

УДК: 612.014.482+612.119+576.535

І. З. Руссу¹✉, Н. К. Родіонова², Д. І. Білько¹, Н. М. Білько¹¹Національний університет “Кієво-Могилянська академія”, вул. Г. Сковороди, 2, Київ, 04655²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022

ЗАКОНОМІРНОСТІ ЗМІН КІЛЬКІСНИХ І ЯКІСНИХ ПОКАЗНИКІВ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У КУЛЬТУРІ КЛІТИН В УМОВАХ ДІЇ РАДІОНУКЛІДУ СТРОНЦІЮ-90

Метою роботи було вивчити функціонування кровотворної системи щурів при внутрішньому опроміненні ⁹⁰Sr за умов його тривалого та одноразового надходження.

Матеріали і методи. Для вивчення функціонального стану стовбурових клітин кісткового мозку та їх найближчих нащадків – кровотворних клітин-попередників проводили культивування гемопоетичних клітин щурів у системі дифузійних камер *in vivo*, а також оцінювали кількісний та якісний склад отриманих у культурі клітинних агрегатів.

Результати. На основі проведених експериментів було з'ясовано, що тривала дія інкорпорованого радіонукліду ⁹⁰Sr призводить до суттєвих порушень у кровотворній системі, зокрема, було виявлено зміни у гематологічних показниках опромінених тварин, появу циркулюючих клітин-попередників у периферичній крові, зниження ефективності колонієутворення клітин-попередників кісткового мозку, а також кількісні та якісні зміни у клонах.

Висновки. Визначені показники підтверджують зв'язок виявлених раніше вказаних порушень у опромінених осіб із дією іонізуючої радіації і можуть слугувати підґрунтям для розробки критеріїв ураження кровотворної системи людини та формування груп ризику серед осіб, які зазнали впливу ⁹⁰Sr.

Ключові слова: гемопоез, клітини-попередники, культура клітин у дифузійних камерах *in vivo*, внутрішнє опромінення, ⁹⁰Sr.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2015. Вип. 20. С. 533–542.

✉ Руссу Ірина Зіновіївна, e-mail: borbulyak@yahoo.com

I. Z. Russu¹✉, N. K. Rodionova², D. I. Bilko¹, N. M. Bilko¹

¹National University "Kyiv-Mohyla Academy", G. Skovorody Str., 2, Kyiv 04655

²R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the National academy of sciences of Ukraine, Vasylykivska Str., 45, Kyiv 03022

Pattern changes in quantitative and qualitative markers of hematopoietic stem cells during acute and chronic exposure to ⁹⁰Sr isotope in cell culture

The **aim** of our research was investigation of the hematopoietic system of laboratory rats under the influence of acute and chronic internal exposure to ⁹⁰Sr isotope.

Materials and methods. To study the condition of stem cells and their immediate progenitors we implemented cell culture methodology in vivo in gel diffusion capsules with subsequent analysis of the colonies and clusters.

Results. On the basis of experiments it was established that long-term effects of incorporated ⁹⁰Sr isotope leads to significant disturbances in the hematopoietic system and in particular, revealing changes in hematological parameters of irradiated animals such as the appearance of circulating progenitor cells in peripheral blood, reducing the colony-forming efficiency of the bone marrow derived progenitor cells, as well as quantitative and qualitative changes in the clones.

Conclusions. Indices confirm the connection of the detected effects in individuals exposed to ionizing radiation described in the earlier publications and can serve as basis for developing criteria for the formation of risk groups among people exposed to ⁹⁰Sr.

Key words: hematopoiesis, progenitors, cell culture in diffusion chambers in vivo, internal irradiation, ⁹⁰Sr.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2015;20:533-542.

ВСТУП

Гемопоетичні стовбурові клітини характеризуються високою радіочутливістю у порівнянні з іншими системами клітинного самооновлення. Цей висновок було отримано вченими на основі проведених робіт, що показали наявність ушкодження кровотворних клітин-попередників при дії не лише великих, але й малих доз іонізуючого випромінювання [1–4]. Тому пошуки найбільш характерних при радіаційному впливі змін на клітинному і молекулярному рівнях можуть виявитися корисними при розробці терапевтичної тактики супроводу опромінених осіб.

У зв'язку з тим, що у віддалений період після Чорнобильської катастрофи внесок внутрішнього опромінення поступово зростає за рахунок радіонуклідів, які надходять з продуктами харчування, дослідження, пов'язані з вивченням їх дії в умовах експерименту, набувають суттєвого значення. Незважаючи на те, що рівень стійкого радіоактивного забруднення довкілля визначається за ізотопом ¹³⁷Cs, дослідники звертають увагу на можливий вплив на кровотворну тканину радіонуклідів із тривалим періодом напіввиведення, таких як ⁹⁰Sr [5].

Отже, вважалось доцільним вивчення стану кровотворення лабораторних тварин за умов внутрішнього опромінення ⁹⁰Sr для отримання інформативних показників морфофункціональних характеристик

INTRODUCTION

Hematopoietic stem cells are characterized by high radiosensitivity compared to other cells with self-renewal characteristics. This conclusion has been established by scientists on the basis of the works, which showed the presence of damage to the hematopoietic progenitor cells by the action of high as well as low doses of ionizing radiation [1–4]. Thus, the search for the most characteristic changes associated with exposure to radiation, at the cellular and molecular levels, may be useful for the development of diagnostic and therapeutic tactics for exposed individuals.

Due to the fact that after Chornobyl accident disaster, contributions of the internal radiation exposure increases as a result of dietary intake, investigation of the effects associated with internal exposure acquires significant scientific value. Despite the fact that sustainable level of radioactive contamination of the environment is determined by ¹³⁷Cs isotope, the researchers point out possible effects of the long half-life radionuclides on the hematopoietic tissue, with ⁹⁰Sr being most prominent amongst them [5].

Therefore, it was considered appropriate to study the hematopoiesis state of the laboratory animals under internal exposure to ⁹⁰Sr in search of informative indicators of morphological and

стовбурових клітин та клітин-попередників, як підґрунтя для розробки критеріїв ураження кровотворної системи людини в разі дії внутрішнього опромінення.

МЕТА

Виходячи з того, що пул стовбурових кровотворних клітин представляє собою одну з основних мішеней дії іонізуючого випромінювання, ми поставили за мету вивчити функціонування кровотворної системи щурів при внутрішньому опроміненні ^{90}Sr за умов його тривалого та одноразового надходження.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження впливу радіонукліду ^{90}Sr на кровотворення проведені на щурах-самцях Вістар, яких утримували у стандартних умовах віварію. Одноразове введення радіонукліду ^{90}Sr здійснювалося тваринам внутрішньоочеревинно, об'єм розчину хлориду ^{90}Sr складав 0,5 мл із радіоактивністю 50 кБк на тварину. Дослідним тваринам іншої групи щоденно протягом 6 місяців додавали у їжу розчин хлориду ^{90}Sr радіоактивністю 5 кБк на тварину. До кінця періоду затравки радіоактивність скелету експериментальних тварин становила 2 кБк, поглинута доза у скелеті складала 1 Гр, поглинута у кістковому мозку доза дорівнювала 0,65 Гр.

Для вивчення функціонального стану стовбурових клітин кісткового мозку та їх найближчих нащадків – кровотворних клітин-попередників було проведено культивування гемопоетичних клітин у системі дифузійних камер *in vivo* з використанням у якості реципієнтів камер мишей лінії СВА. Культуральне середовище містило живильне середовище RPMI-1640 з 10 % фетальної телячої сироватки, L-глутамін, антибіотики пеніцилін та стрептоміцин і напіврідкий агар Difco з кінцевою концентрацією 0,33 %.

Визначали вплив ^{90}Sr на колонієутворюючу активність клітин кісткового мозку опромінених тварин за кількістю утворених колоній-клонів, а також оцінювали кількісний та якісний склад отриманих у культурі клітинних агрегатів. За ефективність клонування було прийнято кількість колоній, що виростають у культурі до терміну 18 діб. Культура гемопоетичних клітин включала мієлокаріоцити кісткового мозку та мононуклеари периферичної крові, при цьому культивування останніх проводили з метою виявлення циркулюючих клітин-попередників у опромінених тварин. Усі операції проводили з дотриманням стерильності в умовах ламінарного боксу.

functional characteristics of hematopoietic stem and progenitor cells for reasons of developing diagnostic criteria associated with internal radiation exposure.

OBJECTIVE

Based on the idea that the pool of hematopoietic stem cells represents one of the main ionizing radiation targets, we examined the functional activity of the hematopoietic system in rats with internal irradiation to ^{90}Sr for acute periods versus prolonged exposure.

MATERIALS AND METHODS

The influence of ^{90}Sr radionuclide on hematopoiesis was studied in male Wistar rats which were kept in standard vivarium conditions. Single-dose ^{90}Sr radionuclide exposures were achieved intraperitoneally with the amount of ^{90}Sr chloride solution, equivalent to 50 kBq per animal. Another group of experimental animals received a daily dose of ^{90}Sr with radioactivity of 5 kBq per animal for 6 months with food. By the end of the exposure, radioactivity of the rat skeletons was determined as 2 kBq, absorbed dose in the skeletons was 1 Gy, absorbed dose in the bone marrow was equal to 0.65 Gy.

To study the functional state of bone marrow stem cells and their immediate descendants – hematopoietic progenitor cells, series of experiments were conducted for cultivation of hematopoietic cells in diffusion chambers *in vivo* using CBA mice as recipients of the capsules. Culture medium RPMI-1640 with 10% fetal calf serum, L-glutamine, penicillin, and streptomycin antibiotics, and Difco agar with a final concentration of 0.33% were used.

We assessed the effects of ^{90}Sr on the colony-forming activity of bone marrow cells of exposed animals with the determination of the quantitative and qualitative composition of colonies and clusters. Cloning efficiency was determined by the numbers of colonies which appeared in culture after 18 days of cultivation. The culture of hematopoietic cells included bone marrow myelokaryocytes and peripheral blood mononuclear cells, moreover the last were used to detect the mononuclear cells circulating in the blood stream of irradiated animals. All operations were conducted in conditions of sterility in the laminar flow cabinet.

Для оцінки стану гемопоетичної системи при дії внутрішнього опромінення ^{90}Sr готували препарати периферичної крові та кісткового мозку досліджуваних тварин, а також проводили аналіз клітинного складу отриманих у культурі клонів, ізольованих і перенесених на скельця за допомогою цитоцентрифуги.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У роботі досліджено особливості функціонування кровотворної системи щурів при внутрішньому опроміненні ^{90}Sr за умов його тривалого та одноразового надходження до організму.

Проведені культуральні дослідження засвідчили наявність глибоких змін на рівні кровотворних клітин-попередників кісткового мозку щурів при дії внутрішнього опромінення ^{90}Sr . Це стосувалося як кількості сформованих клонів у культурі дифузійних камер *in vivo*, так і якісного складу клітинних агрегатів.

За контроль було взято показник ефективності колонієутворення клітин кісткового мозку неопромінених тварин. У цій групі ефективність клонування клітин кісткового мозку у культурі дифузійних камер *in vivo* становила $13,4 \pm 2,6$ на 1×10^5 експлантованих клітин і виражалася у переважному рості гранулоцитарно-макрофагальних колоній.

Аналіз даних, отриманих у результаті культивування гемопоетичних клітин опромінених тварин, показав, що в культурі дифузійних камер *in vivo* у дослідних групах тварин визначалося пригнічення колонієутворення порівняно з показниками контрольної групи. Ефективність клонування гранулоцитарних клітин-попередників щурів, яким хронічно вводили ^{90}Sr , знаходилась у межах від 4 до 7 клонів і становила відповідно $6,5 \pm 1,2$ на 1×10^5 експлантованих клітин. У групі тварин, яким одноразово вводили радіонуклід, кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) дорівнювала $10,8 \pm 0,5$ на 1×10^5 експлантованих клітин.

Отже, значне пригнічення колонієутворюючої здатності кістково-мозкових клітин-попередників кісткового мозку спостерігалось при хронічному внутрішньому опроміненні ^{90}Sr організму експериментальних тварин, коли виснажувалася система компенсації наслідків радіаційного ураження. Тобто, хронічне опромінення може призводити до зниження компенсаторно-приспосувальних механізмів гемопоезу і зриву адаптації у кровотворній системі внаслідок порушення процесів репарації радіаційних ушкоджень [6, 7].

Диференційований підрахунок клітин у клонах свідчив про наявність у них гемопоетичних клітин

To assess the state of the hematopoietic system under the influence of internal exposure to ^{90}Sr we prepared peripheral blood and bone marrow smears; we also analyzed cell composition of clones obtained in culture, which were isolated and transferred to glass slides using cytopspin centrifuge technology.

RESULTS AND DISCUSSION

We studied influences of acute and chronic effects of ^{90}Sr exposure upon a long-term and momentary incorporation on the function of hematopoietic system of the rats.

Cell culture studies witnessed profound changes at the level of bone marrow hematopoietic progenitor cells of the rats under the influence of internal exposure to ^{90}Sr . This concerned both the number of clones formed in diffusion chambers *in vivo* and the quality of the cell units within them.

Control indices of colony-forming efficiency were obtained cultivating bone marrow cells of non-irradiated animals. In this group, the cloning efficiency of bone marrow cells in diffusion capsules *in vivo* was $13.4 \pm 2.6 \times 10^5$ of implanted cells and expressed a preferred differentiation towards granulocyte-macrophage morphology.

Analysis of data obtained from cultures of hematopoietic cells of exposed animals indicated that a significant inhibition of the colony-forming activity could be observed, when compared to the control groups. Cloning efficiency of granulocytic progenitor cells of rats subjected to ^{90}Sr chronic exposure was in the range of 4 to 7 clones and amounted to $6.5 \pm 1.2 \times 10^5$ of implanted cells. In the group of animals which were subjected to a single exposure dose, the number of colony-forming units (CFU) amounted to $10.8 \pm 0.5 \times 10^5$ of implanted cells.

Consequently, a significant inhibition of colony-forming activity of bone marrow progenitor cells was observed, indicating exhaustion of the hematopoietic cell pool during chronic internal exposure to ^{90}Sr . Therefore, chronic exposure can lead to the reduction of hematopoietic compensatory adaptive mechanisms and to collapse of adaptation in the blood system due to disruption of reparative processes, associated with the radiation damage [6, 7].

The differential identification of the cells in clones indicated the presence of hematopoietic

гранулоцитарно-макрофагального ряду всіх етапів зрілості від бластної клітини до сегментоядерного лейкоцита; також були присутніми плазматичні клітини та макрофаги. Залежно від ступеня зрілості, гранулоцити було об'єднано у групи ранніх і пізніх гранулоцитів. У групу 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 склали групи ранніх і пізніх гранулоцитів, вказав на наявність різниці у дослідних групах порівняно з контролем. Так, обидві дослідні групи характеризувалися зростанням кількості пізніх гранулоцитів – 85 %, порівняно з контрольними 76 %.

Крім того, було з'ясовано, що у контрольних культурах зрілі гранулоцитарні елементи (паличкоядерні та сегментоядерні нейтрофіли) становили 52 % від загальної кількості, в той час як у культурах клітин кісткового мозку опромінених тварин диференційований облік гранулоцитів виявив знижену кількість зрілих нейтрофілів – 42 та 44 %, відповідно. Цей ефект затримки дозрівання клітин у клонах узгоджується з даними інших авторів, що пов'язують затримку колонієутворення з дією іонізуючої радіації.

Разом з тим, при диференційованому підрахунку клітин у клонах було з'ясовано, що кількість макрофагів у культурах кісткового мозку тварин дослідних груп (2 та 1 %, відповідно) була нижчою за цей показник у контрольних культурах – 5 %. Проте при порівнянні дослідних та контрольної груп результати проведених досліджень не дозволяли зробити висновок про наявність достовірної різниці у досліджених препаратах між кількістю мітозів та зруйнованих клітин.

У культурах клітин кісткового мозку щурів, які зазнали внутрішнього опромінення, було відзначено формування еозинофільних колоній, що склалися з еозинофільних мієлоїдних клітин. Аналіз отриманих препаратів показав, що у щурів дослідних груп серед гранулоцитарних елементів значно частіше, порівняно з контролем, зустрічаються еозинофільні форми. Так, еозинофільні колонії і кластери було виявлено у культурах кісткового мозку щурів у нормі в 4 % випадків, при хронічному введенні ^{90}Sr – у 20 %, а після одноразового введення ^{90}Sr – у 10 % випадків. Інші агрегати були представлені нейтрофільними колоніями і кластерами.

Наші дані співставні з результатами досліджень у культурі кісткового мозку осіб, які зазнали впливу

cells of granulocyte-macrophage origin at all stages of maturation from blast cells to segmented banded leucocytes, as well as plasma cells and macrophages. Depending on the degree of maturity, early and late groups of granulocytes were identified. The group of early granulocytes contained early blast cells, promyelocytes and myelocytes, while the group of late cells contained metamyelocytes, young, stab band and segmented leukocytes.

Analysis of the cellular elements grouped on the basis of maturity pointed out that there was a difference in the experimental groups compared with the control. Thus, both research groups were characterized by the increasing number of late granulocytes – 85 % versus 76 % for controls.

In addition, it was established that in the control cultures mature granulocytic elements (stab and segmented neutrophils) accounted for 52 % of the total cells, whereas in the cultures of bone marrow cells of exposed animals differentiated count of granulocytes showed reduced number of mature neutrophils – 42 % and 44 %, respectively. This effect of maturation delay in cell clones correlates with other published data which connect colony-forming impediment with ionizing radiation action.

However, during differentiated count of cell clones it was found that the numbers of macrophages in bone marrow cultures of experimental animals were lower (2 % and 1 %, respectively) than the similar values in control cultures – 5 %. However, when comparing the experimental and control groups, the results did not allow the identification of significantly different patterns in the numbers of damaged cells and mitotic events.

In cultures of rat bone marrow cells exposed to internal radiation the formation of eosinophilic colonies was observed. Analysis of obtained cytopsin slides showed that rats' bone marrow in experimental groups had a tendency towards eosinophilic form of granulocytic elements differentiation, compared to control. Eosinophilic colonies and clusters were found in cultures of rat bone marrow in 4 % of cases in the control, while chronic administration of ^{90}Sr increased these values to 20 %, and after a single dose administration of ^{90}Sr these effects were observed in 10 %. Other cell aggregates were represented by neutrophilic colonies and clusters.

Our data is comparable with the results of bone marrow cultivation in persons exposed to ioniz-

іонізуючої радіації в результаті аварії на Чорнобильській атомній станції. Саме у них була виявлена еозинофільна спрямованість диференціювання, яка виражалася у статистично достовірному рості еозинофільних колоній у культурі клітин кісткового мозку [1].

Посилення проліферативної активності еозинофільних елементів у результаті культивування кісткового мозку можна пояснити стимулюючим впливом ^{90}Sr поряд з іншими радіонуклідами, притаманними для Чорнобильської катастрофи, на цитокінову регуляцію, особливо на продукцію інтерлейкіну-5, відповідального за стимуляцію еозинофільного ростка кровотворення. Причини цього феномену можуть полягати у захисно-адаптаційній реакції організму, в якій еозинофіли, що переважають усі інші мононуклеари ферментативною активністю, беруть на себе функцію захисту у відповідь на дію іонізуючої радіації [8–10].

Крім того, було проведено дослідження циркулюючих у периферичній крові клітин-попередників опромінених тварин, наявність яких свідчить про їх мобілізацію з кісткового мозку. Нами було виявлено суттєве збільшення кількості циркулюючих клітин-попередників у периферичній крові тварин дослідних груп порівняно з контролем. Так, ефективність колонієутворення циркулюючих клітин-попередників у периферичній крові опромінених тварин складала $4,22 \pm 0,84$ КУО на 1×10^5 культивованих клітин при тривалому надходженні радіонукліду та $2,26 \pm 0,50$ КУО при одноразовому надходженні, порівняно з $0,62 \pm 0,49$ КУО у контролі.

Поява циркулюючих клітин-попередників зазвичай є ознакою суттєвих змін у гемопоетичній системі опроміненого організму. Механізм проникнення та природа міграції клітин-попередників у периферичну кров залишаються не до кінця з'ясованими. Про зв'язок між тривалим опроміненням організму та мобілізацією клітин-попередників із кісткового мозку та їх виходом у периферичну кров свідчать дані, отримані рядом авторів при дослідженні гемопоезу осіб, що мешкають на територіях, забруднених радіонуклідами [1].

Як результат порушеної проліферації і диференціювання кровотворних клітин-попередників, було засвідчено зміни на рівні морфологічно ідентифікованих клітин, а саме, у клітинах периферичної крові і кісткового мозку. Виявилось, що внутрішнє опромінення радіонуклідом ^{90}Sr у діапазоні малих доз призводить до появи дизгемопоезу зі зміною співвідношення між окремими паростками

ing radiation resulting from the Chernobyl nuclear power plant accident. These patients revealed the tendency eosinophilic differentiation, which was shown in statistically significant eosinophilic colonies growth in bone marrow cell culture [1].

Observed increased proliferative activity of eosinophilic elements during cultivation of bone marrow cells can be explained by the stimulating effects of cytokine regulation and especially by production of interleukin-5, responsible for stimulating eosinophilic lineage as the result of ^{90}Sr effects, along with other radionuclides, that are associated with the Chernobyl disaster. The reasons for this phenomenon may be due to the protective or adaptive response of the organism in which eosinophils dominating all the other mononuclear cells' enzymatic activity, play a protective role in response to ionizing radiation [8–10].

In addition, progenitor cells circulating in the peripheral blood of irradiated animals demonstrated their mobilization from bone marrow. We have established a significant increase in the numbers of circulating progenitor cells in peripheral blood of animals from experimental groups compared to the control. Thus, the colony-forming efficiency of the circulating progenitor cells in peripheral blood of irradiated animals was 4.22 ± 0.84 per 1×10^5 cultured cells for animals with prolonged exposure and 2.26 ± 0.50 CFU per 1×10^5 for acute exposure group, compared with 0.62 ± 0.49 CFU per 1×10^5 in control.

The appearance of circulating progenitor cells is usually a sign of significant changes in the hematopoietic system of irradiated organism. The mechanism of penetration and migration of progenitor cells in peripheral blood is not fully elucidated. The relationship between prolonged exposure of the body and the mobilization of progenitor cells from the bone marrow and their release into the peripheral blood according to data obtained by several authors was also evident in the studies of individuals living in areas contaminated with radionuclides [1].

As a result of impaired proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells it has been demonstrated that the changes also involved morphologically identifiable cells, namely, cells in peripheral blood and bone marrow. It turned out that internal exposure to ^{90}Sr radionuclide in the low dose range leads to impairment of hematopoiesis with the change of balance between indi-

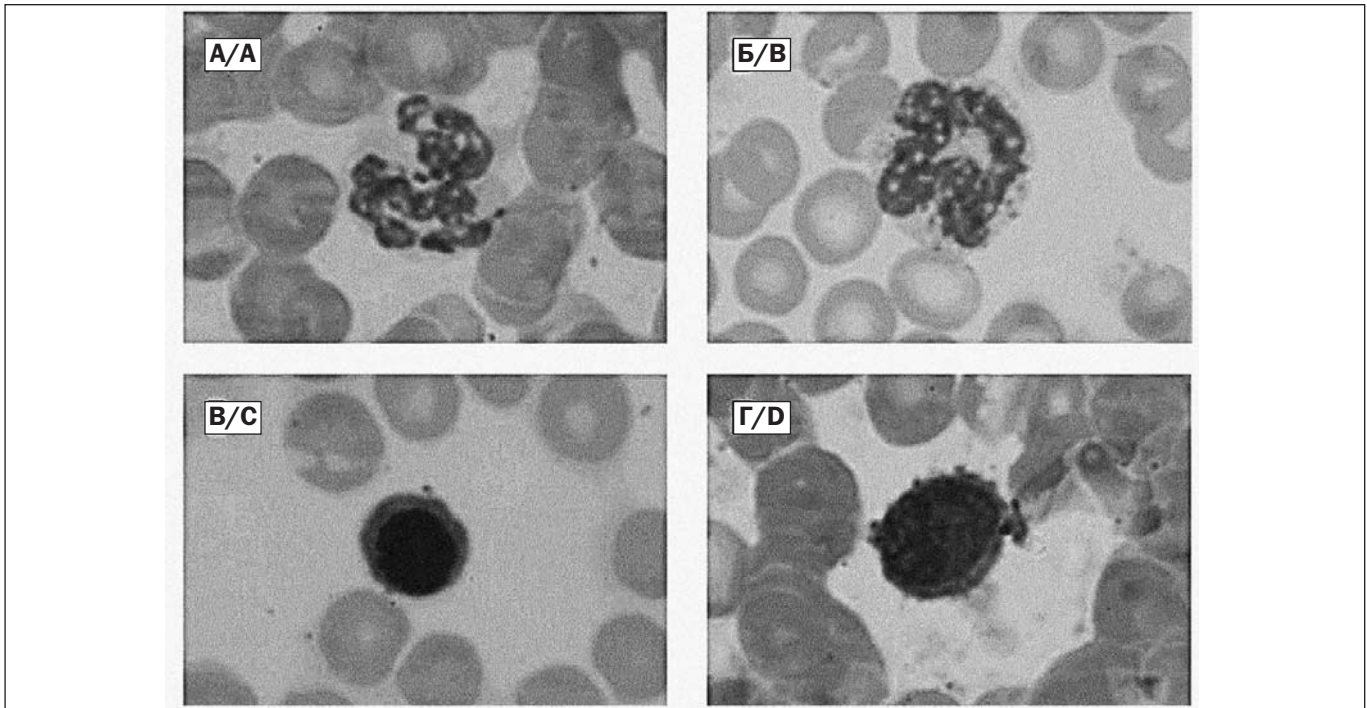


Рисунок 1. Патологічні зміни у периферичній крові опромінених тварин: А – нейтрофільний лейкоцит із гіперсегментацією ядра; Б – дегрануляція цитоплазми у клітині гранулоцитарного ряду; В – базофільний еритробласт; Г – лімфоцит із гіпербазофілією цитоплазми та ворсинчастими відростками. Забарвлення за Романовським-Гімза. 36. x 900

Figure 1. The pathological changes in peripheral blood of irradiated animals: A – neutrophilic leukocyte nuclei with hypersegmentation; B – cytoplasm degranulation in the granulocyte cell; C – basophilic erythroblast; D – lymphocyte and cytoplasm with villous hyperbasophilic projections. Romanovsky-Giemsa staining. x 900

кровотворення, порушенням процесів проліферації, диференціювання й дозрівання клітин кісткового мозку, наявністю патологічних форм клітин.

Так, оцінка якісних змін у кровотворній системі при опроміненні тварин дозволила виявити збільшення кількості патологічних клітин, в міру нагромадження дози опромінення. Зокрема, спостерігали підвищений рівень двоядерних лімфоцитів і двоядерних молодих еритроїдних елементів.

У показниках клітин периферичної крові щурів спостерігалися якісні зміни (рис. 1), у порівнянні з контролем. Відбувалося збільшення кількості нейтрофілів з токсигенною зернистістю, з гіперсегментацією і гіпосегментацією ядра, вакуолізацією цитоплазми, фрагментацією ядра, відщепленням ядерного хроматину.

Крім того, були наявні клітини гранулоцитарного ряду з дегрануляцією цитоплазми. У периферичній крові також зустрічалися незрілі елементи еритроїдного ряду. У лімфоцитах спостерігалась гіпербазофілія цитоплазми, наявність ворсинчастих відростків, а також рідерівські форми лімфоцитів. У ряді клітин реєструвались ознаки порушення структури ядра, що виражались у аномальному відшнурованні його фрагментів.

vidual lineages, disturbances in proliferation, differentiation and maturation of bone marrow cells, as well as the presence of pathological forms of cells.

Thus, assessment of qualitative changes in the hematopoietic system of irradiated animals allowed identifying an increase in the numbers of abnormal cells during the accumulation of radiation dose. In particular, observed elevated levels of lymphocytes and dual-nuclei and dual-nuclei early erythroid cells.

When compared to control, qualitative changes were observed in peripheral blood parameters (Fig. 1). An increase in the numbers of neutrophils with toxigenic granularity, hypersegmentation and hyposegmentation of the nucleus, vacuolization of the cytoplasm, nucleus fragmentation as well as separation of the nuclear chromatin were observed.

In addition, some granulocytic cells had degranulated cytoplasm. Immature erythroid elements could also be observed in the peripheral blood. Lymphocytes were hyperbasophilic and the cytoplasm contained villous projections; some Rider's lymphocytes could also be seen. Cells had also anomalies in the nuclear structure with abnormal fragments separation.

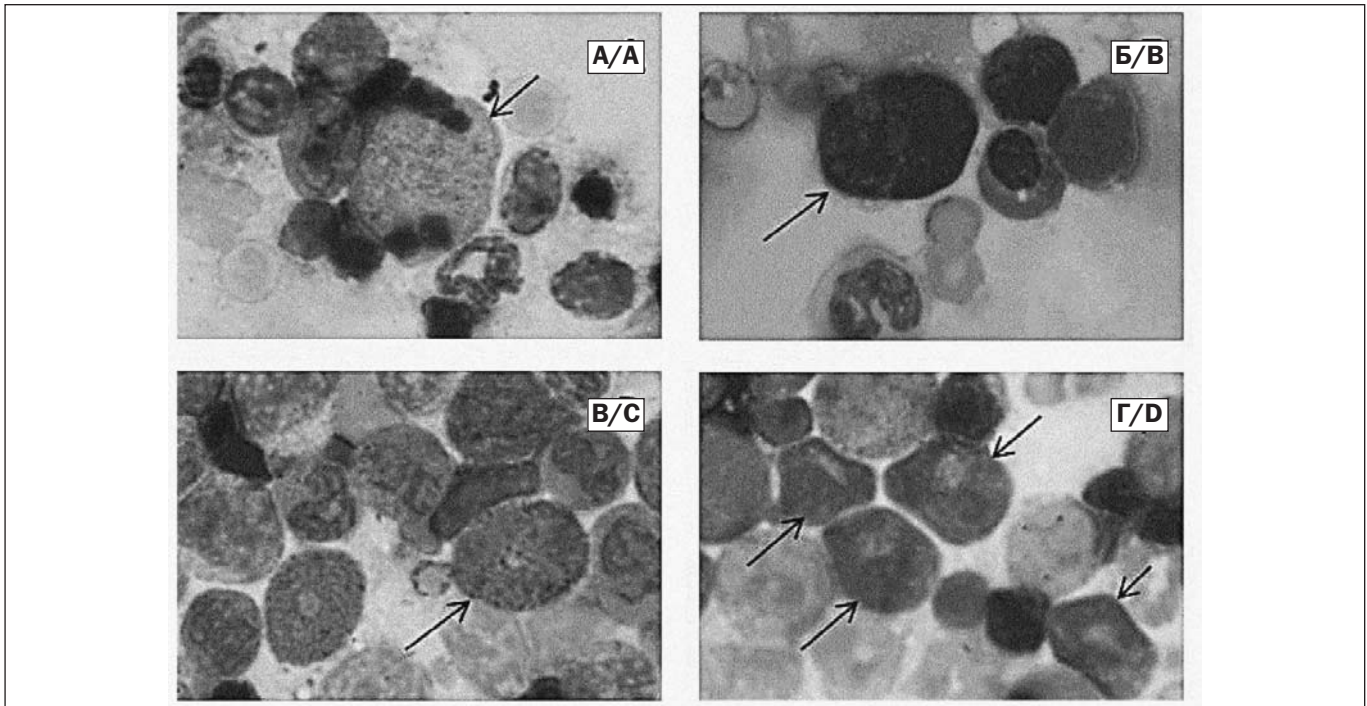


Рисунок 2. Диспластичні морфологічні зміни у кістковому мозку опромінених тварин: А – патологічний мітоз; Б – двоядерна клітина еритроїдного ряду; В – патологічна зернистість у клітинах гранулоцитарного ряду; Г – збільшення кількості плазматичних клітин. Забарвлення за Романовським-Гімза. 36. x 900

Figure 2. Dysplastic morphological changes in the bone marrow of irradiated animals: A – pathological mitosis; B – dual-nuclei erythroid cell; C – pathological granularity of granulocytic cells; D – increasing number of plasma cells. Romanovsky-Giemsa staining. x 900

Аналіз мієлограм свідчив про наявність диспластичних морфологічних змін, виявлених у клітинах всіх ростків системи кровотворення тварин, опромінених ^{90}Sr (рис. 2). В елементах гранулоцитарного ряду була наявна патологічна зернистість, повна чи часткова дегрануляція цитоплазми нейтрофільних мієлоцитів і метамієлоцитів, фрагментація та гіпосегментація ядер зрілих нейтрофілів. У лімфоцитах виявляли базофілію і вакуолізацію цитоплазми.

Дизмегакаріоцитопоз проявлявся наявністю мікромегакаріоцитів, мегакаріоцитів з круглими ядрами і частковим відшнуровуванням тромбоцитів. В каріоцитах еритроїдного ряду спостерігали явище каріорексису, асинхронне дозрівання ядра і цитоплазми, наявність цитоплазматичних містків між клітинами, одиничні двоядерні нормобласти, острівцеві накопичення еритроїдних клітин.

ВИСНОВКИ

У роботі здійснено дослідження функціонування кровотворної системи щурів при внутрішньому опроміненні ^{90}Sr за умов його тривалого та одноразового надходження до організму та розширено уявлення про механізм дії внутрішнього опромінення

Myelogram analysis indicated the presence of dysplastic morphological changes in the hematopoietic cells of all lineages in the bone marrow of the animals exposed to ^{90}Sr (Fig. 2). In a number of granulocytic cells pathological granularity was evident, complete or partial cytoplasm degranulation of neutrophilic myelocytes and metamyelocytes, fragmentation and hyposegmentation of mature neutrophils' nuclei. In lymphocytes we observed vacuolization and basophilia of the cytoplasm.

Impairment of megakaryocyte development revealed in the presence of micromegakaryocytes, megakaryocytes with round nuclei and partial platelets release. In erythroid karyocytes we observed karyorrhexis, asynchronous maturation of nucleus and cytoplasm, the presence of cytoplasm bridges between the cells, single dual-nuclear normoblasts, islets accumulation of erythroid cells.

CONCLUSIONS

In current work we performed the investigation of hematopoietic system functioning under protracted chronic and single-dose exposure of the rats to ^{90}Sr ; we have also expanded the understanding of the mechanism of internal irradiation action on the

на систему гемопоезу. На основі проведених експериментів було з'ясовано, що тривала дія інкорпорованого радіонукліду ^{90}Sr призводить до суттєвих порушень у кровотворній системі, зокрема, було виявлено зміни у гематологічних показниках опромінених тварин, появу циркулюючих клітин-попередників у периферичній крові, зниження ефективності колонієутворення клітин-попередників кісткового мозку, а також кількісні та якісні зміни у клонах.

При цьому різниця у режимі надходження ^{90}Sr зумовлювала відмінності у показниках функціонування кровотворної системи. Так, більш виражені зміни спостерігалися за умови тривалого надходження радіонукліду в організм тварини, при якому сумарна доза опромінення поступово збільшувалась. У той же час після одноразового введення ^{90}Sr ураження кровотворних клітин у подальшому компенсувалося процесами репарації, що виражалось в нормалізації показників кістково-мозкового кровотворення.

Визначені показники підтверджують зв'язок виявлених раніше вказаних порушень у опромінених осіб із дією іонізуючої радіації і можуть слугувати підґрунтям для розробки критеріїв ураження кровотворної системи людини та формування груп ризику серед осіб, які зазнали впливу ^{90}Sr .

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Білко Н.М. Кровотворні клітини-попередники при радіаційному опроміненні (експериментально-клінічне дослідження): автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.01 / НАН України ; Ін-т експ. патол., онкол. і радіобіол. – К., 1998. – 31 с.
2. Муксимова К. Н. Клеточные и молекулярные основы перестройки кроветворения при длительном радиационном воздействии / К. Н. Муксимова, Г. С. Мушкачева. – М. : Энергоатомиздат, 1995. – 161 с.
3. Радіобіологічні ефекти у ссавців: погляд через 20 років після аварії на ЧАЕС / Я. Серкіз, А. Липська, І. Дрозд, Н. Родіонова // Вісн. НАН України. – 2006. – № 4. – С. 14–27.
4. Green D. E. Consequences of irradiation on bone marrow phenotypes, and its relation to disruption of hematopoietic precursors / D. E. Green // Bone. – 2014. – Vol. 63. – P. 87–94.
5. Пряхин Е. А. Оценка влияния уровня доз и поглощенной дозы на отдаленные последствия у крыс, хронически принимающих стронций-90 / Е. А. Пряхин, В. Л. Шведов, А. В. Аклеев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42, вып. 4. – С. 412–418.
6. Аклеев А. В. Отдаленные эффекты в системе гемопоеза на клеточном и субклеточном уровне при хроническом облучении человека / А. В. Аклеев, Г. А. Веремеева, А. В. Возилова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2006. – Т. 46(5). – С. 519–526.

hematopoietic system. On the basis of performed experiments it was established that long-term effects of incorporated ^{90}Sr radionuclide lead to significant disturbances in hematopoietic system, in particular, changes were revealed in hematological parameters of irradiated animals, as well as the appearance of circulating progenitor cells in peripheral blood, reducing the colony-forming efficiency of bone marrow progenitor cells, with quantitative and qualitative changes in the cellular clones.

Along with that, the difference in ^{90}Sr administration predetermined differences in hematopoietic system functioning. So, more pronounced changes were observed under prolonged intake of radionuclides, when the total radiation dose was gradually increasing. At the same time after a single administration of ^{90}Sr the damage to hematopoietic cells was compensated with reparation processes, which revealed in normalization of bone-marrow parameters.

Determined indices confirm the connection between previously investigated alterations in exposed individuals with the effect of ionizing radiation, which can serve as a basis for developing the criteria of human blood system impairment and formation of risk groups among people who were exposed to ^{90}Sr .

REFERENCES

1. Bilko N. M. [Hematopoietic progenitor cells with radiation (experimentally-clinical research)] [thesis of dissertation]. Kyiv: Institute of experimental pathology, oncology and radiobiology, NAS of Ukraine; 1998. 31 p. Ukrainian.
2. Muksimova KN, Mushkacheva GS. [The cellular and molecular basis of the restructuring of hematopoiesis in long-term radiation exposure]. Moscow: Energoatomizdat; 1995. 161 p. Russian.
3. Serkiz Y, Lypska A, Drozd I, Rodionova N. [Radiobiological effects in mammals: a view 20 years after the Chernobyl accident]. Visnyk NAN Ukrainy. - 2006. - N 4. - P. 14-27. Ukrainian.
4. Green DE. Consequences of irradiation on bone marrow phenotypes, and its relation to disruption of hematopoietic precursors. Bone. 2014;63:87-94.
5. Priakhin EA, Shvedov VL, Akleyev AV. [The evaluation of dose rate and accumulating dose influence on late radiation effects under condition of ^{90}Sr chronic intake]. Radiats Biol Radioekol. 2002;42(4):412-8. Russian.
6. Akleyev AV, Veremeeva GA, Vozilova AV. [Late effects at cell and subcell level in the hemopoietic system after chronic radiation exposure in man]. Radiats Biol Radioekol. 2006;46(5):519-26. Russian.
7. Shao L, LuoY, ZhouD. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. Antioxid Redox Signal. 2014;20(9):1447-62.

7. Shao L. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation / I. Shao, Y. Luo, D. Zhou // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – Vol. 20(9). – P. 1447–1462.
8. Danova M. Cytokine receptors, growth factors and cell cycle in human bone marrow and peripheral blood hematopoietic progenitors / M. Danova, M. Aglietta // *Haematologica.* – 1997. – Vol. 82. – P. 622–629.
9. Low doses of ionizing radiation induce immune-stimulatory responses in isolated human primary monocytes / H. El-Saghire, A. Michaux, H. Thierens, S. Baatout // *Int. J. Mol. Med.* – 2013. – Vol. 32(6). – P. 1407–1414.
10. Hekim N. Radiation triggering immune response and inflammation. / N. Hekim, Z. Cetin, Z. Nikitaki et al. // *Cancer Lett.* – 2015. – Vol. 368(2). – P. 156–163.
8. Danova M, Aglietta M. Cytokine receptors, growth factors and cell cycle in human bone marrow and peripheral blood hematopoietic progenitors. *Haematologica.* 1997;82:622-9.
9. El-Saghire H, Michaux A, Thierens H, Baatout S. Low doses of ionizing radiation induce immune-stimulatory responses in isolated human primary monocytes. *Int J Mol Med.* 2013;32(6):1407-14.
10. Hekim N, Cetin Z, Nikitaki Z, Cort A, Saygili E. Radiation triggering immune response and inflammation. *Cancer Lett.* 2015;368(2):156-63.

Стаття надійшла до редакції 25.09.2015

Received: 25.09.2015