

ВПЛИВ РАДІОНУКЛІДА СТРОНЦІЮ-90 НА КРОВОТВОРЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН В УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ IN VIVO

У роботі досліджено вплив радіоактивного стронцію-90 на гемопоез щурів Вістар у культурі клітин in vivo. Було з'ясовано, що стронцій-90, який інкорпорується у кістках щурів, призводить до достовірного зниження кількості колонієутворюючих одиниць у кістковому мозку тварин. Довготривале культивування кровотворних клітин-попередників щурів у культурі клітин in vivo дало змогу виявити процес подолання затримки колонієутворення, що свідчить про потенційні можливості кровотворної системи опромінених щурів до репарації.

У віддалений період після аварії на Чорнобильській атомній електростанції проблема внутрішнього опромінення радіонуклідами набуває дедалі більшого значення. Серед радіонуклідів, які найбільше непокоять, треба відзначити стронцій-90. Незважаючи на те, що його вміст у довкіллі поступається цезію-137, через високу міграційну здатність і тривалий період напіврозпаду (28-30 років) його вплив стає щодалі суттєвішим [1].

Метаболізм стронцію полягає у зв'язуванні з протеїнами та формуванні комплексів із неорганічними аніонами, наприклад карбонатами чи фосфатами, та з органічними кислотами, наприклад цитратом чи лактатом. Механізм дії стронцію значною мірою пов'язаний із хімічною подібністю до кальцію, що призводить до заміщення його у кістках та багатьох клітинних комплексах, які містять кальцій. Так, впливу стронцію може суттєво піддаватися синаптична передача, і, як наслідок, при високих його концентраціях відмінності між стронцієм та кальцієм можуть бути причиною нейротоксичних та нейром'язових порушень, що виникають при постійній інтоксикації стронцієм [2].

Найбільш небезпечною для організму є інкорпорація у кістках радіоактивного стронцію, що виділяє бета-частинки і опромінює тканини навколо. Після депонування у скелеті цей ізотоп залишається там тривалий час, постійно опромінюючи кісткову тканину та кістковий мозок, внаслідок чого у них спостерігаються суттєві патологічні зміни, порівняно з іншими тканинами організму [3].

Метою дослідження була оцінка впливу радіоактивного ізотопу стронцію-90 на кровотворну систему щурів і аналіз потенційних можливостей клітин-попередників опроміненого кісткового мозку до репарації.

Матеріали та методи

У роботі було використано 30 щурів Вістар, яких утримували в умовах віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Першу групу становили здорові тварини відповідного віку, які перебували на стандартному харчовому раціоні. Другій групі щоденно протягом 6 місяців (з 4-місячного до 10-місячного віку) вводили з їжею стронцій-90 активністю 5 кБк/добу. Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до вимог біоетики.

Було обстежено показники периферичної крові і кісткового мозку цих тварин. Проводили забір периферичної крові експериментальних тварин із хвостової вени для приготування препаратів-мазків стандартним способом із подальшою фіксацією у метанолі та забарвленням за Паппенгеймом. Кістковомозкові клітини щурів отримували зі стегнової кістки. Для цього їх вимивали середовищем RPMI і з метою ресуспендування пропускали через голки зменшеного діаметру. Підрахунок клітин здійснювався меланжерним методом у камері Горяєва загальноприйнятим способом. Паралельно виготовляли препарати-відбитки кісткового мозку щурів для цитологічних досліджень, фіксуючи їх у метанолі та забарвлюючи за Паппенгеймом.

Культивування отриманих кістковомозкових клітин у культурі проводили у культурі in vivo. Суспензію клітин кісткового мозку щурів змішували з основним живильним середовищем, що містить середовище RPMI, фетальну телячу сироватку, 0,33 % агар Difco та антибіотики, і у напіврідкому агаровому гелі вводили у внутрішню порожнину гелевих дифузійних камер, прокалюючи бічну стінку ін'єкційною голкою. Як дифузійні камери використовували пористі капсули у вигляді таблетки заввишки 0,7 см і діаметром

ром 1,5 см, виготовлені з полімерного матеріалу [4]. За реципієнтів камер використано мишей лінії СВА. Операцію мишам проводили за допомогою парентерального введення наркозу - 1 % тіопенталу натрію. У перитонеальну порожнину кожної тварини вводили по дві камери. Лінію розрізу зашивали у стерильних умовах пошарово шовковою ниткою.

Для дослідження гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників проводили обробку мишей за допомогою підшкірного введення 200 мг/кг ваги циклофосфаміду за добу до досліду, що сприяло підвищенню колонієстимулюючій активності і супресії імунологічної реактивності тварини.

Облік результатів проводили на 14-й та 21-й день культивування. Колонії-клони піддавали кількісному обліку під інвертованим мікроскопом безпосередньо в камері. Ефективність клонування гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників визначали за числом колоній-клонів [5]. Кількісний облік клонів на дифузійну камеру супроводжувався перерахунком на 10^5 клітин. Окремі клони ізолювали, переносили у живильне середовище з 20 % сироватки та готували препарати на цитоцентрифузі (Shandon, UK). Препарати, які фіксували у метанолі, забарвлювали за Паппенгеймом та аналізували під світловим мікроскопом.

Частину препаратів фіксували у 3 % формаліні для цитохімічного забарвлення. З цією метою використовували такі методики: визначення активності мієлопероксидази, кислої фосфатази та лужної фосфатази, виявлення полісахаридів (PAS-реакція) [6].

Для забарвлення гематоксилін-еозином препарати фіксували метанолом, потім впродовж 10 хв інкубували з гематоксиліном та перенесли у розчин еозину на 2 хв, після чого досліджували під мікроскопом [7].

Результати та обговорення

Аналіз результатів даних з морфології кровотворних клітин у трьох серіях експериментів показав, що у гемограмах контрольної групи щурів співвідношення гемопоетичних клітин знаходилося у межах фізіологічних величин. Проте було відзначено серйозні відхилення у морфології клітин периферичної крові у щурів, опромієних стронцієм. Так, особливою якісною характеристикою клітин крові у дослідної групи щурів були гіпер- і гіпосегментація ядер нейтрофілів, фрагментація ядер, відщеплення ядерного хроматину, рідерівські форми лімфоцитів. Аналіз мієлограм свідчив про наявність диспластичних морфологічних змін, виявлених у клітинах всіх ростків кровотворення. В елементах гранулоци-

тарного ряду визначали патологічну зернистість, повну чи часткову дегрануляцію цитоплазми нейтрофільних мієлоцитів і метамієлоцитів, фрагментацію і гіпосегментацію ядер зрілих нейтрофілів. У лімфоцитах виявляли бахромчастість, базофілію і вакуолізацію цитоплазми. Дизмегакаріоцитопоез проявлявся наявністю мікромегакаріоцитів, мегакаріоцитів з круглими ядрами і частковим відшнуровуванням тромбоцитів. В еритрокаріоцитах спостерігали явище каріорексису, асинхронне дозрівання ядра і цитоплазми, наявність цитоплазматичних містків між клітинами, одиничні двоядерні нормобласти, острівцеві накопичення еритроїдних клітин.

Оцінка функціональної активності кровотворних клітин-попередників передбачала, насамперед, визначення у культурі клітинних концентрацій, у межах яких зберігався клональний характер росту клітин-попередників. Проведені дослідження показали, що при культивуванні 1×10^5 мононуклеарних клітин у двотижневий термін формується від 13 до 15 колоній. При збільшенні кількості клітин у культурі ефективність колонієутворення збільшувалась. Наявність лінійної залежності між кількістю експлантованих клітин та вирощених до 2-тижневого терміну колоній у межах клітинних концентрацій (від 3×10^4 до 1×10^6) свідчила про клональний характер росту останніх.

Аналіз клітинного складу ізолюваних і підданих цитоцентрифугуванню клонів показав, що вони складаються з гранулоцитів різного ступеня зрілості, серед яких превалювали гіперсегментовані форми, і макрофагальних елементів (рис. 1).

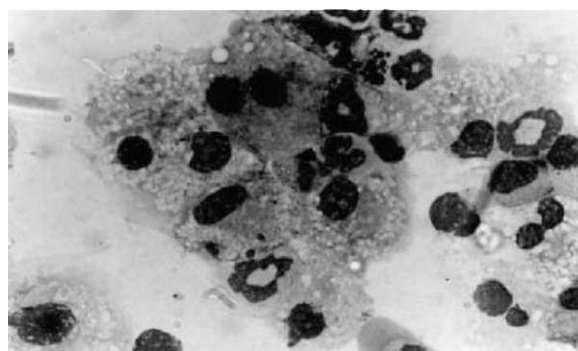


Рис. 1. Диференціювання клітин кісткового мозку щурів у гранулоцитарному напрямку у культурі *in vivo*. Забарвлення за Романовським-Гімза. 36. х 900

Зміни у кістковому мозку в обстежених щурів виражалися у підвищеній клітинності, збільшенні кількості еозинофільних лейкоцитів і дисгемопоезі.

Оцінка функціональної активності кровотворного ростка контрольних і дослідних щурів передбачала, найперше, аналіз процесу форму-

вання клітинних агрегатів у культурі протягом всього терміну культивування.

У культурах контрольних щурів перші агрегати, що склалися з 3-6 клітин, виявляли на 3-тю добу культивування. Перші колонії з'являлись на 5-6-ту добу. В подальшому відбувалося збільшення кількості колоній. Максимальну кількість реєстрували на 13-й день культивування. Через 16-18 днів клітини у колоніях розташовувалися менш компактно, кожна з них була оточена дифузно розміщеними клітинами.

Кількість кластерів з 5-6-го дня, тобто з моменту появи перших колоній, зменшувалася, на 12-14-й день їхня кількість ставала стабільною і становила 20 % від кількості колоній. Розмір колоній збільшувався до 13-15-го дня. Кількість клітин у них коливалася у межах від 40 до 100. За характером росту в культурі тканини *in vivo* розрізняли такі типи колоній: компактні, що містять від 40 до 80 щільно прилеглих одна до одної клітин; дифузні, що складаються з клітин, розташованих на віддалі одна від одної; і компактні з дифузним вінчиком. Деякі дослідники пов'язують тип колонії з терміном її існування. Так, компактні колонії з'являються найпершими. Через деякий час така колонія стає компактною з дифузним вінчиком (рис. 2), а найтриваліший термін існування, характерний для дифузних колоній, дорівнює 16-18 діб [8].

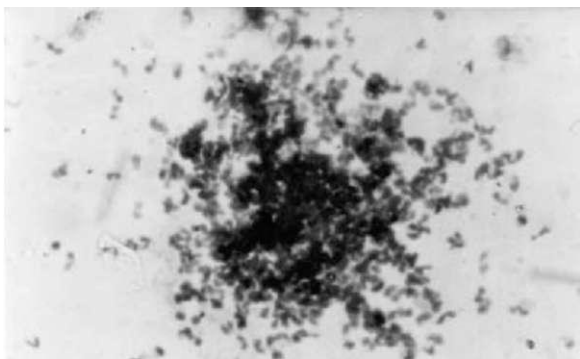


Рис. 2. Гранулоцитарно-макрофагальна (компактна з вінчиком) колонія кісткового мозку щура, опроміненого стронцієм. Забарвлення за Романовським-Гімза. 36. x 200

За ефективність клонування взято кількість колоній, що виростають до двотижневого терміну. У першій групі щурів ефективність клонування кісткового мозку у культурі тканини *in vivo* становила $13,4 \pm 2,6$ на 1×10^5 експлантованих клітин і виражалася у переважному рості гранулоцитарно-макрофагальних колоній. Аналіз отриманих даних показав, що у культурі тканини *in vivo* у другій групі тварин визначалося чітко виражене, порівняно з нормою, пригнічення колонієутворення. Ефективність клонування

гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників щурів, оброблених стронцієм, спостерігалась у межах від 4 до 7 клонів і становила відповідно $6,5 \pm 1,2$ на 1×10^5 експлантованих клітин (рис. 3).

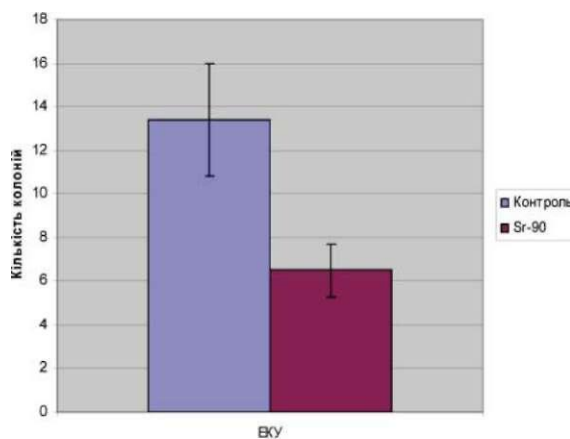


Рис. 3. Ефективність колонієутворення у культурі *in vivo* у контрольній та дослідній групах щурів, опроміненних радіонуклідом стронцію-90

Треба зазначити, що кількість клітин у клонах на момент зняття результатів у культурах кісткового мозку другої групи тварин не перевищувала 30-35, і такі клітинні агрегати за загальноприйнятими правилами не могли вважатися колоніями, тобто були кластерами. Продовження термінів культивування *in vivo* показало, що до 21-24-го дня клітинність у клонах досягала кількості, починаючи з якої клітинний агрегат вважається колонією, тобто 40 клітин, і навіть перевищувала його. При цьому кількість колоній відповідає нормі.

За даними літератури, ефект затримки формування колоній і їх «доростання» до пізнішого терміну проявляється під впливом опромінення у клітин ссавців, найпростіших, клітин дріжджів [9], що дає право затримки колонієутворення в культурах опроміненних щурів вважати пов'язаною з опроміненням.

Диференційований підрахунок клітин у клонах свідчив про наявність у них гемопоетичних клітин гранулоцитарно-макрофагального напряму всіх етапів зрілості: від бластної клітини до сегментоядерного лейкоцита, також були присутніми плазматичні клітини та макрофаги (табл. 1).

Залежно від ступеня зрілості гранулоцити було розділено на ранні та пізні. До ранніх віднесено бластні клітини, промієлоцити і мієлоцити, а до пізніх - метамієлоцити, юні, паличкоядерні і сегментоядерні лейкоцити. Аналіз складу клітинних елементів, згрупованих за принципом зрілості, що становили групи ранніх і пізніх гра-

нулоцитів, вказав на наявність різниці у досліджуваній групі тварин порівняно з контролем. Диференційований підрахунок гранулоцитів у межах вказаних груп, залежно від ступеня зрілості, свідчив про їхній перерозподіл у межах групи пізніх попередників, а саме зсув вліво.

Таблиця 1. Диференційований облік клітин у клонах гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників у щурів, підданих впливу іонізуючого опромінення стронцію у культурі тканин *in vivo*

Диференціювання клітин у клонах, %	Група контрольних тварин	Група дослідних тварин
бласти	1	0
промієлоцити	1	2
мієлоцити	15	11
метамієлоцити	17	20
юні	7	23
паличкоядерні	25	20
сегментоядерні	27	22
плазматичні	2	0
макрофаги	5	2

Зниження ефективності клонування супроводжувалося не тільки змінами у проліферативній активності, але й у характері диференціювання клітин у клонах. Формування еозинофільних колоній, що склалися з еозинофільних мієлоїдних клітин, у культурі кісткового мозку щурів спостерігалось у першій групі у 4 % випадків, а в другій - у 20 %. Інші агрегати були представлені нейтрофільними кластерами і нейтрофільними колоніями. Їхня гранулоцитарна природа підтверджувалася наявністю пероксидази у цитоплазмі цих клітин. На нашу думку, посилення проліферативної активності еозинофільних елементів у культурі пов'язується зі стимулюючим впливом стронцію на цитокінову регуляцію, особливо на інтерлейкін-5, що відповідає за регуляцію еозинофільного ростка. Причини цього феномену можуть полягати у захисно-адаптаційній реакції організму, у якій еозинофіли, що переважають усі інші мононуклеари ферментативною активністю, беруть на себе функцію захисту у відповідь на дію іонізуючої радіації [8].

Застосування цитохімічних методів забарвлення у вивченні культуральних препаратів надало можливість отримати додаткову інформацію для аналізу морфофункціональних особливостей кістковомозкового кровотворення у обстежених щурів.

Активність пероксидази і кислій фосфатази у клонах проявлялась у вигляді дифузного забарвлення цитоплазми. По периферії колоній виявлялись клітини, що дають позитивну реакцію на

лужну фосфатазу. У центрі гранулоцитарних колоній спостерігали мієлобласти, у яких активність пероксидази була яскраво вираженою. У цих клітинах відзначалась також активність кислій фосфатази у вигляді дифузного забарвлення цитоплазми. Активність лужної фосфатази не визначалась. У промієлоцитах, розміщених у безпосередній близькості до центру колоній, порівняно з юніми, паличкоядерними і сегментоядерними лейкоцитами, розташованими по периферії колоній, активність названих ферментів була вищою.

У зрілих лейкоцитах, на відміну від проліферуючих елементів, у 50 % клітин спостерігалась позитивна реакція на лужну фосфатазу. Отримані дані свідчили про те, що за цитохімічними характеристиками клітинні елементи, що формують колонії, належать до класу дозріваючих і зрілих клітин.

PAS-реакція у гранулоцитах мала дифузний характер. У зрілих сегментоядерних лейкоцитах спостерігали на тлі дифузного забарвлення чіткі малинові гранули.

У препаратах, приготовлених із культур з переважанням еозинофільних елементів різного ступеня зрілості, цитохімічні характеристики мали ряд особливостей. Активність пероксидази і кислій фосфатази була високою і переважала контрольний показник. Глікоген у зрілих еозинофільних лейкоцитах не розташовувався дифузно по цитоплазмі, а концентрувався між специфічними гранулами, які залишалися незабарвленими.

Аналіз гістологічних препаратів, забарвлених гематоксилін-еозином, показав, що у центрі колоній концентрувалися бластні клітини (не більше 3 %) і мієлоцити, метамієлоцити становили середню частину колоній, гранулоцити формували периферичну частину колоній, розташовуючись компактно чи дифузно, залежно від типу колоній. Компактні колонії становили 30 %, дифузні з вінчиком - 50 %, а дифузні - 20 % від всіх колоній у межах однієї культури.

Таким чином, у щурів у результаті опромінення їх стронцієм спостерігалось зниження ефективності колонієутворення (ЕКУ) у культурі, що супроводжувалося ростом незрілих форм гранулоцитів, деструкцією клітин і еозинофільним напрямком диференціювання. Зниження ефективності клонування гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників у культурі гелевих дифузійних камер може бути пов'язане з їхньою радіочутливістю. Інгібуючі ефекти опромінення проявляються у пригніченні проліферативної активності клітин у клонах і зниженні ефективності їхнього клонування.

1. Chesser R. K., Rodgers B. E., Wickliffe J. K. et al. Accumulation of ¹³⁷Cesium and ⁹⁰Strontium from abiotic and biotic sources in rodents at Chernobyl, Ukraine // *Environmental Toxicology and Chemistry*. - 2001. - Vol. 20. - № 9. - P. 1927-1935.
2. Толстых Е. И., Кожеуров В. П., Вьюшкова О. В. Анализ метаболизма стронция в организме человека на базисе данных р. Теча // *Радиационная биофизика окружающей среды*. - 1997. - № 36. - С. 25-29.
3. Пинчук Л. Б., Родионова Н. К., Липская А. И. и соавт. Костномозговое кроветворение: изучение на протяжении 10 лет после аварии на ЧАЭС // *Экспериментальная онкология*. - 1996. - Т. 18. - № 12. - С. 109-119.
4. Патент України № 2692. Спосіб виготовлення камери для культивування клітин / Білько Н. М. від 15.04.1994. Офіційний бюлетень «Промислова власність». - 1994. - № 5. - С. 218.
5. Bilko N. M., Bilko D. I. Novel methodological approaches in assessment and enrichment of stem cell population // *Stem cells and their potential for clinical application* / ed. by N. M. Bilko, V. Fehse et al. - Springer, 2008. - P. 201-210.
6. Глузман Д. Ф., Абраменко И. В., Склярченко Л. М., Надгорная В. А. Лабораторная диагностика онкогематологических заболеваний. - К.: Морин, 1998. - 335 с.
7. Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Шахов В. П. Методы культуры ткани в гематологии. - Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1992. - 273 с.
8. Білько Н. М. Кроветворні клітини-попередники при радіаційному опроміненні (експериментально-клінічне дослідження): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.01 / НАН України; Ін-т експ. патол., онкол. і радіобіол. - К., 1998. - 31 с.
9. Капульцевич Ю. Г. Количественные закономерности лучевого поражения клеток. - М.: Атомиздат, 1978. - 231 с.

I. Borbulyak, N. Bilko

THE INFLUENCE OF STRONTIUM-90 RADIONUCLIDE ON THE HEMOPOIESIS OF LABORATORY ANIMALS IN THE *IN VIVO* CELL CULTURE

The influence of incorporated in rat bones radioactive Strontium-90 on the hemopoiesis in the in vivo cell culture was shown in this research. It was determined that Strontium-90 causes reliable decrease in the number of colony-forming units in rat bone marrow. Long-term in vivo culture of hemopoietic precursor cells showed the overcoming of the colony-forming delay. It can be the evidence of primary hemopoietic stages reparation.