

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

на тему: **«ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ГЕМОПОЕТИЧНИХ
КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ МИШЕЙ ЗА УМОВ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОЇ
РАДІАЦІЇ У РІЗНИХ ДОЗАХ»**

Виконала: студентка 2-го року
навчання
Галузь знань: 09 Біологія
Спеціальність: 091 Біологія
Освітньо-наукова програма:
Лабораторна діагностика
біологічних систем

Чернасова Єлизавета Андріївна

Керівник:
Білько Н. М.
докт. мед. наук, проф.
Рецензент:

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК _____
« ____ » _____ 20__ року

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Загальні відомості про гемопоетичну систему	9
1.2. Загальні відомості про вплив іонізуючого випромінювання на гемопоетичну систему	10
1.2.1. Дія іонізуючого випромінювання на роботу генетичного апарату гемопоетичних клітин	13
1.2.2. Вплив мікрооточення на роботу гемопоетичної системи при дії іонізуючого випромінювання	15
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	18
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ... ..	18
2.1. Об'єкт дослідження	18
2.2. Реактиви, матеріали та обладнання	19
2.3. Принципи опромінення лабораторних тварин	21
2.4. Вилучення клітин кісткового мозку	22
2.5. Культивування клітин у культурі дифузійних камер <i>in vivo</i>	23
2.6. Оцінка культивованих клітин	24
2.7. Приготування препаратів кровотворних клітин периферійної крові та кісткового мозку	25
2.8. Статистична обробка результатів	26
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	27
3.1. Динаміка колонієутворення клітин-попередників кісткового мозку мишей Valb/C в культурі дифузійних камер <i>in vivo</i>	27
3.2. Функціональна активність гемопоетичних клітин-попередників мишей Valb/C за умов гострого та довготривалого опромінення	28

3.3. Морфологічна та кількісна характеристика клітин периферійної крові та кісткового мозку мишей Balb/C, опромінених у різних дозах	33
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	45
ВИСНОВКИ	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

<i>Гр</i>	–	Г рей – одиниця поглиненої дози (1 Гр = 1 Дж/кг)
<i>ДД₁₀₀₋₃₀</i>	–	летальна доза опромінення
<i>ДНК</i>	–	д езоксирибон н уклеїнова к ислота
<i>КМ</i>	–	к істковий м озок
<i>ЛД₅₀₋₃₀</i>	–	півлетальна доза опромінення
<i>ПЕД</i>	–	п отужність е кспозиційної д ози
<i>ПК</i>	–	п ериферійна к ров
<i>ППД</i>	–	п оглинута п отужність д ози
<i>ЧАЕС</i>	–	Ч орнобильська а томна е лектростанція
<i>Alt- EJ</i>	–	Альтернативний шлях з'єднання кінців (The A lternative E nd J oining)
<i>ATM</i>	–	мутантний при атаксії-телеангіектазії білок (a taxia t elangiectasia m utated)
<i>BER</i>	–	репарація вирізання основ (b ase e xcision r epair)
<i>CHK2</i>	–	C heckpoint k inase 2
<i>DDR</i>	–	дволанцюгове пошкодження ДНК (D NA- d amage r esponse)
<i>DNA-PK</i>	–	D NA-dependent p rotein k inase
<i>DSB</i>	–	дволанцюгові розриви ДНК (DNA D ouble S trand B reaks)
<i>HR</i>	–	гомологічна рекомбінація (h omologous r ecombination)
<i>HSC</i>	–	гемопоетична стовбура клітина (h ematopoietic s tem c ell)
<i>MSC</i>	–	мезенхімальна стовбура клітина (m esenchymal s tem c ells)
<i>NHEJ</i>	–	не гомологічне з'єднання кінців (N on- H omologous)

End Joining)

- NF-κB* – **N**uclear **f**actor **κ**appa-light-chain-enhancer of activated **B** cells
- p53* – tumor **p**rotein **53**
- CPM* – міелоїдний попередник (**c**ommon **m**yeloid **p**rogenitor)
- T* – Т-лімфоцити
- B* – В-лімфоцити

ВСТУП

Вивчення впливу іонізуючого випромінювання проводиться вже не одне десятиліття. На сьогоднішній день існує велика кількість джерел іонізуючого випромінювання – як природних, так і штучних.

Штучне опромінення іонізуючою радіацією відбувається за застосування обладнання медичного, технічного та наукового спрямування, у атомній промисловості, при радіоактивних аваріях, ядерних вибухах. До штучного впливу акумулюється природне – природні радіоактивні ізотопи, сонячне випромінювання [1, 2].

Іонізуюча радіація, призводячи до певних фізіологічних і морфологічних змін, вкрай негативно впливає на організм ссавців та інші живі організми. Відомо, що навіть незначний вплив низьких доз іонізуючого випромінювання чинить уражувальну дію на організм, ступінь вираженості якої залежить від статі, віку, виду, загального стану організму, виду опромінення, режиму і дози опромінення [3, 4].

Найбільш чутливими до дії іонізуючого випромінювання є стовбурові клітини, мало диференційовані клітини, гамети. Таким чином, система кровотворення, у якій активно проходить диференціація клітин, є однією із найбільш чутливих до дії опромінення [4].

За дії іонізуючого опромінення навіть у незначних дозах, виявляються порушення функції, структури та життєздатності гемопоетичних клітин. Таким чином, опромінення спричиняє швидкий розвиток значної кількості порушень гемопоезу та, зокрема, лейкемій [3, 4].

Зворотність спричинених іонізуючим опроміненням змін залежить від поглинутої дози, виду випромінювання і безлічі інших згаданих вище факторів. Незворотні зміни призводять до анатомічних, функціональних, метаболічних та інших змін на всіх рівнях біологічної організації. У тварин, що зазнали опромінення, відбувається пряма деструкція зрілих клітин

периферійної крові, виявляються порушення гематологічних показників і припинення продукування клітин у системі кровотворення [4, 5].

Таким чином, незважаючи на велику кількість досліджень та публікацій на тему впливу іонізуючого випромінювання, на сьогоднішній день ця тема не є вичерпаною, тож проведення даної роботи допоможе поглибити наявні знання.

Метою даної роботи є дослідження впливу іонізуючої радіації у різних дозах на функціональну активність гемопоетичних клітин-попередників мишей, а також визначення морфологічних змін кісткового мозку і периферійної крові мишей, опромінених у різних дозах.

Для досягнення поставленої мети було визначено наступні завдання:

1. Провести культивування у дифузійних камерах *in vivo* кісткового мозку мишей Valb/C, опромінених у різних дозах, та встановити ефективність колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників.

2. Визначити вплив іонізуючого опромінення у різних дозах на показники функціональної активності гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку мишей Valb/C.

3. Визначити морфологічні особливості клітин периферійної крові та кісткового мозку мишей Valb/C при дії гострого і хронічного іонізуючого опромінення у різних дозах.

4. Провести кількісний аналіз показників периферійної крові та кісткового мозку мишей Valb/C, опромінених у різних дозах.

Об'єктом дослідження є вплив іонізуючої радіації у різних дозах на функціональну активність і морфологію гемопоетичних клітин-попередників мишей.

Предметом дослідження визначено зміни функціональної активності та морфології гемопоетичних клітин-попередників мишей за умов дії іонізуючої радіації у різних дозах.

Експериментальну частину роботи виконано на базі Центру молекулярних і клітинних досліджень в Національному університеті «Києво-Могилянська академія».

Опромінення експериментальних тварин проводилося в Інституті проблем безпеки атомних електростанцій НАН України згідно з Договором про наукову співпрацю з Центром молекулярних і клітинних досліджень НаУКМА.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальні відомості про гемопоетичну систему

Гемопоез ссавців є безперервним самовідновним процесом, що забезпечується гемопоетичними стовбуровими клітинами (HSC) і мезенхімальними стовбуровими клітинами (MSC) та проходить у кістковому мозку. Цей процес у людини і ссавців починається з поділу HSC на більш диференційовані підтипи.

HSC є мультипотентними клітинами із значною здатністю до самовідновлення. HSC дають початок лімфоїдним та міелоїдним лініям і відповідають за формування імунної системи. Характеризуються експресією CD34 і інших поверхневих маркерів, кількість та варіабельність яких залежить від стадії диференціювання. У результаті диференціювання з міелоїдної лінії утворюються нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, моноцити, макрофаги, еритроцити і тромбоцити, у свою чергу, з лімфоїдної лінії формуються Т- та В- лімфоцити [6, 7].

MSC є мультипотентними клітинами, що мають потенціал до диференціювання в численні лінії, включаючи адипоцити, остеобласти і хондроцити. MSC та HSC займають одну нішу в кістковому мозку, проте розподілені вони не рівномірно: HSC зазвичай оточують синусоїдні кровоносні судини, а от MSC оточують такі скупчення клітин. Відомо, що в кістковому мозку MSC поміж іншого забезпечують підтримуючу функцію і регулюють швидкість диференціювання HSC. Дослідження вказують на здатність через імуномодулюючі фактори MSC пригнічувати клітинні лінії HSC, що спричиняє зниження активності Т-ліфоцитів, природніх клітин-кілерів, активацію та проліферацію В-лімфоцитів [6, 7].

Дозрівання всіх гемопоетичних клітин, за винятком Т-лімфоцитів, проходить у кістковому мозку. Лімфоцити виходять із кісткового мозку і мігрують до тимуса, де дозрівають у різні типи Т-лімфоцитів.

Важливим фактором для забезпечення нормального функціонування гемопоетичної системи є певні обмеження метаболізму. Було показано, що HSC значною мірою залежать від метаболічних програм, що перешкоджають аеробному метаболізму, для підтримки їх здатності до самовідновлення [8].

1.2. Загальні відомості про вплив іонізуючого випромінювання на гемопоетичну систему

Іонізуюче випромінювання, призводячи до певних фізіологічних та морфологічних змін, вкрай негативно впливає на організм ссавців і інші живі організми. Ступінь прояву наслідків залежить від ряду факторів, про які вже згадувалось вище, а також від виду випромінювання, величини поглинутої дози, її розподілу в організмі, а також чутливості окремих тканин, органів та систем до опромінення [1, 2, 3, 9, 10].

До наслідків дії іонізуючого випромінювання належать порушення білково-азотного обміну, посилення активності протеаз клітин, зсув рівноваги у бік окисних процесів, пошкодження ДНК, аберації і хромосомні аномалії, зміна функцій та морфології клітин, інтерфазна і репродуктивна загибель клітин. Власне, сам організм зазнає імунологічних розладів, системного запалення та малігнізації клітин [1, 9].

Одним із найбільш значимих показників радіаційного ураження є тривалість життя опромінених тварин, а точніше, власне, їх смерть. Таким чином, у якості критерію оцінки радіаційного ураження застосовують поняття напівлетальної і летальної доз опромінення. Напівлетальна доза (ЛД₅₀₋₃₀) – це мінімальна доза іонізуючого випромінювання, що спричиняє загибель 50 % тварин упродовж перших 30 діб після опромінення. Летальна

доза (DD_{100-30}) – доза, що призводить до загибелі всіх тварин за ту саму кількість часу [1, 11].

За дії опромінення різні лінії клітин проявляють різну чутливість до іонізуючого випромінювання. Так, лімфоцити, стовбурові клітини та клітини-попередники проявляють найвищий ступінь радіочутливості, за ними йдуть еритробласти. Наступними за ступенем чутливості до опромінення є мієлоцити, щоправда, їх чутливість змінюється залежно від стадії диференціювання [6, 12].

Чутливість до високих доз іонізуючого випромінювання субпопуляцій HSC є достатньо вивченою як у мишей, так і у людини. Зазвичай дія високих доз опромінення має лінійний дозозалежний ефект, або пороговий ефект, що залежить головним чином від пошкодження ДНК [9, 14]. Вплив високих доз іонізуючого випромінювання призводить до руйнування кісткового мозку і, зрештою, до смерті.

Сублетальні дози опромінення спричиняють пригнічення кісткового мозку, що є менш важким випадком недостатності кісткового мозку, і призводять до пригнічення імунітету через аномальну кількість нефункціональних клітин крові [15, 16]. Проте таке опромінення є відносно рідкісним явищем, на відміну від опромінення низькими дозами іонізуючої радіації, що відбувається під час медичних оглядів, таких як комп'ютерна томографія та мамографія, під час контролю безпеки та в місцях з підвищеним радіоактивним фоном. При опроміненні низькими дозами вмикаються адаптивні механізми, розвивається запалення, активується імунна система [6, 7, 14, 16, 17].

В основі впливу іонізуючого випромінювання лежить іонізація та збудження атомів чи молекул опроміненої тканини. При зіткненні збудженої частинки з мішенню відбувається розрив молекулярних зв'язків, утворення високоактивних вільних радикалів, їх взаємодія з оточуючими молекулами, що призводить до непрямой дії іонізуючого випромінювання. Зміна у структурі молекул спричиняє порушення синтезу білків, тканинного дихання,

функції ферментативних систем. Окрім спричиненого окисненням порушення структури існуючих молекул, відбувається пошкодження генетичного апарату, що спричиняє пригнічення синтезу ДНК, порушення репарації ДНК, затримку клітинного поділу [6, 16, 18].

Відомо, що організм ссавців еволюційно виробив механізми відновлення за дії малих доз іонізуючого випромінювання, адже таке опромінення організму відбувається і за природніх умов. Окрім відновлення пошкоджень ДНК, усунення пошкоджених молекул, індукування апоптозу, існують механізми конкурентного усунення пошкоджених клітин. Таким чином, клітини обмежені не тільки власним проліферативним потенціалом, а й проліферативним потенціалом навколишніх клітин [6, 19, 20, 21, 22].

За системного пошкодження ДНК при дії іонізуючого випромінювання пошкоджуються практично всі HSC та клітини-попередники. Незважаючи на те, що конкуренція за вільний простір та ресурси призводить до елімінації більшості пошкоджених клітин, за умови сильного пошкодження можуть залишитись клітини, що матимуть пошкодження вище ендогенного рівня. Отже, це призведе до зниження придатності пулу клітин кісткового мозку. У такому разі клітини, що володіють адаптаційними мутаціями, які забезпечують їх перевагу над сусідніми клітинами, матимуть кращі умови, що може сприяти розвитку пухлин [6, 16, 19, 24].

Також за умов значного опромінення може відбуватись зменшення ступеня самовідновлення клітин кісткового мозку та диференціювання HSC. Цей процес ще відомий як «programmed mediocrity», тобто «запрограмованої посередності». Таким чином, пошкоджені клітини будуть конкурентно усуватись з пулу кісткового мозку, проте будуть виконувати необхідний мінімум функцій, що дозволить менш стресово для здорових HSC замінити ушкоджені клітини, ніж при їх масовому апоптозі [26].

Відновлення гемопоезу у певний період після припинення дії іонізуючої радіації може проявлятися у тому, що кількісні показники будуть доволі близькими до нормальних, проте дуже важливими є також

дослідження та оцінка стану популяції гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку. Ураження клітин-попередників може бути доволі суттєвим, проте не обов'язково відобразиться на кількісних показниках при дослідженні кісткового мозку, через збільшення кількості поділів та зміну швидкості диференціювання клітин. Суттєве ушкодження стовбурових клітин при хронічній дії низьких доз опромінення, за оцінками деяких дослідників, може виникати при накопиченні в організмі мишей дози більше 1,5 Гр [27]. Як відомо з літературних джерел, в основі радіаційного ураження при довготривалому опроміненні лежить виснаження самовідновного потенціалу колонієутворюючих одиниць (КУО) [28-30].

За дії іонізуючого випромінювання у клітинах кісткового мозку можуть спостерігатися морфологічні зміни, які свідчать про порушення фізіологічних процесів у самій клітині. При ушкодженні регуляції нормального функціонування клітини відбувається збільшення в ній кількості гранул. Порушення обміну води та зміна осмотичних процесів призводить до вакуолізації клітин. Через проблеми у репарації ДНК та регуляції клітинного поділу в клітинах можна спостерігати величезне нерозділене ядро та в результаті цього – великі клітини, що не розділились.

Низькі дози опромінення провокують дефекти самовідновлення HSC через збільшення кількості активних форм кисню. Їх підвищення, спричинене зниженням білків та АТМ, індукує вихід клітини із стану спокою та втрату здатності до самовідновлення [9].

1.2.1 Дія іонізуючого випромінювання на роботу генетичного апарату гемопоетичних клітин. Як відомо, накопичення геномних аберацій у HSC може серйозно порушити їхню функцію або сприяти їх трансформації в лейкемічні клітини. Нерепаровані або неправильно репаровані дволанцюгові розриви ДНК (DSB) є критично важливими подіями у формуванні різноманітних мутацій. Хромосомні аберації, що є результатом неправильно репарованих DSB, є ознаками дії іонізуючого опромінення та геномної нестабільності, що можуть призвести до гематологічних злоякісних

новоутворень або дисфункції кісткового мозку. Апоптоз і відновлення DSB є життєво важливими процесами, що стримують лейкемогенез. Загалом добре відомо, що високі дози іонізуючого випромінювання сприяють розвитку лейкемії, але значно менше відомо про лейкемогенний потенціал низьких доз радіації [6, 19, 26].

Як було вже зазначено, за дії іонізуючого випромінювання відбувається пошкодження генетичного апарату клітин. Проте цей процес не є еволюційно новим і організм ссавців має механізми для відновлення пошкодженої ДНК.

Для захисту стабільності та цілісності геному, багатоклітинні організми розробили дуже складні шляхи реакції на пошкодження ДНК (DDR), які опосередковують і контролюють відновлення ДНК, регулюють функціонування контрольних точок клітинного циклу та контролюють індукований пошкодженням ДНК апоптоз. Активація та координація різних шляхів DDR відбувається після утворення DSB шляхом стимуляції DDR-кіназ, включаючи ATM, DNA-PK і CHK2, а також їх ефektorів, таких як p53 і NF-κB [22, 27].

Ключові шляхи репарації ДНК, які, як відомо, функціонують у клітинах людини, включають репарацію шляхом вирізання основ (BER), репарацію ексцизією нуклеотидів (NER), репарацію невідповідності, негомологічне з'єднання кінців (NHEJ) та репарацію гомологічної рекомбінації (HRR) [13, 18, 28-31]. Відновлення DSB може відбуватися через шляхи негомологічного з'єднання кінців (NHEJ) або гомологічної рекомбінації (HR). Дані шляхи відрізняються своїми молекулярними механізмами, регуляцією та внутрішньою мутагенністю. Канонічний NHEJ може приєднуватися до DSB без необхідності гомології; він вважається частково безпомилковим і працює на всіх етапах клітинного циклу. Альтернативний шлях EJ (Alt-EJ) є генетично відмінним відгалуженням NHEJ та вимагає обробки DSB під час пошуку мікрогомологій, що призводить до делецій послідовностей між ділянками мікрогомології. HR, на відміну від NHEJ, обмежений S-фазою клітинного циклу і покладається на

непошкоджену гомологічну матрицю для відновлення DSB, тому вважається безпомилковим [21, 23, 24, 32-34].

1.2.2 Вплив мікрооточення на роботу гемопоетичної системи при дії іонізуючого випромінювання. Ніша кісткового мозку відіграє важливу регуляторну роль у підтримці HSC і може впливати на їх виживання. В організмі HSC знаходяться в особливому стромальному мікрооточенні, яке, як вважають, регулює їх диференціювання, самовідновлення, міграцію та виживання.

Пряма взаємодія між HSC і стромою кісткового мозку залучає сигнальні шляхи, які можуть протидіяти появі апоптозу, індукованого іонізуючим випромінюванням. Відомо, що ATM і DNA-ПК сприяють швидкому початку апоптозу опромінених HSC [22]. Крім того, контакт із клітинами строми кісткового мозку може протидіяти цьому процесу. Було виявлено ослаблення апоптозу, індукованого іонізуючим випромінюванням, шляхом спільного культивування гемопоетичних клітин на клітинах строми. Це доводить, що сигнали з мікрооточення, а не внутрішня схильність до апоптозу, можуть впливати на виживання HSC. Попередня інкубація HSC зі стромою не потрібна для отримання повного захисного ефекту. Це може свідчити на підтримку швидких посттрансляційних змін, що відбуваються всередині HSC, які блокують початок апоптозу [32].

Було доведено, що під час трансплантації кісткового мозку HSC показують вищу ефективність приживлення у разі трансплантації разом із MSC. Вважається, що MSC кісткового мозку мають регуляторні фактори для HSC, що здатні контролювати проліферативну здатність HSC. Дослідження *in vitro* та *in vivo* виявили значний вплив моноцитів і макрофагів у підтримку виживаності та активності остеобластів [8, 9, 24].

Відомо, що MSC можуть диференціюватися в остеобласти або адипоцити. Остеобласти мають здатність модулювати активність HSC. Зокрема, нещодавно було виявлено, що остеобласти модулюють функції

гемопоетичних клітин, включаючи проліферацію еритроцитів і диференціювання В-клітин [28].

Доведено, що за впливу сублетальних доз іонізуючого випромінювання структура кістки заміщується адипоцитами, надлишок яких буде пригнічувати ріст HSC, тож таким чином сповільниться гемопоетичне відновлення після опромінення.

Існують переконливі докази того, що ушкоджувальна дія іонізуючого опромінення на стромальні клітини, які складають мікрооточення кісткового мозку, відіграє роль у порушеннях гемопоезу. Зокрема, іонізуючий вплив сонячних енергетичних частинок і галактичних космічних променів може сприяти дефекту кровотворення та імунітету через так звані «ефекти свідка», таким чином змінюючи здатність строми підтримувати нормальне кровотворення [13].

Отже, HSC є мультипотентними клітинами із значною здатністю до самовідновлення, що дають початок лімфоїдним та мієлоїдним лініям клітин і відповідають за формування імунної системи. MSC являють собою мультипотентні клітини, що мають потенціал до диференціювання в численні лінії, включаючи адипоцити, остеобласти та хондроцити. MSC та HSC займають одну нішу в кістковому мозку. Радіорезистентність MSC пояснюється збільшенням стійкості до окислювального стресу в MSC порівняно з іншими фенотипами клітин, у яких окислювальний стрес після опромінення часто призводить до пошкодження ДНК і загибелі клітин [6]. За системного пошкодження ДНК за дії іонізуючого випромінювання пошкоджуються практично всі HSC та клітини-попередники.

Зазвичай дія високих доз опромінення має лінійний дозозалежний ефект, або пороговий ефект, що залежить головним чином від пошкодження ДНК. У той же час низькі дози опромінення провокують дефекти самовідновлення HSC через збільшення активних форм кисню, що індукує вихід клітини із стану спокою та втрату властивостей самовідновлення. Для захисту стабільності та цілісності геному при дії іонізуючої радіації

багатоклітинні організми розробили дуже складні шляхи реакції на пошкодження ДНК.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Об'єкт дослідження

При проведенні дослідження об'єктом було обрано вплив іонізуючої радіації у різних дозах на функціональну активність та морфологію гемопоетичних клітин-попередників мишей.

Для досягнення поставленої мети було розроблено та проведено дослідження на мишах лінії Balb/C, оскільки для них характерна вища чутливість до дії іонізуючої радіації ($LD_{50/30} < 5,85$ Гр) порівняно з більш радіорезистентними мишами, наприклад, лінії СВА, $LD_{50/30}$ якої становить 9,3 Гр.

Для першого етапу дослідження було відібрано статевозрілих мишей, віком від 4 до 6 місяців, проте при кінцевому дослідженні показників периферійної крові (ПК) та кісткового мозку (КМ) вік тварин був різним, основною причиною чого була тривалість процесу опромінення. Середня маса мишей становила 25 г (20-30 г). Достовірних даних щодо статевих відмінностей у досліджуваних показниках не виявлено.

Для утримання лабораторних тварин використовувався стандартний раціон віварію Інституту проблем безпеки атомних електростанцій НАН України, що розташовується у 30-кілометровій зоні відчуження ЧАЕС у вахтовому місті Чорнобиль. Опромінення проводилось на базі вказаного інституту. Дослідження проведено відповідно до вимог біоетики з урахуванням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986).

Було сформовано 5 груп тварин, кількість тварин в яких становила по 5 у кожній групі, для кожної особини було приготовано по 4 дифузійні камери із культуральною суспензією, а також досліджено щонайменше по 4 зразки ПК та КМ.

2.2. Опромінення експериментальних тварин

В залежності від дози та типу опромінення мишей лінії Balb/C було розподілено на такі групи: 1) опромінення гостре зовнішнє у дозі 5,9 Гр протягом 8,5 хвилин; 2) опромінення гостре зовнішнє у дозі 0,2 Гр протягом 4 годин; 3) опромінення хронічне зовнішнє у дозі 0,2 Гр протягом 6 місяців; 4) опромінення хронічне зовнішнє у дозі 1,5 Гр протягом 18 місяців; 5) контрольна група (інтактні тварини). Дані моделі опромінення було розроблено співробітниками Інституту проблем безпеки атомних електростанцій НАН України, з метою отримання умов, найбільш наближених до тих, у яких на сьогодні перебувають тварини Чорнобильської зони відчуження.

Експериментальну частину роботи виконано на базі Центру молекулярних і клітинних досліджень (ЦМКД) у Національному університеті «Києво-Могилянська академія». Опромінення експериментальних тварин проводилося в Інституті проблем безпеки атомних електростанцій НАН України згідно з Договором про наукову співпрацю з ЦМКД.

Опромінення тварин першої групи, що було зовнішнім гострим у дозі 5,9 Гр протягом 8,5 хв., було проведено наступним чином. γ -квантами в спеціальному каналі сховища відпрацьованого ядерного палива ядерного реактора ВВР-М Інституту ядерних досліджень НАН України було здійснено опромінення дослідних мишей. Джерелом опромінення слугували γ -кванти продуктів поділу ^{235}U із середньою енергією γ -квантів продуктів поділу 740 кеВ. Вимірювання поглинутої потужності дози γ -випромінювання проводили за допомогою дозиметра 2712 (Німеччина). Розрахунок дози

опромінення проводили з поглинутої потужності дози γ -випромінювання, що становило 0,7 Гр/хв., та із часу опромінення (8,5 хв.); таким чином дозу було оцінено на рівні 5,9 Гр.

Опромінення тварин другої групи, що було зовнішнім гострим у дозі 0,2 Гр протягом 4 год., було проведено наступним чином. Дослідних мишей було опромінено шляхом розміщення кліток із тваринами на атестованих джерелах на базі відділу матеріалознавства відділення радіотехнологій, матеріалознавства та екологічних досліджень Інституту проблем безпеки атомних електростанцій НАН України. У даному разі такими джерелами виступають зразки паливовмісних лавоподібних матеріалів, добутих із зруйнованої реакторної зони, що еманують жорсткі β - і γ - випромінювання, 99 % яких пов'язані з ^{137}Cs . Радіоактивні матеріали, що було використано у досліді, створювали потужність експозиційної дози (ПЕД) близько 0,047 Гр/год. При цьому загальна доза зовнішнього γ -опромінення експонованих мишей у результаті становила близько 0,2 Гр.

Для зовнішнього довготривалого опромінення тварин третьої групи у дозі 0,2 Гр близько 6 місяців було розроблено модель для дослідження хронічного впливу малих доз іонізуючого випромінювання. Задля досягнення поставленої мети було встановлено клітки з тваринами на спеціальні пласкі бетонні брикети, які виготовлялись із суміші цементу з водою, що максимально рівномірно розмішувались з попередньо відпаленим у муфельній печі ґрунтом з паливними «гарячими» частинками. Зразки такого ґрунту було зібрано на території «Рудого лісу», вони характеризувались питомою активністю на рівні 38 кБк і створювали ПЕД близько 55,0 мкГр/год., що зумовило накопичення дослідними мишами за весь час експозиції (півроку) загальної дози опромінення 0,2 Гр.

Четверта група тварин піддавалась зовнішній хронічній дії іонізуючої радіації до накопичення дози 1,5 Гр. Клітки з тваринами було встановлено на пласкі бетонні брикети, які було виготовлено із суміші цементу з водою, у якій був розподілений ґрунт з паливними «гарячими» частинками, зібраний

на території «Рудого лісу». Тварини знаходилися в цих умовах протягом 18 місяців.

2.3. Реактиви, матеріали та обладнання

Для проведення дослідження знадобляться наступні реактиви, матеріали та обладнання:

- Набір хірургічних інструментів;
- Центрифужні пробірки з гумовими корками;
- Стерилізатор;
- Піпетки;
- Гепарин;
- Капронові сіточки;
- Воронка;
- Бинти;
- Агар Difco (Sigma, США);
- Циклофосфан (ARTERIUM, Україна);
- Середовище для культивування RPMI-1640 (Invitrogen, США);
- Антибіотики пеніцилін та стрептоміцин (Київмедпрепарат, Україна);
- Фетальна теляча сироватка (Sigma, США);
- L-глутамін (Sigma, США);
- Лід;
- Етиловий спирт 70 %;
- Етиловий спирт 96 % (Сановет, Україна) як фіксатор;
- Вода дистильована;
- Імерсійна олія (Merck, США);
- Барвник Романовського-Гімза (Sigma, США);
- Барвник Май-Грюнвальда (Макрохім, Україна);
- Пластикові чашки Петрі (Delta, Данія);

- Скляні палички;
- Предметні скельця;
- Камера Горяєва (ПАО «Склоприлад», Україна) для підрахунку клітин крові (лейкоцитів, еритроцитів та тромбоцитів);
- Шприці з голками;
- Гелеві дифузійні камери;
- Витяжна шафа (Labcaire Systems, Великобританія), під якою проводили забарвлення отриманих препаратів;
- Стерильний фізіологічний розчин NaCl 0,09 % (Новофарм-біосинтез, Україна);
- Ламінарний бокс (Airflow, США);
- Світловий мікроскоп (Leica, Німеччина);
- Інвертований мікроскоп (Nikon, Японія);
- Цитоцентрифуга (Shandon, Німеччина);
- Фотокамера (Canon, Японія).

2.4. Вилучення клітин кісткового мозку

Для отримання достовірних результатів вкрай важливим є виконання основних вимог при вилученні матеріалу для культуральних робіт, що полягають у дотриманні правил асептики, антисептики, мінімальної травматизації клітин, уніфікації та стандартизації методів отримання та обробки тканин.

Джерелом клітин кісткового мозку в лабораторних тварин слугує стегнова, гомілкорова, плечорова кістки, рідше грудина та плоскі кістки тазу (собаки, кішки).

Мишей забивали шляхом цервікальної дислокації спинного мозку у шийному відділі. Обробляли поверхню стегна 70 % етанолом, розкривали шкіру за допомогою ножиць та вилучали стегно, очищали його від м'язових волокон. Кістку протирали змоченим у 70 % спирт бинтом. Розкривали

кістково-мозковий канал та за допомогою голки та шприца вимивали вміст кістки середовищем із гепарином 50 Од/мл (на стегнову кістку миші йде 0,5-1 мл середовища). Отриманий матеріал ресуспендували шляхом пропускання через голки з діаметром, що поступово зменшували (без утворення піни), фільтрували через 4-шаровий капроновий фільтр, додавали 6 мл середовища без гепарину, центрифугували 3 рази при 1500 об/хв. Замінювали надосадову рідину свіжою порцією середовища (без гепарину) по 5 мл на центрифужну пробірку. Після центрифугування надосадову рідину замінювали 2 мл середовища, матеріал ресуспендували і підраховували загальну клітинність мієлокаріоцитів. Всі маніпуляції проводили при 4-5 °C [35].

2.5. Культивування клітин у культурі дифузійних камер *in vivo*

За допомогою методу культивування клітин у дифузійних камерах *in vivo* можна вивчати як гемопоетичні клітини-попередники, так і кровотворення загалом. Для проведення дослідження важливою є оцінка функціональної активності гемопоетичних клітин-попередників, що виражається кількістю клітинних агрегатів, які були отримані при культивуванні в напіврідкому агарі з повним живильним середовищем. При культивуванні кровотворних клітин лабораторних тварин було використано оригінальну модель із використанням гелевої дифузійної камери, що являє собою порожнистий циліндр, виготовлений із прозорого полімеру, завдяки чому забезпечується вільна дифузія макромолекул всередину камери та з неї, проте не пропускає культивовані клітини назовні та не дає доступу всередину імунних клітинам миші-реципієнта [36].

Усі операції проводили в умовах ламінарного боксу з дотриманням стерильності. Камери стерилізували у 45 % етанолі з подальшим повторним промиванням у фізіологічному розчині хлориду натрію.

У якості тварин-реципієнтів камер використовували мишей ліній Balb/C. За добу до основного експерименту тваринам вводили розчин

циклофосфаміду з розрахунку 2 мг у 0,1 мл на 10 г маси тіла тварини, який є цитотоксичним агентом, що спричинювало цитопенію, а отже, стимулюватиме ріст культивованих клітин усередині дифузійних камер.

Середовище для культивування RPMI-1640 повинно містити 10 % фетальної телячої сировитки, L-глутамін, агаровий гель (3,3%-вий), а також антибіотики пеніцилін 100 Од та стрептоміцин 50 мкг/мл. Для отримання середовища у тридистильованій воді 2 хвилини кип'ятили наважку агару, а потім витримували при 40°C. Підрахунок клітин здійснювали із використанням гемоцитометра (камери Горяєва), після чого готували суспензію для подальшого культивування.

Для проведення дослідження суспензію клітин кісткового мозку у концентрації 1 млн клітин на 1 мл у повному живильному середовищі підігрівали до 37°C та змішували з агаром у кінцевій концентрації 0,33%.

Суспензію кровотворних клітин у зазначеному вище середовищі за допомогою шприца вводили у дифузійні камери, повністю заповнюючи камеру. Отвори камери закривали та розташовували горизонтально до застигання агару за кімнатної температури (в середньому для досягнення результату достатньо 5 хвилин).

Камери імплантували у черевну порожнину наркотизованих мишей, по дві камери на мишу. Через потрібний час камери вилучали та очищували від сполучної тканини.

2.6. Оцінка культивованих клітин

Після вилучення камери оцінювали під інвертованим мікроскопом, підраховуючи кількість кластерів (менше 40 клітин) та колоній (агрегатів, що складаються більш, ніж із 40 клітин). Зазвичай виділяють малі (3-20 клітин) та великі (21-40) кластери. Розрізнити гранулоцитарно-макрофагальні колонії та фібробластні досить легко завдяки притаманній останнім зіркоподібній формі. Еритроїдні колонії, які характеризуються наявністю забарвлення

завдяки гемоглобіну, можна виявити лише у разі попередньої обробки тварин, тобто ін'єкції їм еритропоетину, завдяки формуванню у камерах агрегатів з гемоглобінізованих клітин.

Для аналізу результатів культивування проводили розрахунок проліферативного потенціалу, що являє собою співвідношення колоній до кластерів. Для подальшого дослідження колонії вилучали за допомогою автоматичної піпетки та центрифугували на цитоцентрифузі Cytospin-3 («Shandon», Німеччина) при швидкості 250g, предметні скельця вилучали, забарвлювали за методом Паппенгейма та вивчали під світловим мікроскопом («Leica», Велика Британія) із імерсійним збільшенням у 1000 разів.

2.7. Приготування препаратів кровотворних клітин периферійної крові та кісткового мозку

Для визначення морфології та кількісного аналізу клітин периферійної крові тварин, що зазнавали дії зовнішнього іонізуючого випромінювання, виготовляли мазки. Для цього на край попередньо знежиреного предметного скельця наносили невелику краплю крові та під кутом 45° проводили склом із шліфованим краєм, для отримання рівномірного мазка у формі щіточки. Отриманий препарат залишали висувуватись на повітрі.

Препарати кісткового мозку готували із суспензії клітин шляхом центрифугування на цитоцентрифузі Cytospin-3 при швидкості 250g.

Забарвлення препаратів проводили за методом Паппенгейма барвником-фіксатором Май-Грюнвальда (Макрохім, Україна) та барвником Романовського-Гімза (Sigma, США). Барвник Романовського-Гімза складається з лужної (Азур II), що забарвлює у синій колір, та кислій (еозин), що забарвлює в рожево-червоний, частин [37].

Таким чином отримали таке забарвлення клітин периферійної крові: еритроцити – рожеві, рожеві з сірим або бежевим відтінком, бежево-

коричневі; тромбоцити – фіолетові або рожево-фіолетові; ядра лімфоцитів, нейтрофілів і моноцити – фіолетові; цитоплазма лімфоцитів – блакитна, синьо-блакитна або сіро-блакитна; цитоплазма моноцитів – сіро-блакитна; цитоплазма нейтрофілів – рожево-сіра або блідо-рожева; гранули нейтрофілів – фіолетова або червоно-фіолетова; гранули еозинофілів – рожево-червоні, рожево-фіолетові або оранжево-червоні; гранули базофілів – фіолетові.

Проводили підрахунок клітин периферійної крові та аналізували їх морфологію. При дослідженні клітин кісткового мозку аналізували мієлограму та морфологічну будову клітин.

2.8. Статистична обробка результатів

Отримані цифрові дані було проаналізовано з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel 2010. За допомогою t-критерію Стьюдента було визначено достовірність відмінностей середніх значень двох сукупностей. Дані представлено як середнє \pm стандартне відхилення.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Динаміка колонієутворення клітин-попередників кісткового мозку мишей Balb/C в культурі дифузійних камер *in vivo*

Для визначення оптимального терміну культивування клітин кісткового мозку, за який утвориться найбільша кількість клітинних агрегатів, кістковий мозок неопромінених мишей лінії Balb/C культивували у гелевих дифузійних камерах *in vivo*. Кожну добу методом цервікальної дислокації спинного мозку у шийному відділі тварин-реципієнтів забивали та вилучали камери, далі проводили за допомогою інвертованого мікроскопа підрахунок кількості утворених клітинних агрегатів – колоній та кластерів. Таким чином, дослідження тривало два тижні.

Результати дослідження динаміки колонієутворення у культурі протягом цього часу наведені у табл. 3.1

Отже, перші агрегати клітин – кластери, що складались із 2-4 клітин, виявляли на 3-тю добу культивування. Поява перших колоній спостерігалась на 6-ту добу. Надалі спостерігалось збільшення кількості колоній та кластерів. Найбільшу кількість колоній у культурі клітин кісткового мозку мишей виявляли на 11-й день культивування.

Кількість клітин у колоніях варіювалась від 40 до 100. Було виділено такі типи колоній за характером росту в культурі клітин *in vivo*: компактні (рис. 3.1), що утворені щільно прилеглими одна до одної клітинами у кількості від 40 до 80, компактні колонії з дифузним вінчиком, та дифузні колонії (рис. 3.2), що містять клітини, розташовані на відстані одна від одної. Тип колонії деякі дослідники пов'язують із її терміном існування. Так, найпершими з'являються компактні колонії. Компактною із дифузним вінчиком така колонія формується через деякий час, а для дифузних колоній характерним буде найтриваліший термін існування.

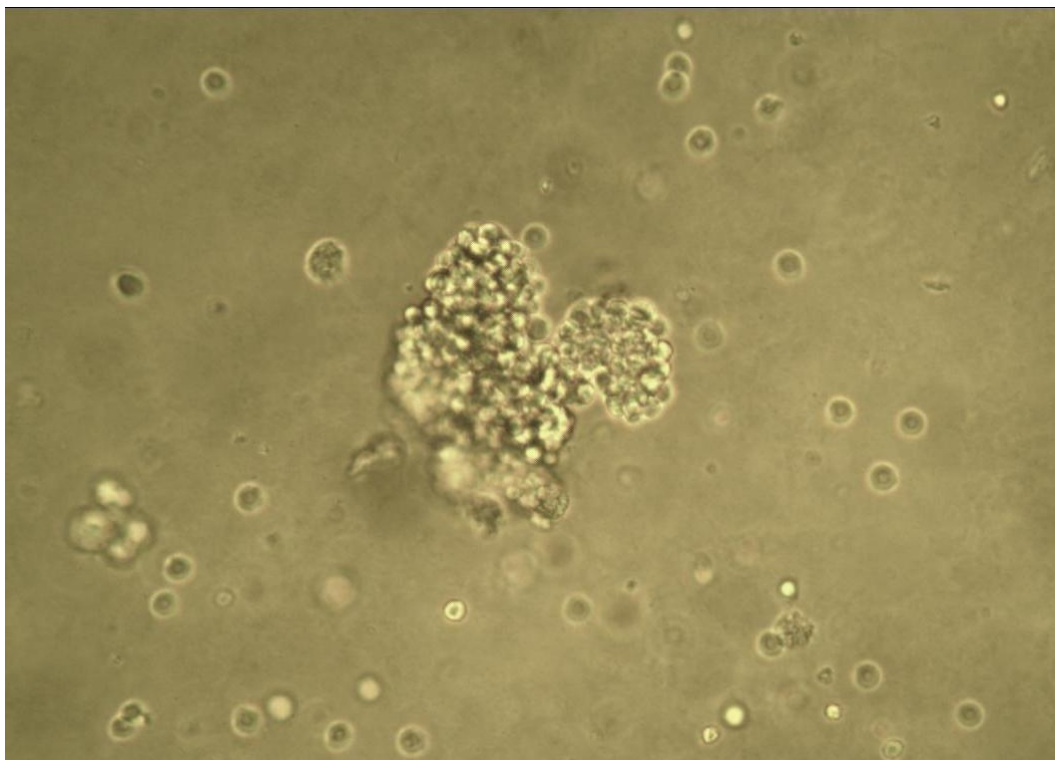


Рис. 3.1. Гранулоцитарно-макрофагальна колонія компактного типу під інвертованим мікроскопом. 11-та доба культивування *in vivo*. Збільшення $\times 200$.

За ефективність клонування взято кількість колоній, що утворюються до 11-ї доби, оскільки на цей час спостерігалась найвища кількість колоній та кластерів. Таким чином, у якості контролю було обрано показник ефективності колонієутворення (ЕКУ), що дорівнює $38,5 \pm 2,4$ на 1×10^5 експлантованих клітин.

3.2. Функціональна активність гемопоетичних клітин-попередників мишей Valb/C за умов гострого та довготривалого опромінення

Для дослідження функціональної активності гемопоетичних клітин було проаналізовано їх здатність до колонієутворення в культурі клітин, а також була проведена кількісна та якісна оцінка отриманих агрегатів. При визначенні ефективності колонієутворення використовували показники

кількості колоній у культурі дифузійних камер *in vivo*. Через відсутність достовірної різниці в кількості кластерів між дослідними групами, зазвичай кількість кластерів не береться до уваги.

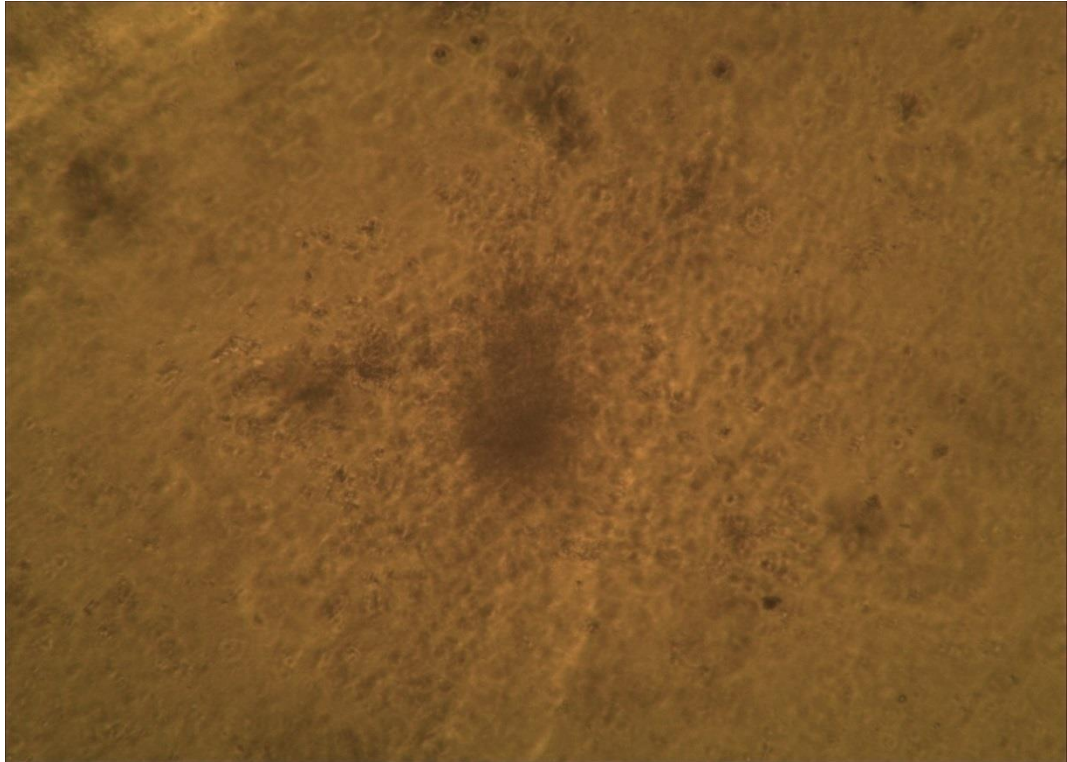


Рис. 3.2. Гранулоцитарно-макрофагальна колонія дифузного типу під інвертованим мікроскопом. 11-та доба культивування *in vivo*. Збільшення $\times 100$.

Результати дослідження ефективності колонієутворення клітин кісткового мозку опромінених мишей Balb/C при культивуванні у культурі клітин *in vivo* протягом 2 тижнів наведені у табл. 3.2.

При оцінці результатів культивування гемопоетичних клітин у культурі дифузійних камер *in vivo* було виявлено суттєві відмінності між групами досліджуваних тварин. Так, для групи 1, опромінення якої було гострим одноразовим у дозі 5,9 Гр, простежувався найнижчий рівень ефективності колонієутворення порівняно з контрольною групою. Показник становив $8,2 \pm 1,5$ колонієутворюючих одиниць на 100 тис. експлантованих клітин у

порівнянні із контрольним значенням $38,5 \pm 2,4$, тобто відбулося зниження більш, ніж у чотири рази.

Таблиця 3.1

Залежність кількості колоній, що утворились у культурі дифузійних камер *in vivo*, від терміну культивування клітин кісткового мозку мишей Valb/C

Доба культивування	Кількість клітинних агрегатів на 100 тис. експантованих клітин	
	Колонії	Кластери
1-а	0	0
2-а	0	0
3-я	0	$2,8 \pm 1,0$
4-а	0	$6,0 \pm 1,8$
5-а	0	$18,3 \pm 4,3$
6-а	$6,5 \pm 1,3$	$26,5 \pm 3,3$
7-а	$10,8 \pm 1,7$	$33,0 \pm 2,6$
8-а	$19,3 \pm 2,8$	$42,3 \pm 2,1$
9-а	$23,8 \pm 1,5$	$50,5 \pm 2,6$
10-а	$32,0 \pm 2,6$	$56,5 \pm 3,1$
11-а	$38,5 \pm 2,4$	$60,3 \pm 3,8$
12-а	$36,8 \pm 1,7$	$59,5 \pm 1,7$
13-а	$35,0 \pm 0,8$	$56,8 \pm 2,6$
14-а	$33,3 \pm 1,9$	$53,8 \pm 2,2$

Найменші зміни у порівнянні із контролем у показнику ефективності колонієутворення було виявлено у групі 2, тварин якої було опромінено одноразово у дозі 0,2 Гр. Так, було встановлено, що кількість

колонієутворюючих одиниць становила $30,1 \pm 3,2$ на 100 тис. експлантованих клітин.

У групі 3, опромінення якої було тривалим у дозі 0,2 Гр, спостерігали певне зниження ефективності колонієутворення порівняно з контролем. Цей показник складав $29,2 \pm 2,5$ колонієутворюючих одиниць на 100 тис. експлантованих клітин.

Таблиця 3.2

Ефективність колонієутворення клітин-попередників кісткового мозку мишей Valb/C, опроміненних у різних дозах

№ з/п	Група тварин	Колонії	Кластери
1.	Група 1, гостре одноразове опромінення у дозі 5,9 Гр	$8,2 \pm 1,5^*$	$18,0 \pm 3,2^*$
2.	Група 2, гостре одноразове опромінення у дозі 0,2 Гр	$30,1 \pm 3,2^*$	$48,2 \pm 3,7^*$
3.	Група 3, тривале опромінення у дозі 0,2 Гр	$29,2 \pm 2,5^*$	$54,3 \pm 4,9$
4.	Група 4, хронічне опромінення у дозі 1,5 Гр	$12,9 \pm 1,8^*$	$26,8 \pm 3,6^*$
5.	Група 5, контроль	$38,5 \pm 2,4$	$60,3 \pm 3,8$

Примітка. * – різниця у порівнянні із контролем статистично достовірна, $p < 0,05$.

Також досить сильне зниження ефективності колонієутворення спостерігалось у групі 4, тварини якої були хронічно (протягом 18 міс.) опромінені до накопичення дози 1,5 Гр. Показник ефективності колонієутворення складав $12,9 \pm 1,8$ колонієутворюючих одиниць на 100 тис. експлантованих клітин, що приблизно втричі менше за значення контрольної групи.

Таким чином, отримані результати культивування опромінених клітин вказують на значну уражувальну дію іонізуючого випромінювання на систему гемопоезу. Оскільки стовбурові клітини та клітини-попередники кісткового мозку володіють високим рівнем чутливості до іонізуючого випромінювання, за впливу сублетальної дози опромінення (група 1) проліферативний потенціал гемопоетичних клітин суттєво знижується, показники ефективності колонієутворення знижені більш, ніж у чотири рази.

За дії гострого одноразового опромінення у дозі 0,2 Гр, що є порівняно низькою дозою для даної лінії мишей (група 2), виявлено певне зниження функціональній активності гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку. Оскільки при культивуванні у дифузійних камерах *in vivo* опромінені клітини кісткового мозку переносяться у неопромінене середовище, вони мають змогу реалізувати свій проліферативний потенціал.

При тривалому опроміненні у дозі 0,2 Гр (група 3), було виявлено певне зниження кількості колонієутворюючих одиниць, у порів'язанні із контролем. Отримані дані щодо кількості колонієутворюючих одиниць подібні до значень групи 2, проте в даному випадку зниження головним чином було зумовлене виснаженням компенсаторних механізмів, що спричинило зниження здатності до поділу та самовідновлення стовбурових клітин та клітин-попередників.

При хронічному опроміненні у дозі 1,5 Гр (група 4), дія іонізуючого випромінювання спричинила як сильне пошкодження самих гемопоетичних клітин, так і їх мікрооточення, а тривалість опромінення привела до сильного виснаження компенсаторних механізмів та зниження проліферативного потенціалу клітин. Таким чином, відзначалось зниження кількості колонієутворюючих одиниць втричі порівняно з контрольною групою, що подібне до показників групи 1.

3.3. Морфологічна та кількісна характеристика клітин периферійної крові та кісткового мозку мишей Balb/C, опромінених у різних дозах

При дослідженні препаратів клітин периферійної крові та кісткового мозку визначали кількісні та якісні зміни клітин.

Для встановлення показників клітин крові у нормі було проведено тестування інтактних тварин. Таким чином, на підставі отриманих даних було встановлено контрольні показники для подальшого порівняння.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що іонізуюче випромінювання чинить суттєвий вплив на систему гемопоезу мишей, що спричинює значні зміни у показниках кількості клітин як у кістковому мозку, так і у периферійній крові.

Так, при аналізі впливу іонізуючого випромінювання на гемопоез при дослідженні препаратів периферійної крові було виявлено суттєві зміни у формених елементах крові. Виявлені зміни є дозозалежними, а також залежать від режиму опромінення. Результати аналізу показників периферійної крові наведені у табл. 3.3.

За дії гострого одноразового опромінення у дозі 5,9 Гр, тобто сублетальної дози для мишей, було виявлено найсуттєвіші зміни. Значне зниження кількості сегментоядерних нейтрофілів ($15,5 \pm 2,1$ порівняно до $19,5 \pm 1,9$) та лімфоцитів ($61,3 \pm 4,6$ до $72,3 \pm 1,5$), а також суттєве підвищення кількості паличкоядерних нейтрофілів ($6,0 \pm 2,2$ до $3,0 \pm 0,8$), еозинофілів ($8,0 \pm 1,4$ до $1,3 \pm 0,5$), моноцитів ($3,8 \pm 1,0$ до $3,3 \pm 0,5$), базофілів ($0,8 \pm 0,5$ до 0), мієлоцитів ($2,0 \pm 0,8$ до 0) та метамієлоцитів ($2,8 \pm 1,0$ до $0,8 \pm 0,5$). Такі дані свідчать про значне пригнічення роботи кісткового мозку і пошкодження процесів дозрівання і виходу клітин з нього.

Табл. 3.3

Показники периферійної крові мишей Balb/C, опромінених у різних дозах (гемограма)

№ з/п	Тип клітин	Група тварин				
		1, гостре одноразове опромінен- ня у дозі 5,9 Гр	2, гостре одноразове опромінен- ня у дозі 0,2 Гр	3, тривале опромінен- ня у дозі 0,2 Гр	4, хронічне опромінен- ня у дозі 1,5 Гр	5, контроль
1.	Сегментоядерні нейтрофіли	15,5±2,1	18,5±1,3	19,0±1,4	16,5±2,1	19,5±1,9
2.	Паличкаядерні нейтрофіли	6,0±2,2	4,8±1,0	4,8±1,0	5,0±0,8	3,0±0,8
3.	Еозинофіли	8,0±1,4*	3,3±0,5*	3,0±0,8*	6,3±1,0*	1,3±0,5
4.	Базофіли	0,8±0,5*	0,8±0,5*	0	0,8±0,5*	0
5.	Лімфоцити	61,3±4,6*	67,0±1,6*	68,0±0,8*	63,8±1,7*	72,3±1,5
6.	Моноцити	3,8±1,0	2,5±1,0	3,3±0,5	2,5±0,6	3,3±0,5
7.	Мієлоцити	2,0±0,8*	1,5±1,0*	1,3±0,5*	2,8±1,0*	0
8.	Метамієлоцити	2,8±1,0*	1,8±0,5	0,8±0,5	2,5±1,3	0,8±0,5

Примітка. * – різниця у порівнянні із контролем статистично достовірна, $p < 0,05$.

Серед морфологічних порушень було виявлено наявність у складі крові клітин ехіноцитів та велику кількість акантоцитів (рис. 3.3.). Останні є зірчастою формою еритроцитів і характерні для анемічних станів і станів дегідратації. Крім того, у периферійній крові спостерігалася суттєва еозинофілія (рис. 3.4).

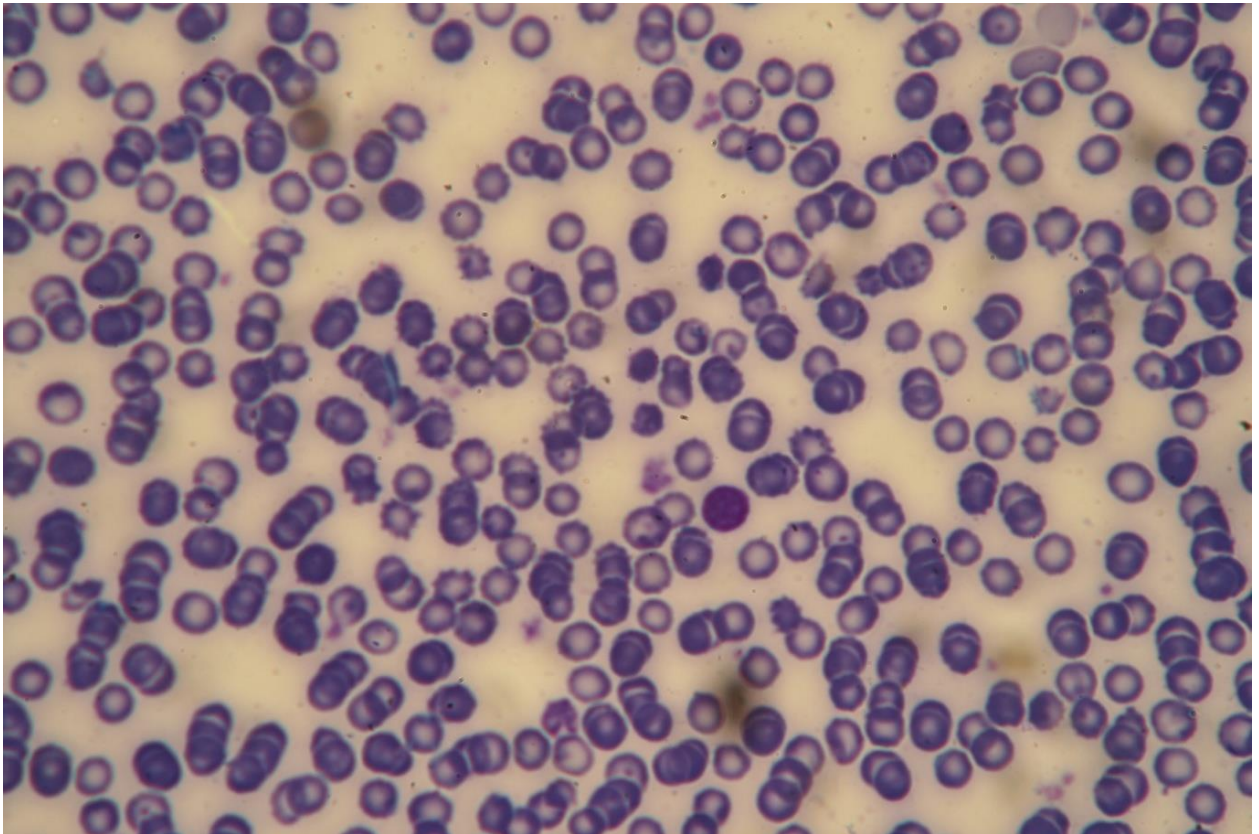


Рис. 3.3. Еритроцити у формі зірки (акантоцити) у периферійній крові опроміненої миші, забарвлення за Паппенгеймом, зб. $\times 630$.

Для групи 2, опромінення якої було гострим одноразовим у дозі 0,2 Гр, було виявлено зниження кількості сегментоядерних нейтрофілів ($18,5 \pm 1,3$ порівняно до $19,5 \pm 1,9$), лімфоцитів ($67,0 \pm 1,6$ до $72,3 \pm 1,5$) та моноцитів ($2,5 \pm 1,0$ до $3,3 \pm 0,5$), а також підвищення кількості паличкоядерних нейтрофілів ($4,8 \pm 1,0$ до $3,0 \pm 0,8$), еозинофілів ($3,3 \pm 0,5$ до $1,3 \pm 0,5$), базофілів ($0,8 \pm 0,5$ до 0), мієлоцитів ($1,5 \pm 1,0$ до 0) і метамієлоцитів ($1,8 \pm 0,5$ до $0,8 \pm 0,5$). Зміна показників порівняно з контролем була не сильно вираженою, що пояснюється тим, що тварини зазнали опромінення одноразово і в порівняно невисокій дозі.

Для групи 3, опромінення якої було тривалим у дозі 0,2 Гр, спостерігалась зміна показників в сторону збільшення кількості паличкоядерних нейтрофілів ($4,8 \pm 1,0$ до $3,0 \pm 0,8$), еозинофілів ($3,0 \pm 0,8$ до $1,3 \pm 0,5$) та мієлоцитів ($1,3 \pm 0,5$ до 0), а також зменшення кількості лімфоцитів ($68,0 \pm 0,8$ до $72,3 \pm 1,5$) порівняно з контролем. Кількість сегментоядерних

нейтрофілів, базофілів, моноцитів і метамієлоцитів практично не зазнали змін порівняно з показниками контрольної групи. Такі результати пояснюються тим, що за впливу тривалого опромінення до накопичення дози 0,2 Гр протягом шести місяців, у тварин все ще достатньо працювали механізми самовідновлення та компенсації.

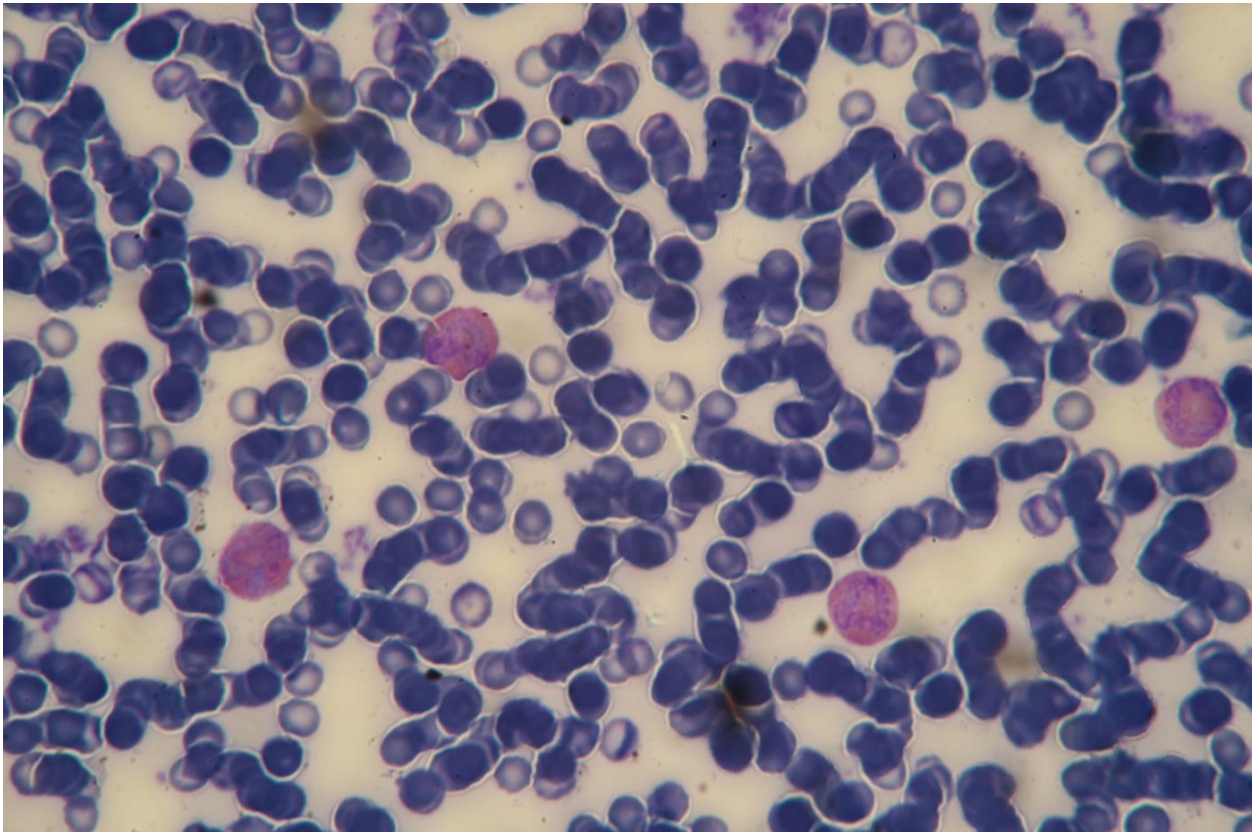


Рис. 3.4. Еозинофілія у периферичній крові опроміненої миші, забарвлення за Паппенгеймом, зб. $\times 630$.

За хронічного опромінення у дозі 1,5 Гр протягом 18 місяців (група 4), тварини зазнавали значного впливу іонізуючого випромінювання, що значно простежувався на показниках периферійної крові. Так було помічено суттєве зниження кількості сегментоядерних нейтрофілів ($16,5 \pm 2,1$ порівняно до $19,5 \pm 1,9$ контролю), лімфоцитів ($63,8 \pm 1,7$ до $72,3 \pm 1,5$) і моноцитів ($2,5 \pm 0,6$ до $3,3 \pm 0,5$), а показники кількості паличкоядерних нейтрофілів ($5,0 \pm 0,8$ до $3,0 \pm 0,8$), еозинофілів ($6,3 \pm 1,0$ до $1,3 \pm 0,5$), базофілів ($0,8 \pm 0,5$ до 0), мієлоцитів ($2,8 \pm 1,0$ до 0) та метамієлоцитів ($2,5 \pm 1,3$ до $0,8 \pm 0,5$) значно підвищені

відносно показників контрольної групи. Також була виявлена велика кількість ехіноцитів і акантоцитів. Такі показники співставні до значень групи 1, опромінення якої було гострим сублетальним у дозі 5,9 Гр. Отримані значення свідчать про значне виснаження компенсаторних механізмів, механізмів дозрівання та виходу клітин з кісткового мозку, пригнічення функції кісткового мозку.

За отриманими даними можна зробити висновок про зниження кількості сегментоядерних нейтрофілів і лімфоцитів, а також підвищення кількості паличкоядерних нейтрофілів, еозинофілів, базофілів та молодих форм, мієлоцитів і метамієлоцитів, як загальних змін, що виникають за дії іонізуючого випромінювання, ступінь вираженості яких залежить від дози та режиму опромінення. Зниження кількості лімфоцитів і сегментоядерних нейтрофілів пояснюється високою радіочутливістю даних клітин. Підвищення кількості паличкоядерних нейтрофілів, еозинофілів, базофілів та молодих форм, мієлоцитів і метамієлоцитів пояснюється компенсаторними механізмами, що намагаються забезпечити повноцінне функціонування організму за розвитку запальної реакції. Наявність великої кількості ехіноцитів та акантоцитів пояснюється неможливістю повністю забезпечити потреби у формуванні нових клітин еритроїдного ряду через ускладнення у роботі кісткового мозку.

За результатами проведених досліджень було проаналізовано вплив іонізуючого випромінювання на характеристики кісткового мозку мишей і встановлено наявність значних змін клітин.

Серед морфологічних змін клітин кісткового мозку, що стосуються їх структури, було виявлено такі: вакуолізація клітин, зміни структури ядра, зокрема, гіперсегментація ядер (рис. 3.5), поява двоядерних клітин (рис. 3.6), апоптотичні клітини, еритроцити зірчастої форми, велика кількість гранулоцитів, що зазнали дегрануляції. Рівень вираженості даних структурних пошкоджень залежав від дози та режиму опромінення.

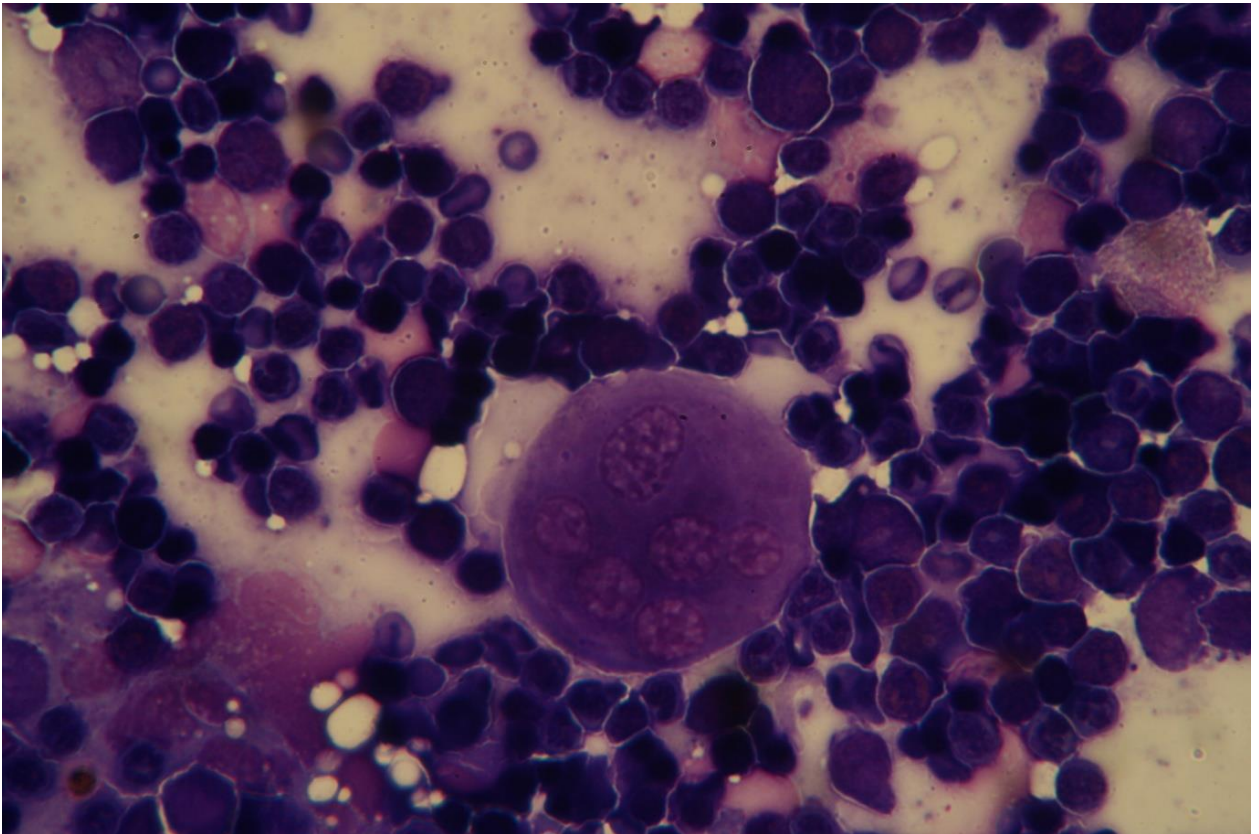


Рис. 3.5. Гіперсегментація ядра мегакаріоцита у кістковому мозку опроміненої миші, забарвлення за Паппенгеймом, зб. $\times 630$.

При дослідженні кількісних змін було виявлено наступні суттєві зміни, що виникли за дії іонізуючого випромінювання. Результати дослідження морфології кісткового мозку наведені у табл. 3.4.

Для групи 1, опромінення якої було гострим одноразовим у дозі 5,9 Гр, було визначено зниження кількості бластів ($4,8 \pm 0,5$ порівняно до $8,0 \pm 0,8$ у контролі), міелоцитів нейтрофільних ($4,0 \pm 0,8$ до $5,5 \pm 0,6$), лімфоцитів ($6,0 \pm 0,8$ до $14,5 \pm 1,3$), еритробластів ($5,8 \pm 0,5$ до $17,5 \pm 0,6$), промегакаріоцитів ($1,5 \pm 0,6$ до $4,5 \pm 0,6$), мегакаріоцитів ($2,0 \pm 0,8$ до $4,8 \pm 0,5$) і підвищення кількості міелоцитів еозинофільних ($7,3 \pm 1,0$ до $3,0 \pm 0,8$), нейтрофілів сегментоядерних ($17,3 \pm 1,7$ до $15,3 \pm 2,1$), нейтрофілів паличкоядерних ($24,5 \pm 2,1$ до $16,3 \pm 1,3$), еозинофілів паличкоядерних ($12,0 \pm 0,8$ до $3,3 \pm 1,0$), еозинофілів сегментоядерних ($6,5 \pm 1,0$ до $2,5 \pm 0,6$), базофілів сегментоядерних ($4,8 \pm 1,0$ до $1,8 \pm 1,0$), моноцитів ($3,8 \pm 1,0$ до $3,3 \pm 1,3$).

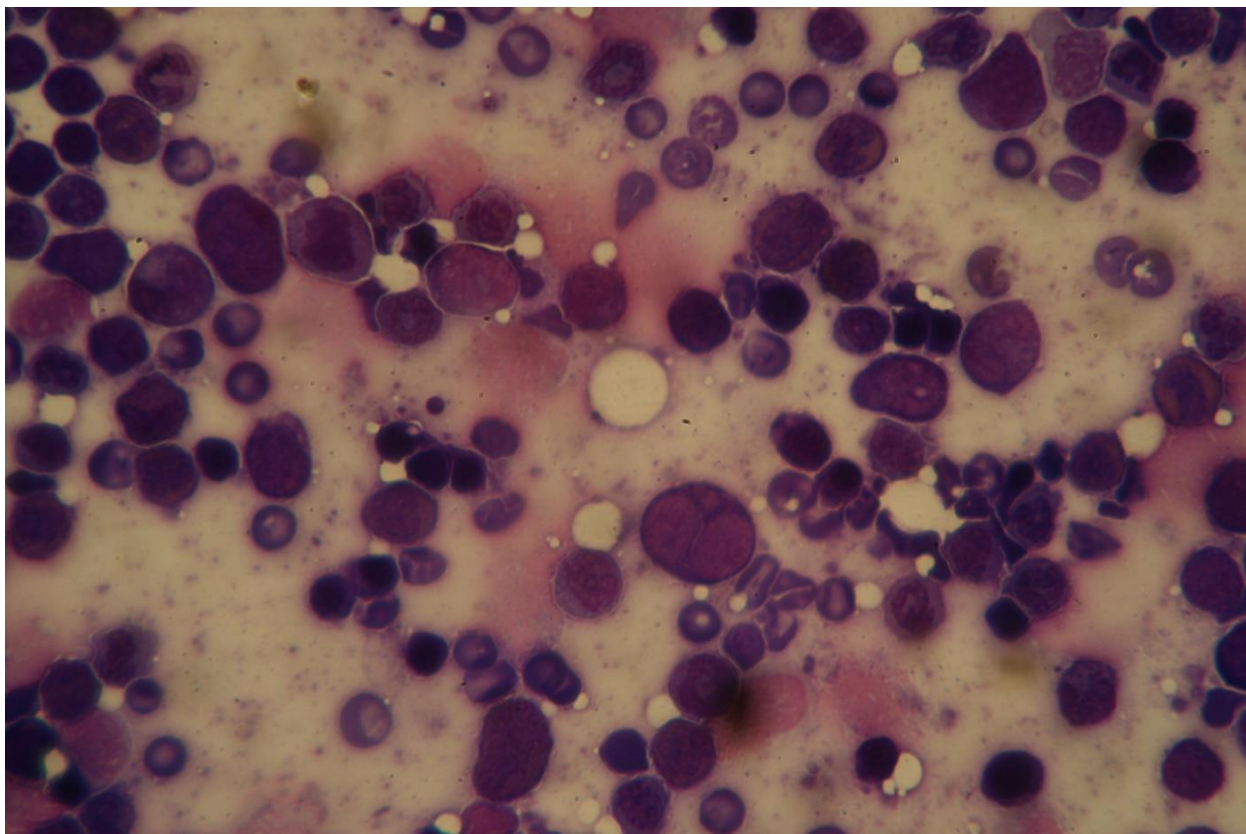


Рис. 3.6. Двоядерна клітина у кістковому мозку опроміненої миші, забарвлення за Паппенгеймом, зб. $\times 630$.

У групі 2, опромінення якої було гострим одноразовим у дозі 0,2 Гр, виявлено зниження кількості бластів ($7,3 \pm 1,0$ порівняно до $8,0 \pm 0,8$ контролю), мієлоцитів нейтрофільних ($4,3 \pm 0,5$ до $5,5 \pm 0,6$), лімфоцитів ($11,5 \pm 1,3$ до $14,5 \pm 1,3$), еритробластів ($8,8 \pm 1,0$ до $17,5 \pm 0,6$), мегакаріоцитів ($3,5 \pm 0,6$ до $4,8 \pm 0,5$) та збільшення кількості мієлоцитів еозинофільних ($6,5 \pm 0,6$ до $3,0 \pm 0,8$), нейтрофілів сегментоядерних ($16,0 \pm 0,8$ до $15,3 \pm 2,1$) і паличкоядерних ($19,5 \pm 1,3$ до $16,3 \pm 1,3$), еозинофілів сегментоядерних ($5,3 \pm 1,7$ до $2,5 \pm 0,6$) та паличкоядерних ($7,3 \pm 1,0$ до $3,3 \pm 1,0$), базофілів сегментоядерних ($2,8 \pm 0,5$ до $1,8 \pm 1,0$). Кількість промегакаріоцитів ($4,0 \pm 0,8$ до $4,5 \pm 0,6$) і моноцитів ($3,5 \pm 0,6$ до $3,3 \pm 1,3$) майже не змінилась.

Таблиця 3.4

Показники кісткового мозку мишей Balb/C, опромінених у різних дозах (мієлограма)

№ з/п	Тип клітин	Група тварин				
		1, гостре одноразове опромінен- ня у дозі 5,9 Гр	2, гостре одноразове опромінен- ня у дозі 0,2 Гр	3, тривале опромінен- ня у дозі 0,2 Гр	4, хронічне опромінен- ня у дозі 1,5 Гр	5, контроль
1.	Бласти	4,8±0,5*	7,3±1,0	7,0±0,8	6,3±1,0	8,0±0,8
2.	Мієлоцити нейтрофільні	4,0±0,8	4,3±0,5	4,3±1,0	4,8±1,5	5,5±0,6
3.	Мієлоцити еозинофільні	7,3±1,0*	6,5±0,6*	5,8±1,3*	6,8±1,0*	3,0±0,8
4.	Нейтрофіли сегментоядерні	17,3±1,7	16,0±0,8	16,3±1,7	16,5±1,3	15,3±2,1
5.	Нейтрофіли паличкоядерні	24,5±2,1*	19,5±1,3*	17,0±0,8	23,0±0,8*	16,3±1,3
6.	Лімфоцити	6,0±0,8*	11,5±1,3*	12,5±1,3	9,3±1,0*	14,5±1,3
7.	Еозинофіли паличкоядерні	12,0±0,8*	7,3±1,0*	7,0±0,8*	8,3±1,0*	3,3±1,0
8.	Еозинофіли сегментоядерні	6,5±1,0*	5,3±1,7*	5,5±1,3*	5,5±0,6*	2,5±0,6
9.	Еритробласти	5,8±0,5*	8,8±1,0*	11,5±1,7*	7,3±0,5*	17,5±0,6
10.	Базофіли сегментоядерні	4,8±1,0*	2,8±0,5	2,8±1,0	3,8±1,0	1,8±1,0
11.	Моноцити	3,8±1,0	3,5±0,6	2,8±1,3	2,5±0,6	3,3±1,3
12.	Промегакаріоцити	1,5±0,6*	4,0±0,8	4,3±1,0	3,0±0,8	4,5±0,6
13.	Мегакаріоцити	2,0±0,8*	3,5±0,6*	3,5±1,3	3,3±0,5*	4,8±0,5

Примітка. * – різниця у порівнянні із контролем статистично достовірна, $p < 0,05$.

При дослідженні групи 3, опромінення якої було тривалим у дозі 0,2 Гр, спостерігалися наступні зміни. Збільшення кількості мієлоцитів еозинофільних ($5,8 \pm 1,3$ відповідно до $3,0 \pm 0,8$ контролю), нейтрофілів сегментоядерних ($16,3 \pm 1,7$ до $15,3 \pm 2,1$) та паличкоядерних ($17,0 \pm 0,8$ до $16,3 \pm 1,3$), еозинофілів паличкоядерних ($7,0 \pm 0,8$ до $3,3 \pm 1,0$) і сегментоядерних ($5,5 \pm 1,3$ до $2,5 \pm 0,6$), базофілів сегментоядерних ($2,8 \pm 1,0$ до $1,8 \pm 1,0$) та зниження кількості бластів ($7,0 \pm 0,8$ до $8,0 \pm 0,8$), мієлоцитів нейтрофільних ($4,3 \pm 1,0$ до $5,5 \pm 0,6$), лімфоцитів ($12,5 \pm 1,3$ до $14,5 \pm 1,3$), еритробластів ($11,5 \pm 1,7$ до $17,5 \pm 0,6$), моноцитів ($2,8 \pm 1,3$ до $3,3 \pm 1,3$), мегакаріоцитів ($3,5 \pm 1,3$ до $4,8 \pm 0,5$). Кількість промегакіоцитів майже не змінилась ($4,3 \pm 1,0$ до $4,5 \pm 0,6$).

Аналіз групи 4, опромінення якої було хронічним до накопичення дози в 1,5 Гр протягом 18 місяців, показав зниження кількості бластів ($6,3 \pm 1,0$ до $8,0 \pm 0,8$), мієлоцитів нейтрофільних ($4,8 \pm 1,5$ до $5,5 \pm 0,6$), лімфоцитів ($9,3 \pm 1,0$ до $14,5 \pm 1,3$), еритробластів ($7,3 \pm 0,5$ до $17,5 \pm 0,6$), промегакаріоцитів ($3,0 \pm 0,8$ до $4,5 \pm 0,6$), мегакаріоцитів ($3,3 \pm 0,5$ до $4,8 \pm 0,5$), і збільшення кількості мієлоцитів еозинофільних ($6,8 \pm 1,0$ до $3,0 \pm 0,8$), нейтрофілів сегментоядерних ($16,5 \pm 1,3$ до $15,3 \pm 2,1$) та паличкоядерних ($23,0 \pm 0,8$ до $16,3 \pm 1,3$), еозинофілів паличкоядерних ($8,3 \pm 1,0$ до $3,3 \pm 1,0$) і сегментоядерних ($5,5 \pm 0,6$ до $2,5 \pm 0,6$), базофілів сегментоядерних ($3,8 \pm 1,0$ до $1,8 \pm 1,0$), моноцитів ($2,5 \pm 0,6$ до $3,3 \pm 1,3$).

Таким чином можна зробити висновок про значну уражувальну дію іонізуючого випромінювання на систему гемопоезу. Найбільш яскраво виражений вплив можна спостерігати на прикладі групи 1. Гостре сублетальне опромінення у дозі 5,9 Гр спричинило значне ушкодження регуляторних систем та різке падіння кількості бластів, мієлоцитів нейтрофільних, лімфоцитів, еритробластів, промегакаріоцитів і мегакаріоцитів, а також підвищення кількості сегментоядерних та паличкоядерних еозинофілів, моноцитів, базофілів сегментоядерних, нейтрофілів сегментоядерних і паличкоядерних, що можна пояснити

сильним пошкодженням генетичного апарату та, як наслідок, апоптозом молодих форм клітин (рис. 3.7) і клітин з підвищеною радіочутливістю, а також збільшенням кількості клітин, що є регуляторами запалення. Схожі показники спостерігались також і за гострого одноразового опромінення у дозі 0,2 Гр, проте ступінь їх вираженості був нижчим.

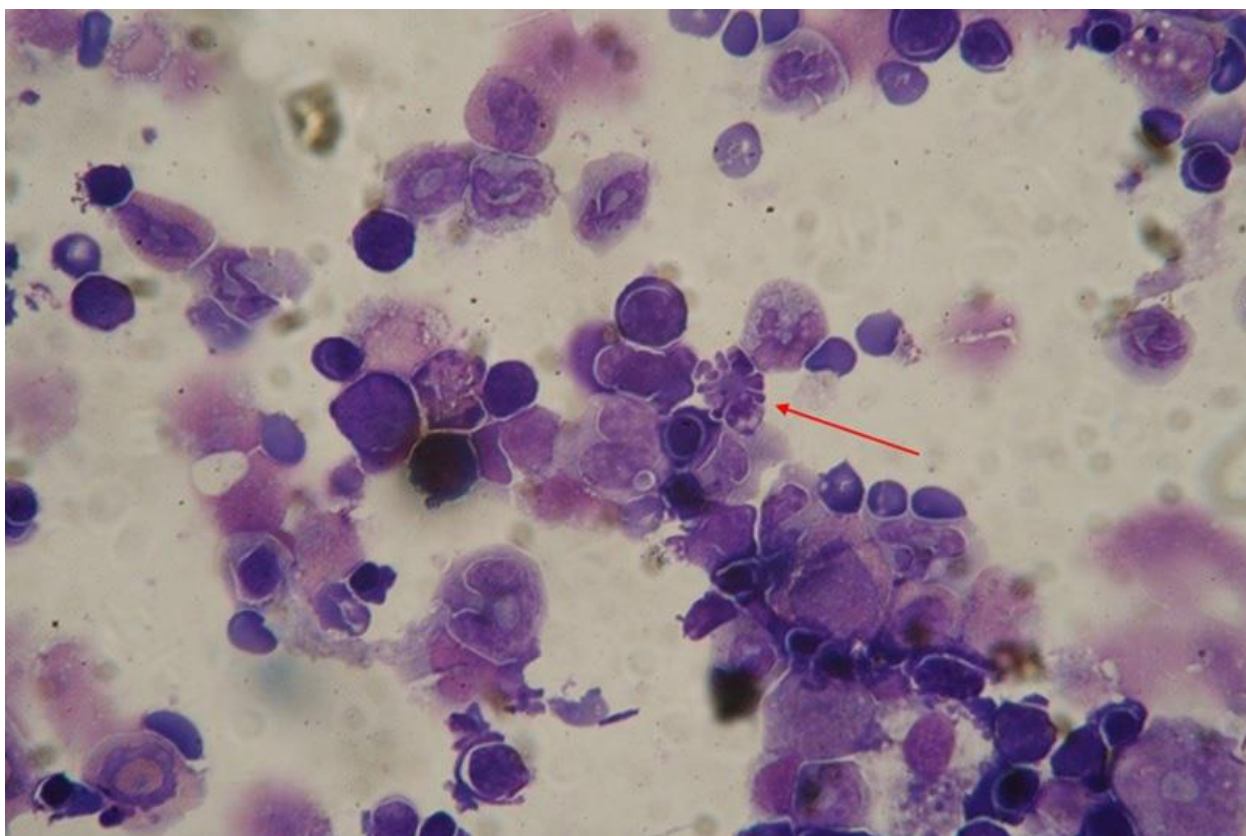


Рис. 3.7. Клітина у стадії апоптозу у кістковому мозку опроміненої миші, забарвлення за Паппенгеймом, зб. $\times 630$.

За дії хронічного опромінення (група 4), спостерігалось значне виснаження компенсаторних та регенераційних механізмів кісткового мозку. Найменш відмінними від значень контрольної групи були показники групи 3, що можна пояснити компенсацією, яку забезпечувало гемопоетичне мікрооточення.

Отже, у ході досліджень було встановлено, що при однократному опроміненні великими дозами іонізуючої радіації спостерігалось чотирикратне зниження кількості утворюваних колоній, що свідчить про

суттєве зниження проліферативного потенціалу клітин. При однократному опроміненні малими дозами радіації спостерігалось зниження кількості утворюваних колоній на 22 %, тоді як при хронічному опроміненні спостерігалось зниження кількості утворюваних колоній на 24 %, що свідчить про кумулятивний ефект опромінення і початок виснаження компенсаторних механізмів. Хронічне опромінення дозою 1,5 Гр призвело до трикратного зниження кількості утворюваних колоній внаслідок кумулятивного ефекту та значного виснаження проліферативного потенціалу клітин.

При вивченні гемограми опромінених тварин було встановлено значну уражувальну дію на клітинний склад периферійної крові тварин: дегрануляція клітин, поява багатоядерних і апоптотичних клітин, клітин із гіперсегментованим ядром та вакуоляризацією цитоплазми, еозинофілія і лімфоцитопенія. Показником змін системи гемопоезу також є поява у складі периферійної крові нехарактерних типів клітин, ехіноцитів і акантоцитів та мієлоцитів для всіх груп і метамієлоцитів для групи 1, 2 та 4. Також спостерігались зниження кількості сегментоядерних нейтрофілів і базофілів для опромінених груп 1, 2 та 4, підвищення кількості паличкоядерних нейтрофілів для всіх опромінених груп. Ступінь вираженості проявів є дозозалежним.

При дослідженні мієлограми було визначено наступні зміни: зниження кількості бластів, мієлоцитів нейтрофільних, лімфоцитів, еритробластів, мегакаріоцитів і збільшення мієлоцитів еозинофільних, нейтрофілів сегментоядерних та паличкоядерних, еозинофілів сегментоядерних і паличкоядерних, базофілів сегментоядерних, що свідчить виснаження пулу кісткового мозку та запальну реакцію. Підвищення кількості моноцитів та зниження промегакаріоцитів було дозозалежним. За однократного опромінення великими дозами іонізуючої радіації спостерігалось значне зниження кількості бластів, тоді як в інших групах спостерігалася пряма залежність зниження кількості бластів від дози і тривалості опромінення.

Найменших змін зазнала група 3 завдяки пристосувальній реакції і, як наслідок, можливості компенсувати зміни фізіологічними процесами самовідновлення гемопоетичних клітин.

Отримані результати свідчать про розвиток дозозалежних патологічних змін в кровотворних органах та процесах гемопоезу, які при опроміненнях малими дозами можуть бути знижені за рахунок компенсаторних реакцій і відновлення пролітеративного потенціалу клітин. При хронічних опроміненнях внаслідок кумулятивного ефекту відбувається зниження проліферативного потенціалу гемопоетичних стовбурових клітин внаслідок як ураження самих клітин внаслідок опромінення, так і компенсаторних реакцій організму.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Вивчення впливу іонізуючого випромінювання проводиться вже не одне десятиліття. На сьогоднішній день існує велика кількість джерел іонізуючого випромінювання – як природних, так і штучних.

Штучне опромінення іонізуючою радіацією відбувається за застосування обладнання медичного, технічного та наукового спрямування, у атомній промисловості, при радіоактивних аваріях, ядерних вибухах. До штучного впливу акумулюється природне – природні радіоактивні ізотопи, сонячне випромінювання [1, 2].

Іонізуюча радіація, призводячи до певних фізіологічних і морфологічних змін, вкрай негативно впливає на організм ссавців та інші живі організми. Відомо, що навіть незначний вплив низьких доз іонізуючого випромінювання чинить уражувальну дію на організм, ступінь вираженості якої залежить від статі, віку, виду, загального стану організму, виду опромінення, режиму і дози опромінення [3, 4].

Іонізуюче випромінювання спричиняє суттєві порушення у структурі і функціях як кісткового мозку та периферійної крові, так і на рівні організму в цілому. Наслідки дії іонізуючого випромінювання спостерігаються на всіх рівнях організації, починаючи від пошкодження мембран, органел і генетичного матеріалу до порушення роботи органів та систем.

За дії іонізуючого опромінення навіть у незначних дозах, виявляються порушення функції, структури та життєздатності гемопоетичних клітин. Таким чином, опромінення спричиняє швидкий розвиток значної кількості порушень гемопоезу та, зокрема, лейкемій [3, 4].

За режимом розрізняють гостре і хронічне опромінення. Розрізняють напівлетальну та летальну дозу опромінення. Ступінь диференціювання і проліферативна активність зумовлюють різну відповідь на опромінення від різних типів клітин та тканин. Відповідно, до радіочутливих тканин належать: гонади, кришталики ока, селезінка, тимус, кістковий мозок,

лімфатичні клітини, тож ураження цих тканин відбувається навіть за незначних доз опромінення.

Чутливість до високих доз іонізуючого випромінювання субпопуляцій HSC є достатньо вивченою як у мишей, так і у людини. Зазвичай дія високих доз опромінення має лінійний дозозалежний ефект, або пороговий ефект, що залежить головним чином від пошкодження ДНК [9, 14]. Вплив високих доз іонізуючого випромінювання призводить до руйнування кісткового мозку і, зрештою, до смерті.

Сублетальні дози опромінення спричиняють пригнічення кісткового мозку, що є менш важким випадком недостатності кісткового мозку, і призводять до пригнічення імунітету через аномальну кількість нефункціональних клітин крові [15, 16]. Проте таке опромінення є відносно рідкісним явищем, на відміну від опромінення низькими дозами іонізуючої радіації, що відбувається під час медичних оглядів, таких як комп'ютерна томографія та мамографія, під час контролю безпеки та в місцях з підвищеним радіоактивним фоном. При опроміненні низькими дозами вмикаються адаптивні механізми, розвивається запалення, активується імунна система [6, 7, 14, 16, 17].

У гемопоетичній системі найбільш чутливими до дії іонізуючого випромінювання є стовбурові клітини, клітини, що проходять мітоз і лімфоцити. Найменшою радіочутливістю володіють клітини мієлоїдного ряду, дозрілі клітини, моноцити та мегакаріоцити. Беручи до уваги високу чутливість гемопоетичної системи і зміни, яких вона зазнає за дії іонізуючого випромінювання, дослідження цих змін може сприяти поглибленню наявних знань, використання показників для діагностики та розробки нових методів.

Відповідно до цього **метою** роботи було дослідження впливу іонізуючої радіації у різних дозах на функціональну активність гемопоетичних клітин-попередників мишей, а також визначення морфологічних змін кісткового мозку і периферійної крові мишей, опромінених у різних дозах.

У роботі було досліджено вплив іонізуючого випромінювання у різних дозах на ефективність колонієутворення клітин кісткового мозку за умов культивування у дифузійних камерах *in vivo* та якісні і кількісні зміни у морфології клітин кісткового мозку та периферійної крові.

Опромінення проводили за наступних режимів: 1) зовнішнє гостре одноразове опромінення у дозі 5,9 Гр протягом 8,5 хвилин; 2) зовнішнє гостре одноразове опромінення у дозі 0,2 Гр протягом 4 годин; 3) зовнішнє хронічне опромінення у дозі 0,2 Гр близько 6 місяців; 4) зовнішнє хронічне опромінення у дозі 1,5 Гр протягом 18 місяців; порівняння проводили із групою інтактних тварин, що не піддавались опроміненню. Експериментальну частину роботи виконано на базі Центру молекулярних і клітинних досліджень у Національному університеті «Києво-Могилянська академія».

При дослідженні ефективності колонієутворення було встановлено, що за впливу гострого одноразового опромінення у сублетальній дозі 5,9 Гр відбулося зниження проліферативного потенціалу: кількість колонієутворюючих одиниць знизилась у більш, ніж 4 рази; при гострому одноразовому опроміненні у дозі 0,2 Гр – на 22 %; при тривалому опроміненні у дозі 0,2 Гр – на 24 %; при хронічному опроміненні у дозі 1,5 Гр – близько у 3 рази. Дані свідчать про дозозалежний ефект впливу опромінення на ефективність колонієутворення.

За умов опромінення у різних дозах клітинний склад периферійної крові тварин зазнав таких морфологічних змін: дегрануляція клітин, поява багатоядерних і апоптотичних клітин, клітин із гіперсегментованим ядром та вакуолізацією цитоплазми, еозинофілія і лімфоцитопенія. Показником змін системи гемопоезу також є поява у складі периферійної крові нехарактерних типів клітин, ехіноцитів і акантоцитів – патологічних форм еритроцитів, характерних для анемії, та мієлоцитів для всіх груп і метамієлоцитів для групи 1, 2 та 4 – юних форм мієлоцитарного ростка. Також спостерігались зниження кількості сегментоядерних нейтрофілів і базофілів для опромінених

груп 1, 2 та 4, підвищення кількості паличкоядерних нейтрофілів для всіх опромінених груп, що пояснюється підвищеною радіочутливістю дозрілих форм клітин і загальною запальною реакцією. Ступінь вираженості проявів є дозозалежним.

Найсильніше ураження спостерігалось у групі 1 за одноразового сублетального опромінення у дозі 5,9 Гр, що свідчить про значну уражувальну дію, розлади гемопоезу та неможливість компенсувати зміни наявними фізіологічними механізмами. Також подібна картина спостерігалась у групі 4, опромінення якої було хронічним у дозі 1,5 Гр протягом 18 місяців, що зумовлювало значне виснаження компенсаторних механізмів і кумулятивний ефект. У групі 2 показники змінені подібно до групи 1 та 4, проте не настільки виражено, що свідчить про спроможність компенсаторних механізмів відповідати на вплив іонізуючого випромінювання. Найменших змін зазнала гемограма групи 3, опромінення якої було тривалим у дозі 0,2 Гр – окрім типової реакції на опромінення, збільшення паличкоядерних нейтрофілів, еозинофілів і мієлоцитів і зниження кількості лімфоцитів, інші показники практично не зазнали змін, що свідчить про спроможність фізіологічно компенсувати зміни, що виникли за дії опромінення.

При дослідженні мієлограми було визначено наступні зміни: зниження кількості бластів, мієлоцитів нейтрофільних, лімфоцитів, еритробластів, мегакаріоцитів та збільшення мієлоцитів еозинофільних, нейтрофілів сегментоядерних і паличкоядерних, еозинофілів сегментоядерних та паличкоядерних, базофілів сегментоядерних, що свідчить виснаження пулу кісткового мозку і запальну реакцію. Підвищення кількості моноцитів та зниження промегакаріоцитів було дозозалежним. Найбільшого ураження зазнала група 1, зниження кількості бластів відбулось приблизно удвічі, що свідчить про сильне ураження кісткового мозку і виснаження пулу клітин кісткового мозку. Найменших змін зазнала група 3, що свідчить про можливість компенсувати зміни завдяки фізіологічним процесам

самовідновлення гемопоетичних клітин. Для групи 2 показники мієлограми були подібні до групи 1, проте з меншою вираженістю через дозозалежний ефект. Для групи 4 спостерігались подібні до групи 2 показники, проте зниження кількості бластів було сильнішим, у близько 1,5 разу, що свідчить про кумулятивний ефект та зниження компенсаторних механізмів, виснаження пулу гемопоетичних клітин. За умов опромінення у різних дозах клітинний склад кісткового мозку тварин зазнав таких морфологічних змін: дегрануляція клітин, поява багатоядерних і апоптотичних клітин, клітин із гіперсегментованим ядром та вакуоляризацією цитоплазми.

Таким чином, за результатами дослідження встановлено, що іонізуюче випромінювання спричинює значний уражувальний вплив на систему гемопоезу. Найбільших змін зазнали тварини опромінені гостро сублетальною дозою і хронічно протягом 18 місяців.

Дані, отримані у результаті роботи, можуть бути використаними для поглиблення вже відомих знань, для визначення міри уражень опромінених осіб та розробки подальших досліджень у даній галузі.

ВИСНОВКИ

1. В ході досліджень було встановлено, що при гострому одноразовому опроміненні іонізуючою радіацією у великих дозах спостерігалось зниження у 4 рази кількості колоній клітин кісткового мозку, що свідчить про суттєве пригнічення функціональної активності клітин; у той же час при опроміненні малими дозами радіації спостерігалось зниження кількості утворених колоній приблизно на 20 %, як при одноразовому гострому, так і при тривалому опроміненні. Хронічне опромінення дозою 1,5 Гр призвело до триразового зниження кількості утворених колоній внаслідок кумулятивного ефекту та значного виснаження проліферативного потенціалу клітин.

2. При вивченні гемограми опромінених тварин було встановлено значну уражувальну дію іонізуючої радіації на клітинний склад периферійної крові тварин: спостерігалась дегрануляція клітин, поява багатоядерних і апоптотичних клітин, клітин із гіперсегментованим ядром та вакуоляризацією цитоплазми, еозинофілія і лімфоцитопенія, а також поява у складі периферійної крові нехарактерних типів клітин, ехіноцитів і акантоцитів та мієлоцитів. Крім того, спостерігались зростання кількості еозинофілів для усіх опромінених груп тварин.

3. При дослідженні мієлограми було визначено наступні зміни у групах опромінених тварин у порівнянні із контролем: зниження кількості бластів, мієлоцитів нейтрофільних, лімфоцитів, еритробластів, мегакаріоцитів і збільшення мієлоцитів еозинофільних, нейтрофілів сегментоядерних та паличкоядерних, еозинофілів сегментоядерних і паличкоядерних, базофілів сегментоядерних, що свідчить виснаження пулу кісткового мозку та запальну реакцію. Підвищення кількості моноцитів та зниження промегакаріоцитів було дозозалежним.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Давиденко В. М. Радіобіологія / В. М. Давиденко. – Миколаїв: МДАУ, 2011. – 265 с.
2. 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.
3. Вплив радіаційного фактора чорнобильської зони відчуження на організм тварин / За ред. Я. І. Серкіза, М. Ю. Алесіної. - К.: Атіка, 2006. – 320 с.
4. Desouky O. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation / O. Desouky, N. Ding, G. Zhou. // Journal of Radiation Research and Applied Sciences. – 2015. – №8. – P. 247–254.
5. Dainiak N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Exp Hematol.* 2002 Jun;30(6):513-28. doi: 10.1016/s0301-472x(02)00802-0. PMID: 12063018.
6. Durdik, Matus et al. “Hematopoietic stem/progenitor cells are less prone to undergo apoptosis than lymphocytes despite similar DNA damage response.” *Oncotarget* vol. 8,30 (2017): 48846-48853. doi:10.18632/oncotarget.16455
7. Henry, Elia et al. “Human hematopoietic stem/progenitor cells display reactive oxygen species-dependent long-term hematopoietic defects after exposure to low doses of ionizing radiations.” *Haematologica* vol. 105,8 (2020): 2044-2055. doi:10.3324/haematol.2019.226936
8. Karabulutoglu, Melis et al. “Influence of diet and metabolism on hematopoietic stem cells and leukemia development following ionizing radiation exposure.” *International journal of radiation biology* vol. 95,4 (2019): 452-479. doi:10.1080/09553002.2018.1490042
9. Henry, Elia, and Marie-Laure Arcangeli. “How Hematopoietic Stem Cells Respond to Irradiation: Similarities and Differences between Low and

- High Doses of Ionizing Radiations.” *Experimental hematology* vol. 94 (2021): 11-19. doi:10.1016/j.exphem.2020.12.001
10. Martin, Lynn M et al. “Exposure to low dose ionising radiation: Molecular and clinical consequences.” *Cancer letters* vol. 349,1 (2014): 98-106. doi:10.1016/j.canlet.2013.12.015
 11. Hernández-Godoy J, Silvestre DP, Hernández BB. Immediate and short-, mid- and long-term effects of *in vivo* ionizing radiation exposure in BALB/c mice: I. Activation of lymphocytes and subpopulations. *In vivo*. 2010. 24(5). P.719-726.
 12. Chang, Jianhui et al. “Whole-body proton irradiation causes long-term damage to hematopoietic stem cells in mice.” *Radiation research* vol. 183,2 (2015): 240-8. doi:10.1667/RR13887.1
 13. Almeida-Porada, Graça et al. “Exposure of the Bone Marrow Microenvironment to Simulated Solar and Galactic Cosmic Radiation Induces Biological Bystander Effects on Human Hematopoiesis.” *Stem cells and development* vol. 27,18 (2018): 1237-1256. doi:10.1089/scd.2018.0005
 14. Corces-Zimmerman, M Ryan et al. “Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 111,7 (2014): 2548-53. doi:10.1073/pnas.1324297111
 15. Hekim N., Zafer C., Nikitaki Z. Radiation triggering immune response and inflammation. *Cancer Lett*. 2015. 368(2). P.156-163.
 16. Green, Danielle E, and Clinton T Rubin. “Consequences of irradiation on bone and marrow phenotypes, and its relation to disruption of hematopoietic precursors.” *Bone* vol. 63 (2014): 87-94. doi:10.1016/j.bone.2014.02.018
 17. Azzam, Edouard I et al. “Is Ionizing Radiation Harmful at any Exposure? An Echo That Continues to Vibrate.” *Health physics* vol. 110,3 (2016): 249-51. doi:10.1097/HP.0000000000000450

18. Vavrova J., Petyrek P. "Late effects of single and repeated sublethal gamma radiations on haemopoietic stem cells in mice". *Folia Biol (Praha)*. 1986. 32 (6). P. 399-405.
19. Martin, Lynn M et al. "Exposure to low dose ionising radiation: Molecular and clinical consequences." *Cancer letters* vol. 349,1 (2014): 98-106. doi:10.1016/j.canlet.2013.12.015
20. Muralidharan, Sujatha et al. "Ionizing Particle Radiation as a Modulator of Endogenous Bone Marrow Cell Reprogramming: Implications for Hematological Cancers." *Frontiers in oncology* vol. 5 231. 14 Oct. 2015, doi:10.3389/fonc.2015.00231
21. Biechonski, Shahar et al. "Attenuated DNA damage responses and increased apoptosis characterize human hematopoietic stem cells exposed to irradiation." *Scientific reports* vol. 8,1 6071. 17 Apr. 2018, doi:10.1038/s41598-018-24440-w
22. Ariyoshi, Kentaro et al. "Age Dependence of Radiation-Induced Genomic Instability in Mouse Hematopoietic Stem Cells." *Radiation research*, 10.1667/RR15113.1. 12 Oct. 2018, doi:10.1667/RR15113.1
23. Martin, Lynn M et al. "Exposure to low dose ionising radiation: molecular and clinical consequences." *Cancer letters* vol. 338,2 (2013): 209-18. doi:10.1016/j.canlet.2013.05.021
24. Shao, Lijian et al. "Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation." *Antioxidants & redox signaling* vol. 20,9 (2014): 1447-62. doi:10.1089/ars.2013.5635
25. Doll, R, and R Wakeford. "Risk of childhood cancer from fetal irradiation." *The British journal of radiology* vol. 70 (1997): 130-9. doi:10.1259/bjr.70.830.9135438
26. Fleenor, Courtney J et al. "Evolved Cellular Mechanisms to Respond to Genotoxic Insults: Implications for Radiation-Induced Hematologic Malignancies." *Radiation research* vol. 184,4 (2015): 341-51. doi:10.1667/RR14147.1

27. Milyavsky, Michael et al. "A distinctive DNA damage response in human hematopoietic stem cells reveals an apoptosis-independent role for p53 in self-renewal." *Cell stem cell* vol. 7,2 (2010): 186-97.
doi:10.1016/j.stem.2010.05.016
28. Wu Z. Z., Jiang X. Y., Shen S. R., Tan S. Z. "The nature of radiation damage of haemopoietic stem cells under continuous irradiation at low dose rate". *Sci Sin.* 1981. 24(12). P. 1143-1152.
29. Chang, Jianhui et al. "²⁸Si total body irradiation injures bone marrow hematopoietic stem cells via induction of cellular apoptosis." *Life sciences in space research* vol. 13 (2017): 39-44. doi:10.1016/j.lssr.2017.03.003
30. Wang, Changshan et al. "Compromised hematopoiesis and increased DNA damage following non-lethal ionizing radiation of a human hematopoietic system reconstituted in immunodeficient mice." *International journal of radiation biology* vol. 89,2 (2013): 132-7.
doi:10.3109/09553002.2013.734947
31. Rogakou, E P et al. "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*." *The Journal of cell biology* vol. 146,5 (1999): 905-16. doi:10.1083/jcb.146.5.905
32. Miousse, Isabelle R et al. "Inter-Strain Differences in LINE-1 DNA Methylation in the Mouse Hematopoietic System in Response to Exposure to Ionizing Radiation." *International journal of molecular sciences* vol. 18,7 1430. 4 Jul. 2017, doi:10.3390/ijms18071430
33. Squillaro, Tiziana et al. "Concise Review: The Effect of Low-Dose Ionizing Radiation on Stem Cell Biology: A Contribution to Radiation Risk." *Stem cells (Dayton, Ohio)* vol. 36,8 (2018): 1146-1153.
doi:10.1002/stem.2836
34. Liu, Liren et al. "Navigating the nucleotide excision repair threshold." *Journal of cellular physiology* vol. 224,3 (2010): 585-9.
doi:10.1002/jcp.22205

35. Білько Д. І. Методи культури клітин і тканин у біології, біотехнології та медицини Київ – 2017, ст.. 82
36. Білько Н. М. Методи експериментальної гематології – К.: Видавничий дім «Києво-Могилянська академія», 2006. Ст..66
37. Цитологічна і лабораторна техніка та діагностика / А. В. Воробель, Б. В. Грицуляк, О. Я. Глодан, О. Є. Халло. – Івано-Франківськ: "Плай", 2013. – 151 с.