

Стан гемопоетичного мікрооточення при опроміненні стронцієм-90

І.З.Борбуляк

Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Київ, Україна

Проведено дослідження стану гемопоетичного мікрооточення опромінених тварин з метою виявити ступінь радіочутливості стромальних клітин-попередників, а також показники метаболізму в сполучнотканинному матриксі. Виявлено, що при хронічному внутрішньому опроміненні тварин стронцієм-90 спостерігалось значне пригнічення ефективності колонієутворення та здатності до підтримки гемопоезу стромальних клітин-попередників кісткового мозку, тоді як одноразове введення радіонуклідів зумовлювало менш суттєве ураження строми гемопоетичного мікрооточення. Виявлено деструктивні зміни в позаклітинному матриксі сполучної тканини внаслідок внутрішнього опромінення організму тварин, що опосередковано може впливати на структуру і функції гемопоетичного мікрооточення.

Ключові слова: гемопоез, строма, мікрооточення, стронцій-90.

ВСТУП

Гемопоетичне мікрооточення є сукупністю локальних умов, необхідних і достатніх для підтримання проліферації і диференціювання кровотворних клітин. Стромальні клітини та екстрацелюлярний матрикс забезпечують прикріплення кровотворних клітин, і в утвореному таким чином мікрооточенні відбуваються процеси проліферації та дозрівання гемопоетичних клітин, що регулюються шляхом секреції стимулюючих та інгібуючих цитокінів. Отже, гомеостаз у системі кровотворення забезпечується численними механізмами зворотного зв'язку та взаємодії між гемопоетичними клітинами та їхнім мікрооточенням [5].

Усе частіше знаходить своє підтвердження гіпотеза про те, що порушення кістковомозкового кровотворення внаслідок опромінення найімовірніше є не тільки наслідком прямих ушкоджень ДНК гемопоетичних клітин, а й включає зміни в регуляторній дії мікрооточення [6]. Нещодавно було виявлено, що дія іонізуючої радіації на гемопоетичну систему, поруч із безпосереднім впливом на кровотворні клітини, викликає зміни в гемопоетичному мікрооточенні, а саме в продукції ростових факторів, цитокінів, реактивних форм кисню і нітрогену, та інших «байстендер-факторів». Це в свою чергу впливає на систему кровотворення [5].

Щодо радіобіологічних характеристик кровотворного мікрооточення, дані поки що обмежені. Ряд дослідників стверджують, що кровотворні та стромальні кістковомозкові клітини суттєво відрізняються за ступенем радіочутливості. Гемопоетична стовбутова клітина є високорадіочутливою, тож опромінення в дозі 450-500 рад практично повністю знищує кровотворні клітини-попередники (більше 99%), тоді як мезенхімальні стовбурові клітини практично повністю зберігаються в цьому інтервалі доз [4]. Проте після опромінення іонізуючою радіацією у вищих дозах не тільки радіочутливі гемопоетичні клітини, а й не гемопоетичні тканини, включаючи кістковомозкові стромальні клітини-попередники, схильні переходити до апоптозу.

Метою роботи було дослідити стан гемопоетичного мікрооточення тварин, внутрішньо опромінених стронцієм-90.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Модель внутрішнього хронічного опромінення експериментальних тварин було розроблено у відділі радіобіології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України. Білих лабораторних щурів ядра Вістар утримували в умовах ві-

варію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології на стандартному харчовому раціоні. Тварини були розподілені на три групи: 1 група — контроль (інтактні тварини); 2 група — тривале введення стронцію-90; 3 група — одноразове введення стронцію-90. Дослідним тваринам 2 групи щоденно протягом 6 місяців (з 4 о 10 місяць, у період активного росту) з їжею вводили радіоактивний стронцій-90 у формі розчину хлориду стронцію радіоактивністю 5 кБк. Тваринам 3 групи одноразово внутрішньоочеревинно вводили розчин хлориду стронцію-90 в об'ємі 0,5 мл радіоактивністю 50 кБк на тварину.

Отримання кровотворних клітин кісткового мозку зі стегових кісток тварин проводили з дотриманням стерильності в умовах ламінарного бокса. Для оцінки функціональної активності стромальних клітин-попередників кісткового мозку опромінених тварин було проведено культивування клітин у системі *in vitro* в середовищі RPMI-1640 із додаванням антибіотиків за відсутності фетальної телячої сироватки в 25 см² пластикових культуральних флаконах із подальшою оцінкою кількості утворених колоній, при цьому за колонію приймали клітинні агрегати з 50 і більше клітин. Культивування проводили в CO₂-інкубаторі з 5% CO₂ при 37°C й абсолютній вологості. Кількість колонієутворюючих одиниць фібробластів (КУОФ) на 1 млн культивованих клітин визначали на 14-ту добу культивування.

З метою оцінки здатності стромальних клітин кісткового мозку опромінених тварин до підтримки гемопоезу в культурі *in vitro* проводили отримання фідерних шарів. Для цього суспензію клітин кісткового мозку змішували із культуральним середовищем DMEM із 10% фетальної телячої сироватки та антибіотиками і засівали в пластикові культуральні 6-лункові планшети. Через добу проводили часткову заміну культурального середовища (1/2 загальної об'єму) з видаленням частини неадгезованих клітинних елементів. Потім середовище міняли кожні 72 год. шляхом зміни половини супернатанту свіжим середовищем. Сформований первинний моношар отримували за 7-10 днів. Після цього проводили субкультивування клітин, знімаючи їх із поверхні культуральної посудини за допомогою 0,25% розчину трипсин-EDTA, відмивали центрифугуванням, після видалення супернатанту додавали середовище і ретельно перемішували та продовжували культивування. Перед досягненням моношару клітини обробляли мітоміцином-С у концентрації 2 мкг/мл впродовж 2 год. при 37°C і 5% CO₂ для зупинки процесів клітинного поділу. Потім

моношар 5 разів відмивали розчином PBS, додавали культуральне середовище і використовували як фідерний шар. Гемопоетичні клітини кісткового мозку тварин групи інтактного контролю культивували в порожнині дифузійної камери за методом Н.М.Білько [3].

У сироватці крові експериментальних тварин вивчали наступні біохімічні показники: активність колагенази, фракції вільного та білковозв'язаного гідроксипроліну та вміст глікозаміногліканів. Активність колагенази визначали за методом S.Lindy, J.Halme, фракції гідроксипроліну виділяли за методом S.Frey, вміст у них гідроксипроліну — за Н.Ж. Stegemann, сумарний вміст глікозаміногліканів — орциновим методом [2].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що стромальні клітини кісткового мозку порівняно з гемопоетичними клітинами-попередниками є більш радіорезистентними, проте загалом це гетерогенна група клітин, серед яких існують популяції клітин із вищим ступенем радіочутливості.

Було проведено дослідження стану гемопоетичного мікрооточення опромінених тварин з метою виявити ступінь радіочутливості стромальних клітин-попередників, а також показники метаболізму в сполучнотканинному матриксі, що опосередковано можуть впливати на структуру і функції гемопоетичного мікрооточення, а отже на кровотворення в цілому.

Результати культивування клітин кісткового мозку тварин групи інтактного контролю та опромінених одноразовим і тривалим введенням стронцію-90 наведені в табл. 1.

Було виявлено затримку колонієутворення стромальними клітинами-попередниками кісткового мозку опромінених тварин. Зокрема в групі інтактного контролю перші колонії з'являлися вже на 2-гу добу культивування, тоді як хронічне внутрішнє опромінення стронцієм-90 мало наслідком утворення перших колоній у культурі стромальних клітин аж на 4-ту добу культивування.

Разом із тим одноразове гостре опромінення введенням стронцію-90 не відобразалося в суттєвому зниженні колонієутворюючої здатності стромальних клітин-попередників кісткового мозку опромінених тварин порівняно з тваринами групи інтактного контролю — перші колонії з'являлися на 2-гу добу культивування, а до закінчення терміну культивування на 14-ту добу показник КУОФ у цій групі становив

ТАБЛИЦЯ 1

Ефективність колонієутворення в культурі *in vitro* стромальних клітин кісткового мозку внутрішньо опромінених стронцієм-90 щурів

Доба культивування	Кількість КУОф на 10 ⁶ культивованих клітин		
	1	2	3
1	0	0	0
2	0,80 ± 0,42	0,60 ± 0,52	0,80 ± 0,42
3	1,40 ± 0,52	0,90 ± 0,32	1,20 ± 0,42
4	1,70 ± 0,48	1,10 ± 0,32	1,50 ± 0,53
5	2,30 ± 0,48	1,30 ± 0,48	1,70 ± 0,48
6	2,60 ± 0,52	1,70 ± 0,48	1,90 ± 0,32
7	3,20 ± 0,42	2,20 ± 0,63	2,50 ± 0,53
8	3,30 ± 0,48	2,30 ± 0,48	2,80 ± 0,42
9	3,40 ± 0,52	2,40 ± 0,52	3,10 ± 0,32
10	3,80 ± 0,42	2,50 ± 0,53	3,30 ± 0,48
11	4,40 ± 0,52	2,90 ± 0,32*	3,70 ± 0,48
12	4,50 ± 0,53	3,10 ± 0,32*	3,90 ± 0,32
13	4,60 ± 0,52	3,20 ± 0,42*	4,20 ± 0,42
14	5,10 ± 0,74	3,30 ± 0,48	4,30 ± 0,48

Примітка: * – відмінності достовірно відрізняються ($p < 0,05$).

4,30±0,48 на 1 млн культивованих клітин. При цьому спостерігалось зниження цього показника в групі тварин, хронічно опромінених стронцієм-90, — він становив 3,30±0,48 КУОф на 1 млн культивованих клітин порівняно з контрольним рівнем 5,10±0,74 КУОф.

Отже, значне пригнічення колонієутворюючої здатності стромальних клітин-попередників кісткового мозку спостерігалось при хронічному внутрішньому опроміненні стронцієм-90 організму експериментальних тварин, коли виснажувалася система компенсації радіаційних ушкоджень. Тобто, хронічне опромінення може призводити до зниження компенсаторно-приспосувальних механізмів гемопоєзу і зриву адаптації в кровотвірній системі [1].

Оскільки порушення в системі кровотворення можуть суттєво залежати від радіаційно-індукованих змін у гемопоетичному мікрооточенні, було поставлено за мету дослідити здатність стромальних клітин опромінених тварин до підтримки кровотворення в культурі. Для досягнення цієї мети було проведено куль-

тивування *in vitro* гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку тварин інтактного контролю в гелевих дифузійних камерах на фідерних шарах, попередньо отриманих зі стромальних клітин.

Результати проведених досліджень наведені в табл. 2. За контроль взяті показники колонієутворення клітин-попередників кісткового мозку тварин групи інтактного контролю, при цьому фідерний шар сформований стромальними клітинами кісткового мозку тварин цієї ж групи.

У результаті проведених досліджень було виявлено знижену ефективність колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку в культуральній системі, де фідерним шаром слугують стромальні клітини, отримані з кісткового мозку хронічно опромінованих стронцієм-90 тварин.

Так, показник КУО в цій групі становив 9,60±0,97 на 10⁵ культивованих клітин, тоді як контрольне значення КУО складало 15,02±0,84, тобто спостерігалось зниження в 1,5 разу здат-

ТАБЛИЦЯ 2

Ефективність колонієутворення в культурі *in vitro* клітин кісткового мозку внутрішньо опромінених стронцієм-90 щурів, культивування в дифузійних камерах у присутності фідерного шару

Джерело клітин для отримання фідерного шару	Кількість КУО на 10 ⁵ культивованих клітин
Інтактний контроль	15,02±0,84
Тварини, внутрішньо опромінені стронцієм-90 (хронічне опромінення)	9,60±0,97 *
Тварини, внутрішньо опромінені стронцієм-90 (гостре опромінення)	13,60±0,93

Примітка: * – відмінності достовірно відрізняються ($p < 0,01$).

ТАБЛИЦЯ 3

Показники метаболізму в органічній основі сполучної тканини тварин, опромінених стронцієм-90

Показники	Група тварин		
	1 група	2 група	3 група
Активність колагенази, мкмоль/л·год.	7,93±0,39	9,42±0,36	7,00±0,36
Фракція вільного гідроксипроліну, мкмоль/л	9,94±0,35	10,17±5,58	9,99±0,16
Фракція білковозв'язаного гідроксипроліну, мкмоль/л	9,17±0,49	6,99±2,29	9,19±2,31
Вміст глікозаміногліканів, г/л	0,090±0,004	0,166±0,008	0,190±0,009

ності стромальних клітин до підтримки кровотворення в культурі.

У той же час стромальний шар, сформований клітинами кісткового мозку тварин, одноразово опромінених стронцієм-90, за здатністю до підтримки кровотворення в культурі виявився близьким до контрольного (13,60±0,93). Отже, одноразове опромінення організму тварин стронцієм-90 здійснювало порівняно незначний вплив на функціональну активність стромальних клітин-попередників кісткового мозку, та з часом цей показник наближався до норми.

Було також поставлено за мету дослідити зміни в органічній основі сполучної тканини, а саме визначити активність колагенази, вміст фракцій вільного та білковозв'язаного гідроксипроліну, а також вміст глікозаміногліканів. Результати біохімічних досліджень показників сироватки крові тварин контрольної та дослідних груп наведені в табл. 3.

На основі проведених біохімічних досліджень було виявлено порушення метаболічних процесів у складових органічній основі сполучної тканини під дією іонізуючого випромінювання інкорпорованого стронцію-90. Зокрема активність колагенази в сироватці крові дослідних тварин у першій серії експериментів (2 група) становила 9,42±0,36 мкмоль/л·год. порівняно з контрольною 7,93±0,39 мкмоль/л·год. При цьому в другій серії експериментів (3 група) активність колагенази була близькою до контрольної і знаходилась на рівні 7,00±0,36 мкмоль/л·год. Вміст глікозаміногліканів у сироватці крові контрольних тварин становив 0,090±0,004 г/л; у першій серії експериментів цей показник переважав контрольний на 80% і становив 0,166±0,008 г/л, а у другій — на 104% і складав 0,190±0,009 г/л.

Разом із тим не було виявлено достовірних відмінностей у фракціях вільного та білковозв'язаного гідроксипроліну при порівнянні дослідних та контрольної груп. Так, контрольні показники склали 9,94±0,35 та 9,17±0,49 мкмоль/л відповідно. У тварин 2 групи фракція вільного гідроксипроліну становила

10,17±5,58 мкмоль/л, а білковозв'язаного — 6,99±2,29 мкмоль/л. Показники фракцій гідроксипроліну в сироватці крові тварин 3 групи були близькими до контрольних та склали 9,99±0,16 та 9,19±2,31 мкмоль/л відповідно.

Вища активність колагенази в сироватці крові тварин дослідної групи першої серії експериментів, поруч із підвищеним рівнем глікозаміногліканів в усіх опромінених тварин, свідчить про порушення рівноваги між процесами синтезу і розпаду колагену, що в підсумку означає більший ступінь ураження сполучної тканини у тварин із хронічним надходженням стронцію-90 до організму.

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень було виявлено, що при хронічному внутрішньому опроміненні тварин стронцієм-90 спостерігалось значне пригнічення ефективності колонієутворення та здатності до підтримки гемопоєзу стромальних клітин-попередників кісткового мозку, тоді як одноразове введення радіонукліду зумовлювало менш суттєве ураження строми гемопоетичного мікрооточення. Крім того на основі аналізу отриманих результатів було виявлено вищу активність колагенази в сироватці крові тварин, хронічно опромінюваних стронцієм-90, що поруч із підвищеним рівнем глікозаміногліканів свідчить про порушення рівноваги між процесами синтезу і розпаду колагену. Таким чином, отримані дані відображають деструктивні зміни в позаклітинному матриксі сполучної тканини внаслідок внутрішнього опромінення організму тварин, що опосередковано може впливати на структуру і функції гемопоетичного мікрооточення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аклеев А.В. Состояние гемопоэза в условиях многолетнего облучения костного мозга у жителей прибрежных селр. Теча / А.В.Аклеев, Т.А.Варфоломеева // Радиационная биология. Радиоэкология, 2007. — Т. 47, №3. — С. 307-321.
2. Магомедов С. Метаболические нарушения в органической основе костной ткани у больных хро-

- ническим остеомиелитом верхних конечностей / С.Магомедов, Д.В.Ивченко, Е.Н.Кравченко, Л.Б.Половец // Літопис травматології та ортопедії. — 2008. — №1-2. — С. 72-75.
3. Патент України №2692. Спосіб виготовлення камери для культивування клітин / Н.М.Білько від 15.04.1994. — Офіційний бюлетень «Промислова власність». — 1994. — №5. — С. 218.
 4. Чертков И.Л. Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение / И.Л.Чертков, О.А.Гуревич. — М.: Медицина, 1984. — 237 с.
 5. Wright E.G. Microenvironmental and genetic factors in haemopoietic radiation responses // Int. J. Radiat. Biol. — 2007. — Vol. 83. — P. 813-818.
 6. Zhao Y. Gene expression profiling in the inductive human hematopoietic microenvironment / Y.Zhao, E.Chen, L.Li et al. // Biochem Biophys Res Commun. — 2004. — Vol. 15. — P.703-711.

И.З.Борбуляк. Состояние гемопоэтического микроокружения при облучении стронцием-90. Киев, Украина.

Ключевые слова: гемопоэз, строма, микроокружение, стронций-90.

Проведены исследования состояния гемопоэтического микроокружения облученных животных с целью определить степень радиочувствительности стромальных клеток-предшественников, а также показатели метаболизма в соединительнотканном матриксе. Обнаружено, что при хроническом внутреннем облучении животных стронцием-90 наблюдалось значительное угнете-

ние эффективности колониеобразования и способности к поддержке гемопоэза стромальных клеток-предшественников костного мозга. При этом однократное введение радионуклида вызывало менее существенное поражение стромы гемопоэтического микроокружения. Обнаружены деструктивные изменения во внеклеточном матриксе соединительной ткани вследствие внутреннего облучения организма животных, что может косвенно влиять на структуру и функции гемопоэтического микроокружения.

I.Z.Borbulyak. Hematopoietic microenvironment under Strontium-90 irradiation. Kyiv, Ukraine.

Key words: hematopoiesis, stroma, microenvironment, Strontium-90.

Investigation of hematopoietic microenvironment of irradiated animals was performed to evaluate the level of radiosensitivity of stromal progenitor cells, as well as the indices of metabolism in connective tissue matrix. It was revealed that under chronic inner exposure to Strontium-90 stromal cells are characterized by decreased colony-forming efficiency and lower capacity to maintain hematopoiesis in culture. At the same time stroma of bone marrow microenvironment is less affected after single injection of radionuclide. Besides, destructive changes in extracellular matrix of connective tissue were shown, which may indirectly have the influence on bone marrow microenvironment structure and functions.

Надійшла до редакції 07.11.2010 р.