыка, К. Н. Логановский // Український медичний часопис. – 2004. – № 1 (39). – С. 85–104.
5. 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, І. А. Крячок, Н. М. Білько та ін. // У кн.: Медичні наслідки аварії на Чорнобильській АЕС / За ред. О.Ф.Возіанова, В.Г.Бебешка, Д.А.Базики. – К.: ДІА, 2007. – С. 327–355.
6. Білько Д. І. Методи культури клітин і тканин у біології, біотехнології та медицині: навч.-метод. посіб. / Д.І. Білько. – К. : НаУКМА, 2017. – 88 с.

7. Білько Н. М. Методи експериментальної гематології / Н. М. Білько // Навчально-методичний посібник. – К.: Видавничий дім «Києво-Могилянська академія», 2006. – 66 с.
8. Вплив радіаційного фактора чорнобильської зони відчуження на організм тварин / За ред. Я. І. Серкіза, М. Ю. Алесіної. – К.: Атіка, 2006. – 320 с.
9. Гайченко В. А. Практикум з радіобіології та радіоекології. Навч.посібник. / В. А. Гайченко, І. М. Гудков, В. О. Кашпаров, В. О. Кіцно, М.М. Лазарєв. – К. : Кондор, 2010. – 286 с.
10. Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Шахов В. П. Методы культуры ткани в гематологии. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1992. – 264 с.
11. Дягіль І. С. Стан гемопоезу та закономірності формування онкогематологічної патології в учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕСу віддалений період : автореф. дис. д-ра мед. наук. / І. С. Дягіль. – АМН України, НЦРМ. – К., 2006. – 44 с.
12. Дьоміна Е. А. Індивідуальна радіочутливість людини: цитогенетичні аспекти / Е. А. Дьоміна, Н. М. Рябченко, І. Р. Баріляк // Цитология и генетика. – 2007. – 41, № 5. – С. 32-35.
13. Ионизирующая радиация и онкогематологические заболевания / под. ред. В. Ф. Чехуна и Д. Ф. Глузмана. – НАН України, ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького. – К. : ДІА, 2016. – 282 с.
14. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике : в 2 т. / Под ред. А. И. Карпищенко. – Т. 2. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 792 с.
15. Осипов А. Н. Оценка молекулярных и цитогенетических эффектов хронического воздействия низкоинтенсивного γ -излучения у мышей / А. Н. Осипов, А. Л. Елаков, П. В. Пучков, М. Д. Померанцева // Генетика. – 2002. – Т.38, № 10. – С. 1345–1350.

16. Пилинская М. А. Цитогенетические эффекты в соматических клетках лиц, пострадавших вследствие Чернобыльской катастрофы, как биомаркер действия ионизирующих излучений в малых дозах / М. А. Пилинская // Международный журнал радиационной медицины. – 1999. – № 2. – С. 60–66.

17. Радиационная цитогенетика / Э. А. Дёмина, М. А. Пилинская, Ю. И. Петунин, Д. А. Ключин; под ред. Н. А. Дружины. – К.: Здоров'я, 2009. – 368 с.

18. Радиобиологические аспекты аварии на Чернобыльской АЭС / Я. И. Серкиз, В. Г. Пинчук, Л. Б. Пинчук, Н. А. Дружина, Г. Г. Пухова. – К.: Наукова думка, 1992. – 172 с.

19. Руководство по гематологии : в 3 т. Под ред. А. И. Воробьева. 3-е изд., перераб. и допол. Т. 1. – М.: Ньюдиамед. – 2002. – 280 с.

20. Руссу І. З., Родіонова Н. К., Білько Д. І., Білько Н. М. Закономірності змін кількісних і якісних показників гемопоетичних стовбурових клітин у культурі клітин в умовах дії радіонукліду стронцію-90 // Проблеми радіаційної медицини і радіобіології. – 2015. – Вип. 20. – С. 533-542.

21. Серкіз Я. 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.

22. Талько В. Вплив пренатального опромінення ^{131}I на головний мозок: експериментальна модель клінічних нейрорадіоембріологічних ефектів / В. В. Талько, К. М. Логановський, І. П. Дрозд, Є. В. Тукаленко // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. – 2017. – Вип. 22. – С. 238–269.

23. Третьак Н. М. Гематологія. – К.: Зовнішня торгівля, 2005. – 240 с.

24. Чертков И. Л., Гуревич О. А. Стволовая кроветворная клетка и её микроокружение. – М. : Медицина, 1984. – 238 с.
25. Шелест Д. В., Колотій О. В., Свиридова К. О., Гарманчук Л. В. Рівень малонового диальдегіду в культивованих клітинах за впливу сполук зі стимулюючою та інгібуючою дією на проліферацію. // *ScienceRise: Biological Science*. – 2016. – N 3(3). – С. 61-64.
26. Akleyev A. V. Early hematopoietic effects of chronic radiation exposure in humans / A. Akleyev, I. Akushevich, G. Dimov, G. Veremeyeva, T. Varfolomeyeva, S. Ukraintseva, A. Yashin // *Health Phys.* – 2010. – Vol. 99(3). – P. 330–336.
27. Atale N., Gupta S., Yadav U. C. S., Rani V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques // *J Microsc.* – 2014. – Vol. 255(1). – P. 7-19.
28. Azqueta A., Gutzkow K.B., Brunborg G., Collins A.R. Towards a more reliable comet assay: optimizing agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. // *Mutat Res.* – 2011. – Vol. 724(1-2). – P. 41-45.
29. Batel R., Jaksic Z., Bihari N., Hamer B. et al. A Microplate Assay for DNA Damage Determination (Fast Micromethod) in Cell Suspensions and Solid Tissues // *Analytical Biochemistry*. – 1999. – Vol. 270. – P.195–200.
30. Bilko N. Assessment of hemopoietic progenitor cells in patients affected by Chernobyl accident and risk of oncohematological diseases // In: *Rapid Diagnosis of a Population in an Emergency and at Risk after Exposure to Ionizing Radiation and Chemicals*. A. Cebulska-Wasilewska, A. Osipov (eds). – IOS Press, 2010. – P.95–101.
31. Bilko N. M. Circulating hematopoietic progenitor cells in patients affected by Chornobyl accident / N. M. Bilko, I. S. Dyagil, I. Z. Russu, D. I. Bilko // *Experimental Oncology*. – 2016. - Vol. 38, N 4. - P. 242-244.

32. Bilko N. M., Votjakova I. A., Vasilovska S. V., Bilko D. I. Characterization of the interaction between stromal and haematopoietic progenitor cells in expansion cell culture models // *Cell Biol. Int.*, 2005. – Vol. 29 (1). – P. 83–86.
33. Bolann BJ, Tangerås A, Ulvik RJ. Determination of manganese superoxide dismutase activity by direct spectrophotometry. // *Free Radic Res.* – 1996. – Vol. 25(6). – P.541-546.
34. Borbulyak I., Rodionova N., Bilko N. Complex assessment of hematopoietic system state of laboratory animals under internal strontium-90 irradiation / *Problems of radiation medicine and radiobiology.* – 2012. – Vol. 17. – P. 359-364.
35. Chen Q. Apoptosis, necrosis and autophagy in mouse intestinal damage after 15 Gy whole body irradiation / Q. Chen, X. Xia, S. Wu, A. Wu et al. // *Cell Biochem and Func.* – 2014. – Vol. 32. – P. 647-656.
36. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. // *Mol Biotechnol.* – 2004. – Vol. 26(3). – P. 249-261.
37. 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.
38. Eltahawy N. Synergistic effect of aluminum and ionizing radiation upon ultrastructure, oxidative stress and apoptotic alterations in paneth cells of rat intestine / N. Eltahawy, S. Elsonbaty, S. Abunour, W. Zahran // *Environ Sci Pollut Res Int.* – 2017. – Vol. 24(7). – P. 6657-6666.
39. Enciso JM, Gutzkow KB, Brunborg G, Olsen AK, López de Cerain A, Azqueta A. Standardisation of the in vitro comet assay: influence of lysis time and lysis solution composition on the detection of DNA damage induced by X-rays. // *Mutagenesis.* – 2018. – Vol. 33(1). – P. 25-30.

40. Eyvazzadeh N., Neshasteh-Riz A., Mahdavi S. R. DNA damage of glioblastoma multiform cells induced by beta radiation of Iodine-131 in the presence or absence of topotecan: a PicoGreen and colonogenic assay // *Cell J.* – 2015. – Vol.17 (1). – P. 99-110.
41. Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. // *Nat Protoc.* – 2006. – Vol. 1(5). – P. 2315-2319.
42. Frey J, Chamson A, Raby N. Separation of amino acids using ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography with special reference to collagen hydrolysate. // *Amino Acids.* –1993. – Vol. 4(1-2). – P. 45-51.
43. Hadwan MH, Ali SK. New spectrophotometric assay for assessments of catalase activity in biological samples. // *Analytical Biochem.* – 2018. – Vol. 542. – P. 29-33.
44. Leonard A. Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods / A. Leonard, J. Rueff, G. Gerber, E. Leonard // *Rad Prot Dosim.* – 2005. – Vol. 115 (1-4). – P. 448-454.
45. Lindy S., Halme J., Turto H. et al. Collagenolytic activity in rheumatoid synovial tissue // *Clin. Chim. Acta.* – 1973. – Vol. 47, N 2 – P. 153–157.
46. Lu F. A clonogenic survival assay of neural stem cells in rat spinal cord after exposure to ionizing radiation / F. Lu, C. Shun Wong // *Rad Res.* – 2005. – Vol. 163. – P. 63-71.
47. McCulloch E. A., Till J. E. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice // *Radiation Research.* – 1960. – Vol. 13, No 1. – P. 115-125.
48. Munshi A., Hobbs M., Meyn R.E. Clonogenic cell survival assay. // *Methods Mol Med.* – 2005. – Vol. 110. – P. 21-28.

49. Panganiban R. Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells / R. Panganiban, A. Snow, R. Day // *Int J Mol Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P.15931-15958.

50. Pathak R. Detection of inter-chromosomal stable aberrations by multiple fluorescence in situ hybridization (mFISH) and spectral karyotyping (SKY) in irradiated mice / R. Pathak, I. Koturbash, M. Hauer-Jensen // *J Vis Exp.* – 2017. – Vol.119. – e55162.

51. Russu I, Rodionova N, Bilko D, Bilko N. Mesenchymal stem and progenitor cells of rats' bone marrow under chronic action of ionizing radiation. – *Problems of radiation medicine and radiobiology.* – 2017. - Vol. 22. – P. 224-230.

52. Schroder H. C., Batel R., Schwertner H., Boreiko O., Muller W. E. Fast micromethod DNA single-strand-break assay. // *Methods Mol Biol.* – 2006. – Vol. 314. – P. 287-305.

53. Siddiqi N. J. Investigation into the distribution of total, free, peptide-bound, protein-bound, soluble- and insoluble-collagen hydroxyproline in various bovine tissues / N. J. Siddiqi, A. S. Alhomida // *J Biochem Mol Biol.* – 2003. – Vol. 36(2). – P. 154–158.

54. Singh N. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage / N.P. Singh, R.E. Stephens & E.L. Schneider // *International Journal of Radiation Biology.* – 1994. – Vol.66 (1). – P. 23-28.

55. Skalicka Z. Indicators of oxidative stress after ionizing and/or non-ionizing radiation: superoxid dismutase and malondialdehyde / Z. Skalicka, F. Zolzer, L. Beranek, J. Racek // *J Photochem Photobiol B.* – 2012. – Vol. 117. – P. 111-114.

56. Stegemann H, Stalder K. Determination of hydroxyproline. // *Clin Chim Acta.* – 1967. – Vol. 18(2). – P. 267-273.

57. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. // Analytical Biochem. – 2017. – Vol. 524. – P. 13-30.

58. Zhang S. PicoGreen assay of circular DNA for radiation biodosimetry / S. B. Zhang, S. Yang, S. Vidyasagar, M. Zhang // Rad Res. – 2015. – Vol. 183. – P. 188-195.

59. <https://www.thermofisher.com/ua/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/>

ДОДАТКИ

Таблиця 1

Одиниці радіоактивності і доз (за Гайченком В. А. та співавт., 2010 [9])

№ з/п	Величина	Одиниця		Позначення	
		СІ	позасистемна	українське	міжнародне
1	Активність радіонукліду	Бекерель ($2,7 \times 10^{-11}$ Кі)	Кюрі ($3,7 \times 10^{10}$ Бк)	Бк Кі	Bq Ci
2	Доза поглинена	Грей (1×10^2 рад)	рад (1×10^{-2} Гр)	Гр рад	Gy rad
3	Доза експозиційна	кулон на кілограм ($3,88 \times 10^3$ Р)	рентген ($2,58 \times 10^{-4}$ Кл/кг)	Кл/кг Р	C/kg R
4	Доза еквівалентна	Зіверт (1×10^2 бер)	бер (1×10^{-2} Зв)	Зв бер	Sv rem
5	Потужність поглиненої дози	Грей за секунду (1×10^2 рад/с)	рад за секунду (1×10^{-2} Гр/с)	Гр/с рад/с	Gy/s rad/s
6	Потужність еквівалентної дози	Зіверт за секунду (1×10^2 бер/с)	бер за секунду (1×10^{-2} Зв/с)	Зв/с бер/с	Sv/s rem/s
7	Потужність експозиційної дози	ампер на кілограм ($3,88 \times 10^3$ Р/с)	рентген за секунду ($2,58 \times 10^{-4}$ А/кг)	А/кг Р/с	A/kg R/s

Таблиця 2

**Характеристики клітинних ліній,
що застосовуються у радіобіологічних дослідженнях
(за Franken N., 2006, Білько Д., 2017 [6, 41])**

№ з/п	Назва лінії	Походження клітин	Живильне середовище	Вміст сироватки	Вміст CO₂
1	AG1522	фібробласти людини	D-MEM/ F-12	15%	5%
2	CHO	клітини яєчника китайського хом'ячка	MEM	10%	5%
3	Cor123	клітини раку легень людини	DMEM	10%	5%
4	DLD1	клітини карциноми людини	RPMI	10%	5%
5	DU-145	клітини пухлини простати людини	RPMI	10%	5%
6	EAh926	клітини ендотелію вени пуповини людини	DMEM	10%	5%
7	Gli-6	клітини гліобластоми людини	D-MEM	10%	10%
8	MCF-7	клітини раку грудної залози людини	RPMI	10%	5%
9	PC3	клітини пухлини простати людини	RPMI	10%	5%
10	RKO	клітини колоректального раку людини	McCoys 5A	10%	5%
11	SW1573	клітини карциноми легень людини	L-15	10%	0%
12	T-47D	клітини раку грудної залози людини	RPMI	10%	5%
13	U87MG	клітини гліобластоми людини	DMEM	10%	5%
14	V-79	фібробласти легень китайського хом'ячка	MEM	10%	5%
15	СПЕВ	клітини нирки ембріона свині	199	5-10%	5%

**Показники вмісту окремих форм клітин
у кістковому мозку людини у нормі
(за Третяк Н. М., 2005 [23])**

№ з/п	Форми клітин	Вміст, %
1	Мієлобласти	0-0,1
2	Промієлоцити	0,8-6,7
3	Нейтрофіли мієлоцити метамієлоцити паличкоядерні сегментоядерні	5,4-14,5 6,5-15,0 14,8-27,5 14,6-28,3
4	Еозинофіли мієлоцити метамієлоцити паличкоядерні сегментоядерні	0,4-3,0 0,2-2,0 0,3-2,5 0,8-3,4
5	Базофіли	0,1-1,4
6	Лімфоцити	4,8-13,8
7	Плазматичні клітини	0,2-3,2
8	Мегакаріоцити	0,1-0,2
9	Еритробласти	0,4-2,6
10	Пронормоцити	2,8-4,8
11	Нормоцити базофільні поліхроматофільні оксифільні	1,4-4,6 8,9-16,9 0,8-5,6
12	Ретикулярні клітини	0-0,1

**Показники вмісту окремих форм лейкоцитів
у периферійній крові людини у нормі
(за Третяк Н. М., 2005 [23])**

№ з/п	Форми лейкоцитів	Вміст, %
1	Мієлоцити	0
2	Метамієлоцити	0
3	Нейтрофіли паличкоядерні	1-6
4	Нейтрофіли сегментоядерні	45-70
5	Еозинофіли	0-5
6	Базофіли	0-1
7	Лімфоцити	18-40
8	Моноцити	2-9