

СЕКЦІЯ

РАДІОБІОЛОГІЯ. БІОЛОГІЧНА БЕЗПЕКА

УДК539.16.04+612.119+576.535+51-76

Білько Н. М.,

д-р біол. наук, професор,
завідувач кафедри лабораторної діагностики біологічних систем,
Національний університет «Києво-Могилянська академія»,
м. Київ, Україна

Руссу І. З.,

канд. біол. наук, доцент,
доцент кафедри лабораторної діагностики біологічних систем,
Національний університет «Києво-Могилянська академія»,
м. Київ, Україна

Білько Д. І.,

канд. біол. наук, доцент,
доцент кафедри лабораторної діагностики біологічних систем,
Національний університет «Києво-Могилянська академія»,
м. Київ, Україна

Бойко Р. В.,

д-р фіз.-мат. наук, професор,
провідний науковий співробітник
Центру молекулярних і клітинних досліджень
Національний університет «Києво-Могилянська академія»,
м. Київ, Україна

АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ КОЛОНІЇУТВОРЕННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ЛЕТАЛЬНО ОПРОМІНЕНИХ МИШЕЙ СВА У КУЛЬТУРІ КЛІТИН ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ МАТЕМАТИЧНОГО МОДЕЛЮВАННЯ

Вивчення змін у кровотворенні при дії іонізуючої радіації дозволяє не лише здійснити оцінку цієї системи, а й зробити припущення про стан усього організму, оскільки гемопоетична система є однією із найчутливіших до опромінення та реагує на цей вплив навіть за дії незначних доз радіації. Доцільним є визначення функціональної активності гемопоетичних стовбурових клітин, а також клітин-попередників кісткового мозку, що дозволяє виявити зміни у їх проліферації та оцінити здатність до відновлення після опромінення.

Метою дослідження був аналіз показників колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників мишей СВА, опромінених у сумарній дозі 8 Гр, при культивуванні у культурі дифузійних камер *in vivo*, а також порівняння отриманих результатів із даними, отриманими шляхом математичного моделювання на основі показників селезінкового колонієутворення мишей, опромінених аналогічним чином.

Математична модель побудована Бойком Р. В. зі співавт. [2] на основі схеми кровотворення, запропонованої Чертковим Й. Л. [4]. Згідно із цією схемою, гемопоез протягом усього життя підтримується стовбуровими клітинами, які поступово поповнюють популяцію колонієутворюючих одиниць (КУО) кісткового мозку, що в подальшому дають початок усім клітинам крові. Математична модель процесу кровотворення має за основу показники функціонування популяції КУО кісткового мозку та може бути застосована для дослідження процесів відновлення гемопоезу після дії іонізуючої радіації [3].

За допомогою даної математичної моделі проаналізовано експериментальні результати досліджень, проведених Чертковим К. С. та співавт. [5]; у них вивчали вплив γ -опромінення у дозі 8 Гр на чисельність КУО кісткового мозку мишей, а також процеси подальшого відновлення гемопоезу. Кількість КУО автори визначали методом селезінкового колонієутворення [7].

Для підтвердження можливостей запропонованої нами математичної моделі було проведено експериментальні дослідження за таких же умов опромінення, використовуючи інший метод оцінки процесів відновлення гемопоезу після дії іонізуючої радіації – а саме, культивування клітин у гелевих дифузійних камерах *in vivo* [6]. Дане дослідження було проведено із використанням мишей лінії СВА, підданих пролонгованому летальному опроміненню у сумарній дозі 8 Гр. Всі маніпуляції із тваринами здійснювались відповідно до вимог біоетики та міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин і національного законодавства з гуманного поводження із тваринами, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей.

Гемопоетичні клітини-попередники кісткового мозку мишей у різні терміни після опромінення вилучали та культивували у напіврідкому агарі у дифузійних камерах, внесених у черевну порожнину мишей-реципієнтів, протягом 7 діб. Після цього визначали кількість отриманих колоній (КУО_{дк}) під інвертованим мікроскопом на різних етапах відновлення кровотворення мишей після опромінення – а саме, на 3-тю, 9-ту, 19-ту і 30-ту добу. Отримані показники колонієутворення перераховували на стегнову кістку миші, беручи до уваги, що в нормі

кількість КУО у кістковому мозку стегнової кістки мишей складає приблизно 5,6 тис. [5].

Відновлення гемопоетичної системи після опромінення значною мірою визначається саме відновленням популяції КУО кісткового мозку. Основними показниками, які визначають рівень впливу опромінення на систему кровотворення, є чисельність КУО кісткового мозку та особливості процесу їх відновлення після припинення опромінення, а саме, відносний рівень стабілізації кількості КУО кісткового мозку.

Було визначено кінетику процесів відновлення кількості КУО після пролонгованої дії іонізуючого опромінення при культивуванні клітин кісткового мозку у культурі дифузійних камер *in vivo*, у порівнянні із методом селезінкового колонієутворення (табл. 1).

Таблиця 1 – Кінетика колонієутворення клітин-попередників кісткового мозку мишей після пролонгованого опромінення в сумарній дозі 8 Гр

Доба після опромінення	Кількість КУОдк у розрахунку на стегнову кістку	Кількість КУОс у розрахунку на стегнову кістку [5]	Відносна чисельність КУО кісткового мозку у розрахунку на стегнову кістку [1]
3-а	4,3±0,4	20,1±3,8	0,004
9-а	53,3±2,8	267,0±65,0	0,048
19-а	910,5±20,5	4774,0±374,0	0,850
30-а	1055,0±25,5	5507,0±1701,0	0,981

Результати колонієутворення клітин-попередників кісткового мозку в культурі гелевих дифузійних камер *in vivo* свідчили про двофазний характер відновлення гемопоезу. У перші кілька діб після опромінення спостерігається падіння кількості КУОдк, яке продовжується до 9-ї доби, після чого відбувається різке зростання кількості КУОдк у культурі клітин, яке продовжується до повного відновлення гемопоезу. У той же час дані селезінкового колонієутворення свідчать про різке зростання кількості КУОс, починаючи із 7-ї доби після опромінення.

Аналіз показників колонієутворення у дифузійних камерах дозволив виявити, що між 3-ю та 9-ю добою спостерігається зростання у 12 разів кількості КУОдк. У той же час кількість КУОдк на 19-ту добу більша у порівнянні з 9-ою добою у 17 разів, а на 30-ту добу в порівнянні із 19-ою добою – у 1,2 разу (табл. 1). Показники селезінкового колонієутворення свідчили про подібну кінетику процесу відновлення

гемопоезу після опромінення. Різниця у кількості КУОс між 3-ю та 9-ю добою становила 13 разів, між 9-ю та 19-ю – 18 разів, а між 19-ю та 30-ю – 1,2 разу. Незважаючи на різницю у абсолютних показниках колонієутворення у дифузійних камерах та у селезінці, тенденції відновлення гемопоезу виявилися співставними, тобто можна стверджувати, що метод культивування клітин у дифузійних камерах *in vivo* може використовуватися як спосіб оцінки гемопоезу на рівні з методом селезінкового колонієутворення.

Отже, було проведено дослідження кінетики колонієутворення клітин-попередників кісткового мозку мишей на етапах відновлення кровотворення після пролонгованого летального опромінення у дозі 8 Гр, використовуючи метод культури клітин у дифузійних камерах *in vivo*, у порівняльному аспекті з методом колонієутворення у селезінці. Було виявлено відповідність показників колонієутворення, отриманих методом гелевих дифузійних камер (КУОдк), та колонієутворення у селезінці (КУОс). У кількісному значенні ефективність колонієутворення цих клітин-попередників не однакова, але співставна. Отримані дані було опрацьовано із використанням математичної моделі кровотворення (Бойко Р. В. і співавт., 2010) [1, 2]. Математична модель дозволила визначити параметри, що характеризують реакцію кровотворної системи на різних етапах відновлення після припинення дії іонізуючої радіації. Такими параметрами є відносна чисельність КУО кісткового мозку у розрахунку на стегнову кістку та відносний рівень стабілізації кількості КУО кісткового мозку. Експериментальний підхід культивування клітин у гелевих дифузійних камерах *in vivo* може розглядатися як додатковий спосіб дослідження гемопоезу на рівні з методом селезінкових колоній.

Список використаних джерел

1. Білько Д. І. Аналіз впливу пролонгованого опромінення на гемопоетичні клітини/попередники у гелевих дифузійних камерах за допомогою математичного моделювання. / Д. І. Білько, Р. В. Бойко, І. З. Руссу, І. С. Дягіль, Н. М. Білько // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. – 2022. – Вип. 27. – С. 203–215.
2. Бойко Р. В. Математична модель функціонування системи кровотворення. / Р. В. Бойко, Н. М. Білько, Д. І. Білько // Києво-Могилянський науковий вісник. Біологія. – 2010. – Т. 1. – С. 1–10.
3. Бойко Р. В. Роль математичної моделі функціонування кровотвірної системи у поясненні процесів репарації гемопоезу після збурюючого впливу іонізуючої радіації. / Р. В. Бойко, Д. І. Білько, І. З. Бор-

буляк, Ю. К. Дупленко, Н. М. Білько // Києво-Могилянський науковий вісник. Біологія. – 2012. – Т. 3. – С. 1–6.

4. Чертков И. Л. Стволовая кроветворная клетка: дифференцировочный и пролиферативный потенциал. / И. Л. Чертков, Е. И. Дерюгина, Р. Д. Левир, Н. Г. Абрахим // Успехи современной биологии. – 1991. – Т. 111, вып. 6. – С. 905–922.

5. Чертков К. С. Влияние мощности дозы облучения на процессы поражения и восстановления колониобразующих клеток костного мозга. / К. С. Чертков // Радиобиология. – 1973. – Т. 13, вып. 3. – С. 368–372.

6. Bilko N. M. Novel methodological approaches in assessment and enrichment of stem cell population. / N. M. Bilko, D. I. Bilko // Stem Cells and Their Potential for Clinical Application, 2008. – P.201–210.

7. Till J. E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961. / J. E. Till, E. A. McCulloch // Radiat Res. – 2011. – Vol. 175(2). – P. 145–149.