

©О. А. Бойко¹, Г. Й. Лавренчук¹, В. Р. Гурандо²,
А. І. Довгалюк³, І. М. Кліщ³

ДУ "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України"¹

Ужгородський національний університет²

ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського"³

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ НОВОНАРОДЖЕНИХ ЩУРІВ, ОПРОМІНЕНИХ *IN UTERO* РАДІОІЗОТОПАМИ ЙОДУ-131 В РІЗНІ ТЕРМІНИ ГЕСТАЦІЇ

Резюме. Організм людини особливо чутливий до впливу опромінення через інкорпоровані радіоізотопи йоду на ранніх етапах онтогенезу (пренатальному і ранньому постнатальному). Критичним вважають період між 9–40-ю добами після зачаття. Серед постраждалих Чорнобильської катастрофи, які найбільшою мірою зазнали впливу радіоактивного ¹³¹I, найбільш уразливими щодо віддалених медичних наслідків виявилися не тільки особи, опромінені у дитячому та підлітковому віці, а й опромінені *in utero* в I та III триместрах гестації.

Мета дослідження – вивчити структурно-функціональні зміни в первинній культурі клітин щитоподібної залози (ЩЗ) новонароджених щурів, опромінені *in utero*, унаслідок надходження радіоізоотопу ¹³¹I в різні терміни гестації.

Матеріали і методи. Експериментальну модель опромінення тварин ¹³¹I розроблено разом із співробітниками відділу радіобіології та радіоекології Інституту ядерних досліджень НАН України. Для створення експериментальної моделі опромінення *in utero* було залучено 12 вагітних самок щурів лінії Вістар із початковою масою (200±15) г, яким на 12-ту, 13-ту та 14-ту доби гестації вводили одноразово перорально через зонд розчин Na¹³¹I у дистильованій воді (27,35 кБк на тварину). Тварин утримували у стандартних умовах віварію. Середньодобове споживання стабільного йоду з кормом становило 13–15 мкг/добу на тварину. Дослідження виконано відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Закону України № 3447 IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" (2014 р.)

Результати досліджень та їх обговорення. Досліджено структурно-функціональні зміни в первинній культурі клітин ЩЗ новонароджених щурів, надано оцінку цитотоксичності та мутагенності внутрішньоутробного впливу ¹³¹I з активністю 27,35 кБк на вагітну самку внаслідок надходження радіоізоотопу в різні терміни гестації, а саме на 12-ту, 13-ту та 14-ти доби, що формувало дозу на ЩЗ плода – (0,19±0,05), (0,37±0,06), (1,44±0,09) Гр відповідно.

Висновки. Надано порівняльну морфофункціональну характеристику первинної культури щитоподібної залози новонароджених щурів, отриманої в інтактних тварин при дії радіоізоотопу ¹³¹I у різні терміни гестації. Показано, що за умов надходження ¹³¹I *in utero* щитоподібна залоза зазнає змін на клітинному рівні (двоядерні клітини та клітини з мікроядрами, апоптоз та порушення диференціації фолікулів); наявність перснеподібних клітини є свідком нестабільності геному й ознакою неопластичної трансформації.

Ключові слова: щитоподібна залоза; ¹³¹I; пренатальне опромінення; культура клітин; мікроядра; апоптоз.

ВСТУП Унаслідок аварії на Чорнобильській АЕС (ЧАЕС) в атмосферу потрапило $7,3 \times 10^6$ Кі ($2,7 \times 10^{17}$ Бк) ізоотопів йоду [1]. Істотну роль у формуванні радіоіндукованих ефектів відігравав радіоізоотоп ¹³¹I, який склав 69 % від загальної дози радіонуклідного спектра аварійного викиду [2]. Вважають, що саме він є найнебезпечнішим радіонуклідом для здоров'я людини. Це пояснюється: 1) високим вмістом ¹³¹I серед уламків поділу (близько 3 %); 2) досить великим періодом напіврозпаду (8,04 доба), щоб нуклід поширився по великих площах, водночас досить малим, щоб забезпечити дуже високу питому активність ізоотопу – приблизно 4,5 ПБк/г; 3) високою летючістю; при будь-яких аваріях ядерних реакторів перш за все в атмосферу випаровуються інертні радіоактивні гази, потім – йод. Наприклад, при аварії на ЧАЕС у викиді з реактора 20 % складав йод, 10–13 % – цезій і всього 2–3 % інші елементи; 4) йод практично не утворює нерозчинних сполук; 5) йод є життєво важливим мікроелементом, і разом з тим елементом, концентрація якого в їжі й воді невелика, а тому будь-які живі організми виробили в процесі еволюції здатність накопичувати його; 6) у людському організмі велика частка йоду концентрується у ЩЗ, але його мало, порівняно з масою тіла (12–25 г), тому навіть відносно невелика кількість радіоактивного йоду, що надійшов в організм, призводить до високого локального опромінення ЩЗ [2–8].

Радіонуклід ¹³¹I характеризується переважним високоенергетичним бета-випромінюванням (606 кеВ; 90 %). Якщо поглинається невелика доза ¹³¹I, то він всмоктуєть-

ся у циркулюючу кров і концентрується у щитоподібній залозі, де починається руйнування клітин залози [3, 4]. Його властивості зумовлюють використовувати для лікування тиреотоксикозу (гіпертиреозу) та деяких типів раку ЩЗ [5, 6]. ¹³¹I є також високоенергетичним гамма-випромінювачем (364 кеВ; 10 %), який можна застосовувати для візуалізації у діагностиці [4, 7].

Отже, завдяки високій міграційній активності та біологічній доступності, ¹³¹I є одним із найнебезпечніших радіонуклідів при внутрішньому опроміненні [3, 4, 7].

Організм людини особливо чутливий до впливу опромінення через інкорпоровані радіоізотопи йоду на ранніх етапах онтогенезу (пренатальному і ранньому постнатальному) [9], критичним вважають період між 9–40-ю добами після зачаття [10]. Серед постраждалих, які найбільшою мірою зазнали впливу радіоактивного ¹³¹I, найбільш уразливими щодо віддалених медичних наслідків виявилися не тільки особи, опромінені у дитячому та підлітковому віці, а й опромінені *in utero* в I та III триместрах гестації [11].

Однак існують статистично невизначені дані щодо ризику раку ЩЗ унаслідок опромінення *in utero*. Дослідження, проведене приблизно через 20 років після аварії, показує, що при внутрішньоутробному впливі радіоіоду на рівні доз, пов'язаних із Чорнобильською катастрофою, може збільшитися ризик раку ЩЗ. Результати клінічних досліджень із визначення ефектів унаслідок дії радіаційних та нерадіаційних чинників *in utero* встановили, що хроніч-

ну соматичну патологію вірогідно частіше спостерігали при опроміненні ЩЗ плода понад 0,36 Гр, тенденцію до порушень фізичного розвитку – в діапазоні доз 0,36–0,75 Гр, проте тому статистично значущими вони були в діапазоні доз 0,75–1,0 Гр, і найвираженіший дисгармонійний розвиток спостерігали за дози понад 1,0 Гр [12–14].

Негативні наслідки застосування ^{131}I у вагітних із діагностичною та лікувальною метою склали підґрунтя висновку щодо його небезпечності для ембріона і плода. Радіоїодотерапія під час вагітності абсолютно протипоказана.

Метою дослідження було вивчити структурно-функціональні зміни в первинній культурі клітин щитоподібної залози новонароджених щурів, опромінених *in utero*, унаслідок надходження радіоізотопу ^{131}I в різні терміни гестації.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Експериментальну модель опромінення тварин ^{131}I розроблено разом із співробітниками відділу радіобіології та радіоекології Інституту ядерних досліджень НАН України [15, 16]. Для створення експериментальної моделі опромінення *in utero* було залучено 12 вагітних самок щурів лінії Вістар із початковою масою (200±15) г, яким на 12-ту, 13-ту та 14-ту доби гестації вводили одноразово перорально через зонд розчин Na^{131}I у дистильованій воді (27,35 кБк на тварину). Доза на ЩЗ самки, розрахована згідно з розробленим способом, становила 5,0 Гр, доза у ЩЗ плода була: у самки, опроміненої на 12-ту добу гестації, – 0,19 Гр; у самки, опроміненої на 13-ту добу гестації – 0,37 Гр; у самки, опроміненої на 14-ту добу гестації – 1,44 Гр.

Тварин утримували у стандартних умовах віварію. Середньодобове споживання стабільного йоду з кормом становило 13–15 мкг/добу на тварину. Дослідження виконано відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.), Закону України № 3447 IV “Про захист тварин від жорстокого поводження” (2014 р.) [17, 18].

Вилучали ЩЗ у новонароджених щурів в асептичних умовах з урахуванням відомих методів отримання органотипних культур клітин ЩЗ тварин [19, 20].

Потім ці часточки переносили в стерильну чашку Петрі та заливали розчином Хенкса з антибіотиками, далі – у посуд для дезагрегації, яку проводили 0,25 % розчином трипсину (Gibco) упродовж 30–40 хв. Суспензію клітин відбирали в пробірки, центрифугували 10 хв при 1500 об./хв. Супернатант зливали, а осад ресуспендували в середовищі RPMI-1640 (Gibco). Операцію повторювали 3–5 разів. Увесь об’єм суспензії клітин центрифугували, осад ресуспендували в поживному середовищі складу: RPMI-1640 (Gibco) – 80 %, сироватки крові телят (Gibco) – 20 % і в кількості 50 тис. клітин/мл розсівали в пляшечки, що містили покривні скельця площею 9 мм × 18 мм та культивували впродовж 6–8 діб. Цитологічні дослідження проводили згідно з методиками, які описав Л. П. Дьяконов, 2009 [21]. На 6-ту добу культивування препарати фіксували у 70° етанолі, відмивали проточною водою і забарвлювали гематоксиліном та еозином. Під оптичним мікроскопом “Axioscop” (WestGermany) при збільшенні у 200; 400 та 1000 разів аналізували структурно-морфологічний стан культури клітин, підраховували їх загальну кількість, а також мітозів і двоядерних (з мікроядрами) та апоптотичних клітин. Мітотичний індекс та індекс двоядерних клітин розраховували на 1000 клітин (%). Мікрофотографії отримували

при допомозі цифрової камери DIGITAL CAMERA for Microscope ScienceLab DCM 320 (USB 2.0), Resolution 3.5 Mpixels. У тих же культурах клітин, в яких досліджували проліферативну та мітотичну активності, визначали кількість апоптотичних клітин на протоковому цитофлюориметрі FACStarPlus фірми “BectonDickinson” (США) [22]. Для цього клітини, які залишились на дні флакона після відбору покривного скла, промивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР), 10 хв витримували у розчині Версену для відкріплення їх від скла, потім заміщували його ЗФР, ресуспендували і 1 мл суспензії клітин центрифугували у ЗФР (1500 об./хв протягом 5 хв). Супернатант зливали. Процедура відмивання повторювали 3 рази. Потім до осаду в пробірку додавали 1 мл розчину пропідію йодиду (5 мг PI, 0,1 % цитрату Na та 0,1 % Triton X-100) та інкубували протягом 1 год при температурі 4 °С. Контролювали за рівнем апоптозу шляхом підрахунку кількості апоптотичних клітин на забарвлених препаратах.

Експериментальні дані обробляли за загальноприйнятими методами з використанням t-критерію Стьюдента та за допомогою пакетів прикладних програм Microsoft Excel і Biostat [23].

При виконанні експериментальних досліджень було проаналізовано 187 препаратів культур клітин.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Загальновідомо, що тканина ЩЗ складається із клітин двох різних видів: фолікулярних і парафолікулярних. Останніх значно менше, вони розпорошені між фолікулами і відрізняються від основної маси тиреоїдних (фолікулярних) клітин походженням, функцією і механізмами регуляції. Фолікулярні клітини формують у залозі численні мікроскопічні фолікули, кожен з яких складається з центральної порожнини, заповненої колоїдом і оточений одним шаром кубоподібних епітеліальних клітин. Фолікулярні клітини звернені своїми верхівками у просвіт фолікула (колоїдну порожнину), а своїми основами прилягають до базальної мембрани капілярів. Величина цих клітин залежить не тільки від активності залози, але і від вживання йоду. В їх цитоплазмі виявляють безліч крапель колоїду діаметром до 2 мкм. Ядра зазвичай розташовані ближче до основи клітин. Фолікули ЩЗ зібрані в конгломерати, оточені сіткою кровоносних судин, клітинами і волокнами сполучної тканини, плазматичними й опасистими клітинами. Ці конгломерати утворюють часточки різного розміру.

Аналіз цитологічних препаратів первинної культури клітин ЩЗ новонароджених щурів у контролі показав, що клітини, в основному, епітеліоподібного типу різних розмірів та форм: округлої, циліндричної і полігональної (рис. 1, А–Д). Ядра великі, овальної та округлої форм, містять 1–2 ядерця. Цитоплазма неоднорідна, більшість клітин мала вакуолі різного розміру. Рідко було клітини з двома ядрами (рис. 1, Е). Клітин з мікроядрами не відмічено.

Спостерігали формування рівномірного суцільного моношару клітин з округлими ядрами (парафолікулярні) та напластування однотипних клітин, в яких ядра інтенсивніше забарвлені (рис. 1, А–В, Д). Ядра містили 1–2, рідше 3 ядерця. Ці структури нагадували “фолікули” тканин ЩЗ. На рис. 1, В та Д показано функціональні фолікули, порожнини яких заповнені колоїдом, а кубоподібні епітеліоподібні клітини прилягають до своєїрідної “базальної мембрани” (рис. 1, Г). В деяких місцях моношару спостерігали в міжклітинному просторі великі еозинофільні гранули колоїду, які прилягали до поверхні клітин, що теж мали в цитоплазмі вакуолі з колоїдом. На

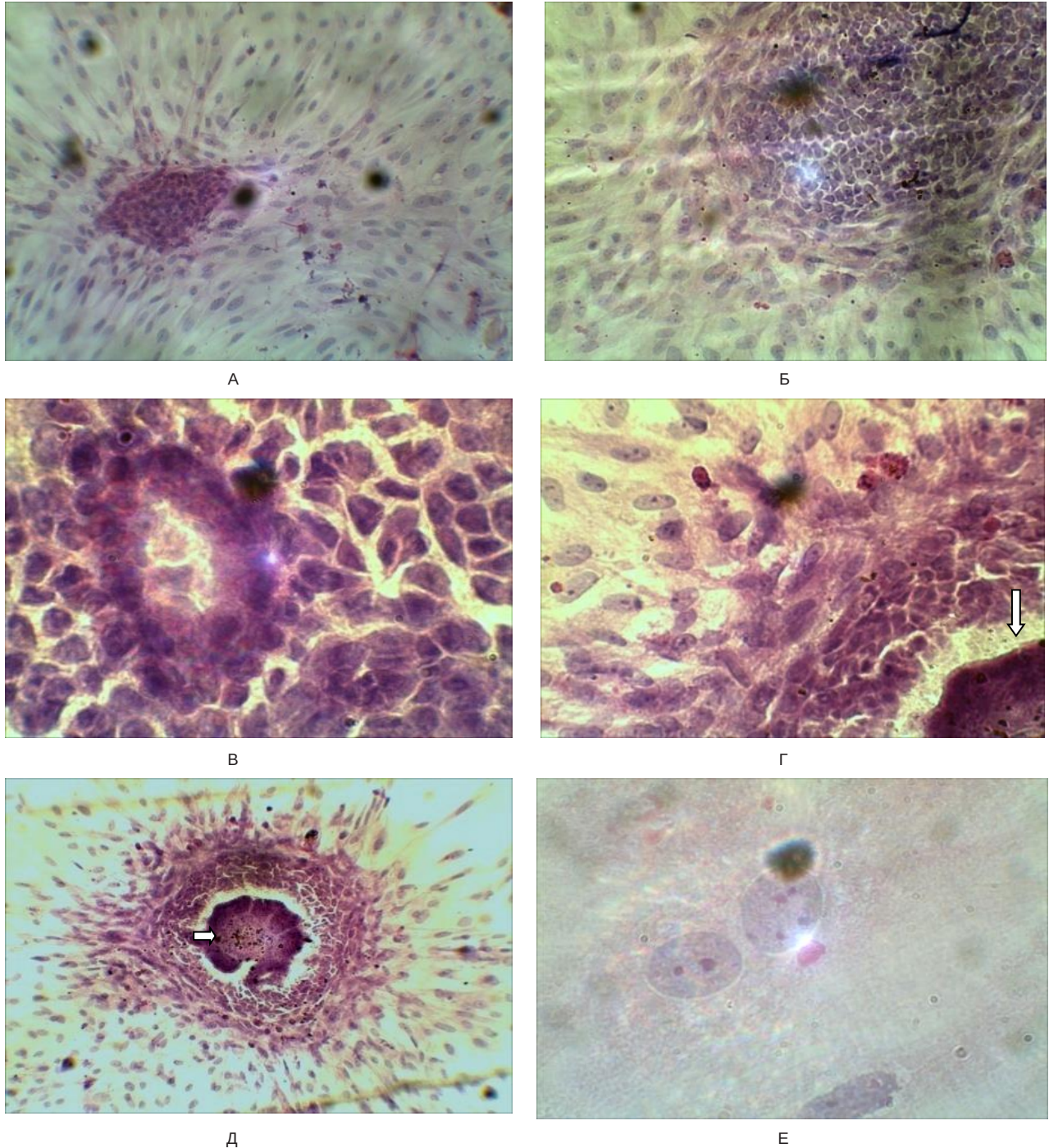


Рис. 1. Структура первинної культури клітин щитоподібної залози новонароджених неопромінених щурів (контроль) на 4-ту (А) та 6-ту (Б-Е) доби культивування: А – утворення фолікула на початковому етапі культивування (2–4 доби), зб. 200; Б – розростання фолікула і утворення 3D-структури, зб. 200; В, Г, Д – у внутрішньому просторі фолікула помітний колоїд, що виробляється тироцитами і який може бути гормонами (білі стрілки); В – зб. 400; Г – зб. 1000; Д – зб. 200; Е – двоядерні клітини, які рідко бувають в інтактних культурах клітин ЩЗ, зб. 1000. Забарвлення гематоксиліном та еозинном.

нашу думку, це тироцити – продуценти гормону, які не об'єднались у фолікули.

Таким чином, отримана первинна культура тироцитів новонароджених щурів мала ознаки тканини ЩЗ: утворювала фолікулоподібні структури, які продукували гормони.

Дані літератури свідчать, що при опроміненні ЩЗ за рахунок інкорпорованого радіонукліду ^{131}I у невеликих дозах можливе збереження їх структури та функції [24].

При значних дозах клітини втрачають здатність до розмноження і гинуть, що проявиться ознаками недостатності функції ЩЗ. Якщо уражені клітини не втрачають здатність до поділу, вони можуть бути причиною виникнення пухлин ЩЗ. Можливий розвиток аутоімунного тиреоїдиту. Клінічним проявам означеної патології можуть передувати лабораторні ознаки змін імунного стану. Загальновідомо, що ЩЗ належить до органів, де пролі-

ферація відбувається повільно, тому радіаційні ефекти в ній можуть проявитися через багато років.

Було також встановлено, що в епітелії ЩЗ індукувалися генотоксичні uszkodження, що проявлялись в посиленому формуванні клітин із мікроядрами. Вважали, що такі зміни в соматичних клітинах можуть призводити до генетичної трансформації і розвитку злоякісних новоутворень, а також до нестабільності геномного апарату, соматичних мутацій і, як наслідок, до зниження ефективності репарації опромінених клітин, заміни їх сполучною тканиною, порушень фізіологічних внутрішньосистемних зв'язків і рецепторної взаємодії гормонів, що сприяло формуванню тканинної резистентності до їх дії, нездатності синтезувати адекватні кількості гормонів. Аналогічні ефекти отримали і в клітинах ЩЗ *in vitro*.

Аналіз цитологічних препаратів показав, що у первинних культурах клітин ЩЗ новонароджених щурів, опромінених ^{131}I на 12-ту добу гестації, спостерігали істотне зменшення загальної кількості клітин у моношарі (рис. 2). Загалом, культура клітин не утворювала цілісної моношарової структури. Спостерігали ділянки без клітин, або з їх невеликою кількістю. Ядра були зміщені до периферії цитоплазми і містили 1–2 ядерця, цитоплазма була дрібнозерниста, вакуолізована. Нашарування епітеліо-

подібних клітин, що були схожі на фолікули та містили колоїд, спостерігали дуже рідко і були невеликих розмірів. Водночас, значно більше було окремо розташованих клітин з прилеглими гранулами колоїду (рис. 2, А). Особливу увагу привернула поява в культурах клітин значної їх кількості на різних стадіях апоптозу, двоядерних клітин та клітин з мікроядрами (рис. 2, Б, В). Досить часто були "перснеподібні" клітини, які є маркером неопластичної трансформації (рис. 2, Г). У їх гістології називають клітини з великою вакуолею. Ці клітини є злоякісними і, як правило, субстратом карцином. Найчастіше їх виявляють при раку шлунку, проте вони можуть виникати в будь-якому типі тканин.

Як свідчать результати дослідження, зображені на рисунку 3, щільність клітинної популяції в культурі клітин ЩЗ новонароджених щурів, опромінених *in utero* на 12 добу гестації, складала тільки 10 % від контролю, мітична активність у культурі тироцитів зменшилась у 5 разів, водночас, кількість двоядерних та триядерних клітин і клітин з мікроядрами зросла у 17 разів порівняно з контрольними культурами.

Аналіз цитологічних препаратів культур клітин ЩЗ новонароджених щурів, опромінених *in utero* ^{131}I на 13-ту добу гестації (рис. 4), виявив аналогічні морфологічні й

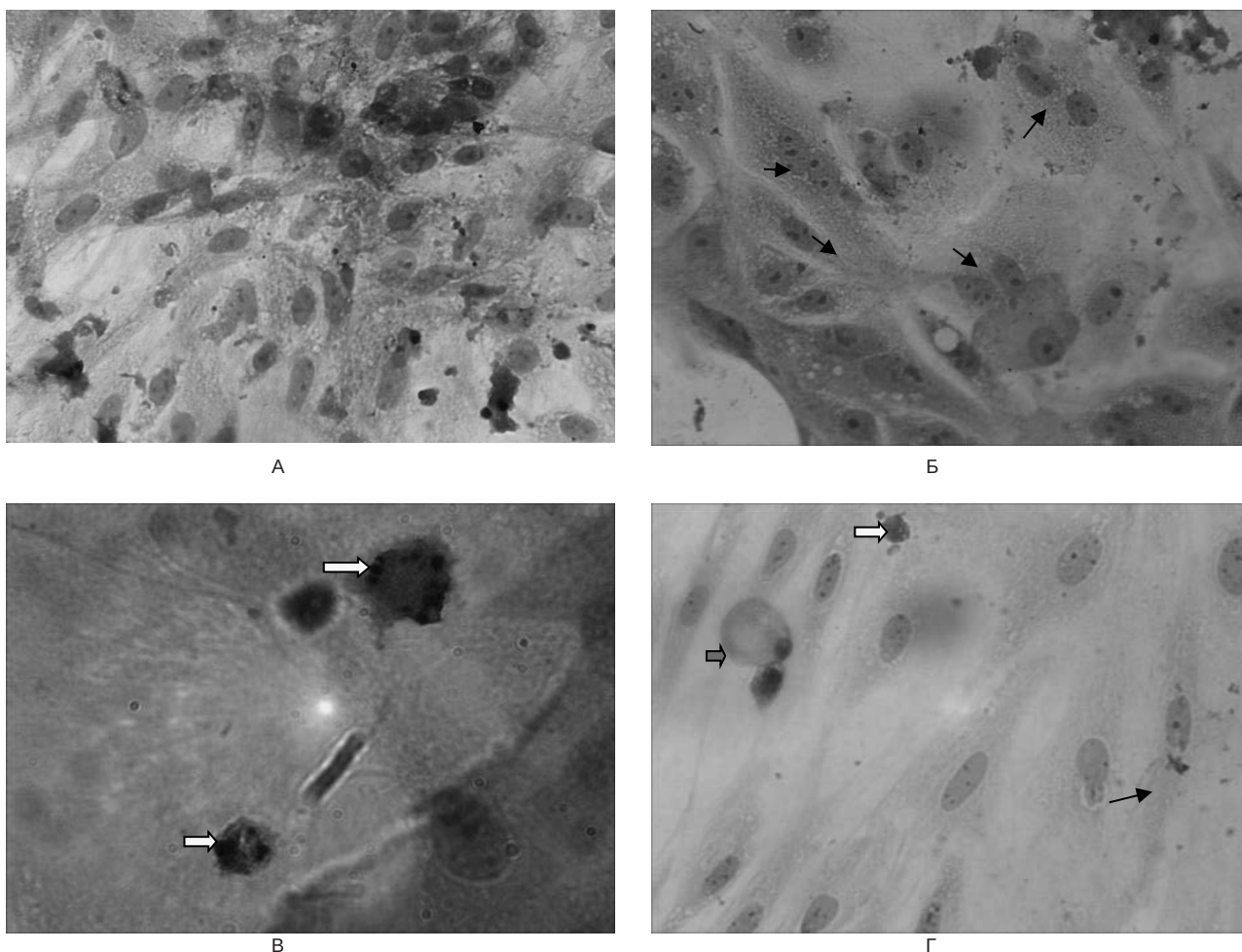


Рис. 2. Структура первинної культури клітин щитоподібної залози новонароджених щурів, опромінених ^{131}I на 12-ту добу гестації: А – клітини різної форми з дрібновакуолізованою цитоплазмою, ядра в основному овальні, мали 1–2 ядерця, спостерігали формування дрібних фолікулів з колоїдом, зб. 400; Б – двоядерні клітини з мікроядрами (чорні стрілки), зб. 400; В – значна кількість апоптотичних клітин (білі стрілки), зб. 1000; Г – перснеподібні клітини (сірі стрілки), зб. 1000. Забарвлення гематоксином та еозином.

структурно-функціональні зміни в культурі тироцитів як і в культурах, опромінених на 12-ту добу гестації: дрібні утворення, подібні до фолікулів із колоїдом у клітинах та

міжклітинному просторі (рис. 4, А), значна кількість дво- та триядерних клітин й клітин з мікроядрами (див. рис. 3, В), а також апоптотичних та перснеподібних клітин (рис. 4,

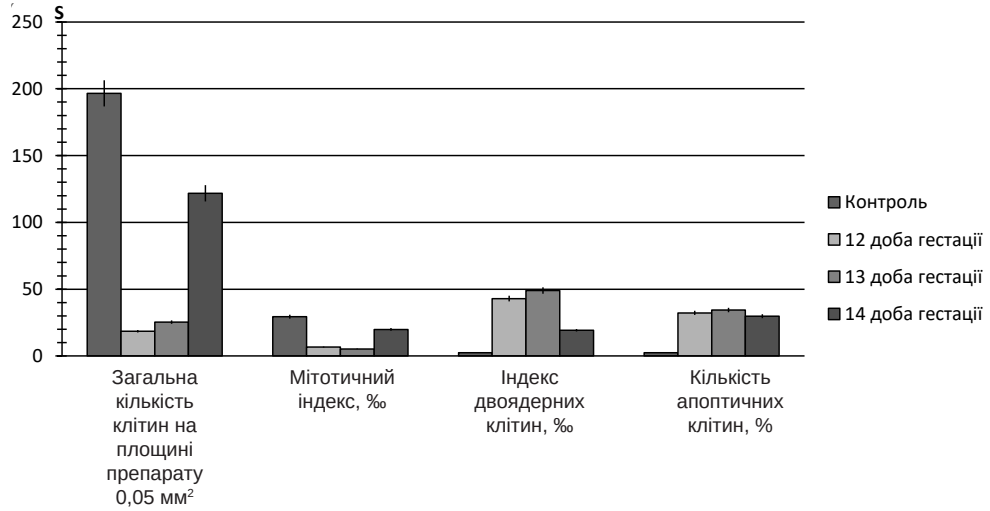


Рис. 3. Морфофункціональні показники у первинній культурі клітин щитоподібної залози новонароджених щурів, опромінених ¹³¹I на 12-ту, 13-ту та 14-ту доби гестації, на 6-ту добу культивування.

Примітка. * – різниця статистично значуща порівняно з контролем (p<0,05). Позначення на осі ординат S – числові значення показників.

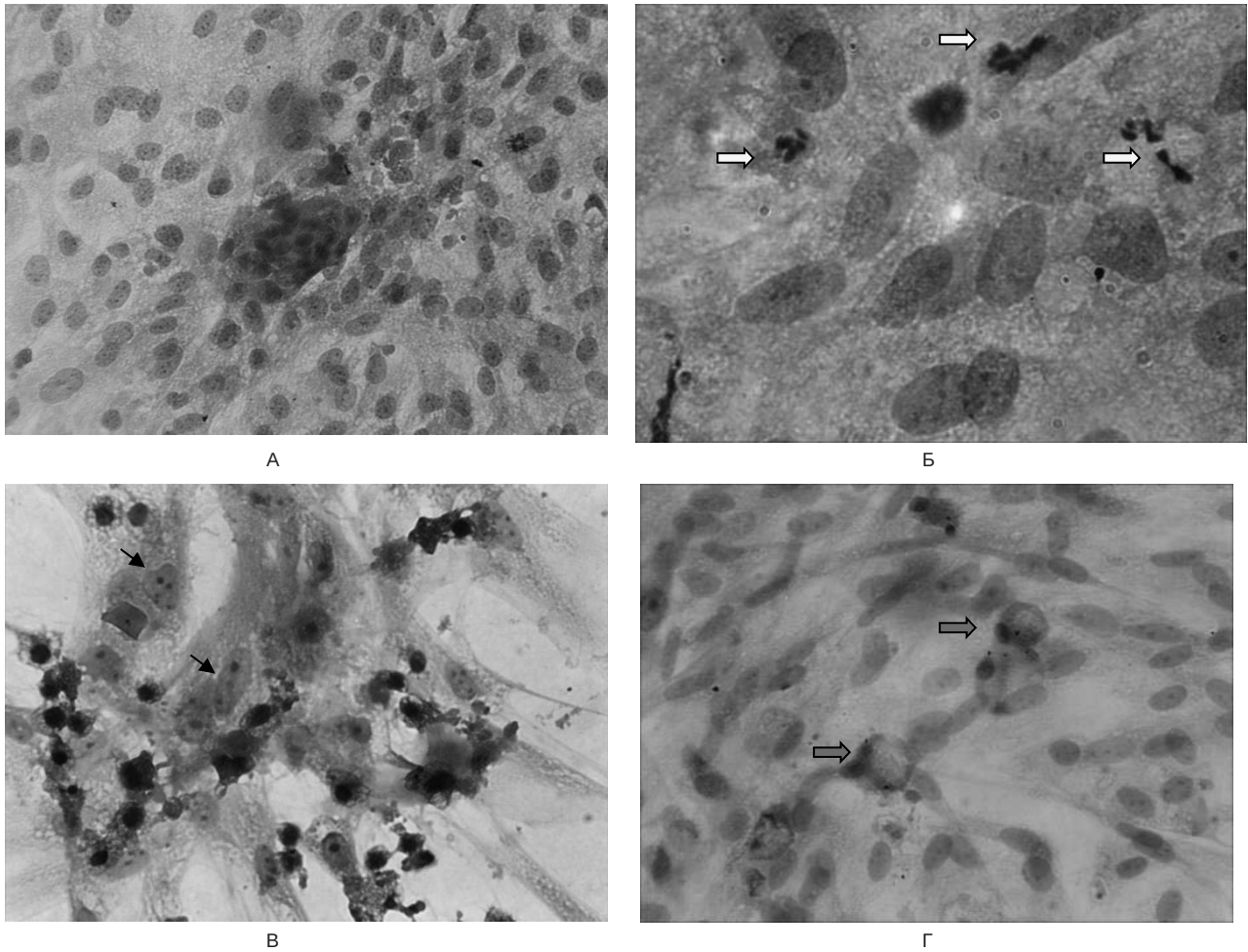


Рис. 4. Структура первинної культури клітин щитоподібної залози новонароджених щурів, опромінених ¹³¹I на 13-ту добу гестації: А – формування фолікулів нетипової форми і структури, зб. 400; Б – значна кількість апоптотичних клітин (білі стрілки), зб. 1000; В – двоядерні клітини з мікроядрами (чорні стрілки), зб. 400; Г – перснеподібні клітини (сірі стрілки), зб. 1000. Забарвлення гематоксилином та еозином.

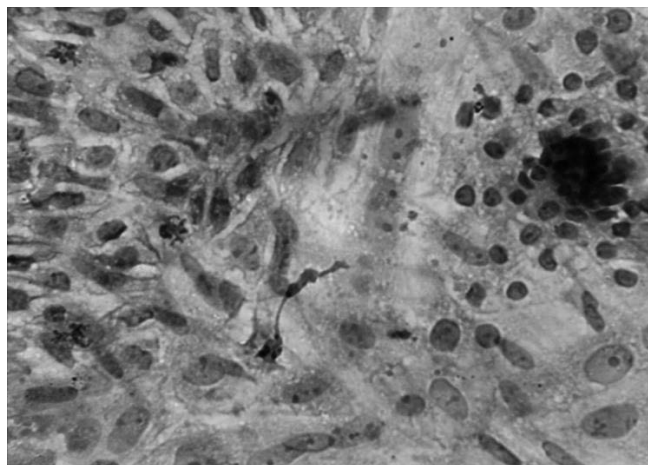
В, Г). Кількісні показники зазначених змін відносно контролю такі (рис. 3): зменшення щільності клітинної популяції до 13 %, мітотичної активності – до 18 %, вміст двоядерних клітин і клітин з мікроядрами збільшився у 20 разів, апоптотичних клітин – у 14 разів. На рисунку 4, Г чітко видно перснеподібні клітини.

Відомо, що на 14-ту добу гестації ЩЗ плода щурів починає функціонувати, тобто клітини ЩЗ диференційовані й утворили фолікулярну структуру, клітини якої здатні метаболізувати ендogenousний йод і продукувати гормони.

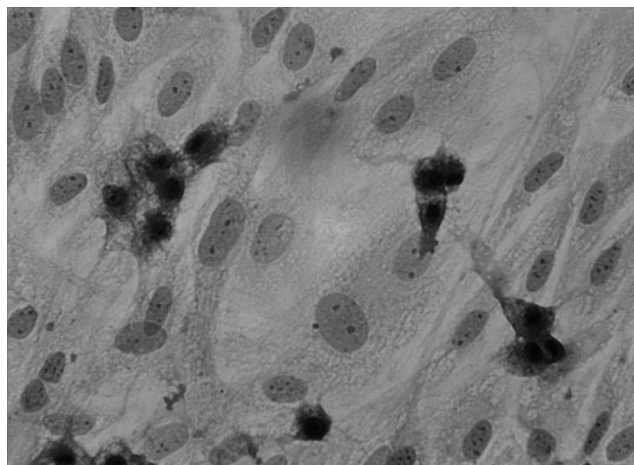
Вивчення препаратів культур клітин ЩЗ новонароджених щурів в експерименті з внутрішньоутробним опроміненням ембріонів ^{131}I на 14 добу гестації, коли доза на плід становила $(1,44 \pm 0,10)$ Гр, показало (рис. 5), що за таких умов надходження ^{131}I спостерігали деяку подібність структури моношару клітин із контролем, а саме: наявність клітин різної форми, розмірів та розміщення ядер клітин, кількості ядерцець, наявність мітотичних клітин. Спостерігали формування рівномірного суцільного моношару клітин із нагласуванням інтенсивніше забарвлених однотипних епітеліоподібних клітин (рис. 5, А–В), що нагадували “фолікули” тканин ЩЗ, які проте були атипової форми, містили колоїд у міжклітинному просторі. Щодо

кількісних характеристик таких культур тироцитів (рис. 3) можна зауважити, що щільність клітинної популяції становила 62 % відносно контролю, мітотична активність зросла, порівняно з опроміненням, на 12-ту та 13-ту доби гестації і становила 67 % відносно контролю. Значно менше було дво- та триядерних клітин і клітин із мікроядрами: 8 % від контролю. Водночас, кількість апоптотичних клітин була на рівні кількості в культурах клітин за опромінення плода на 12-ту й 13-ту доби гестації і становила 12 % відносно контрольних значень. Привертає увагу наявність у цих культурах клітин перснеподібних клітин, що опосередковано може свідчити про генетичну нестабільність і схильність до трансформації в культурі тироцитів про опромінення плода на 14-ту добу гестації.

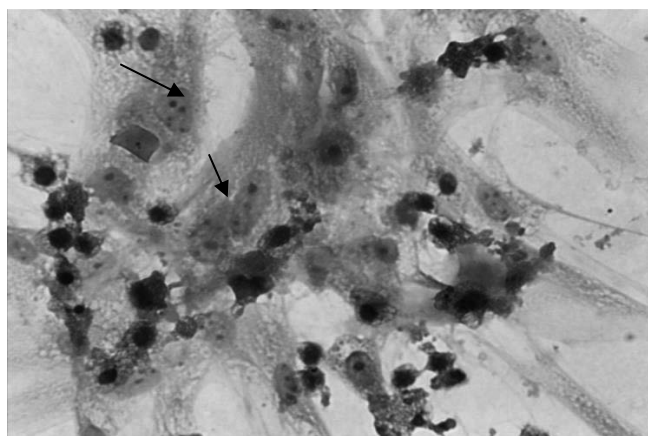
Відомо, що популяція фолікулярних тироцитів інтактних дорослих щурів є переважно диплоїдною, сумарна кількість поліплоїдних ($4c$ і $2c \times 2$) клітин становить не більше 4,4 % [25]. Спонтанний рівень вмісту клітин з мікроядрами дорівнює 0,2 %. Мікроядерний тест на моделі фолікулярних тироцитів в досліді *in vivo*, попередньо стимульованих до розмноження, є інформативним методом оцінки інтенсивності впливу генотоксичних агентів на паренхіму щитоподібної залози, що дозволяє виявляти кумулятивний ефект субпорогових доз мутагену.



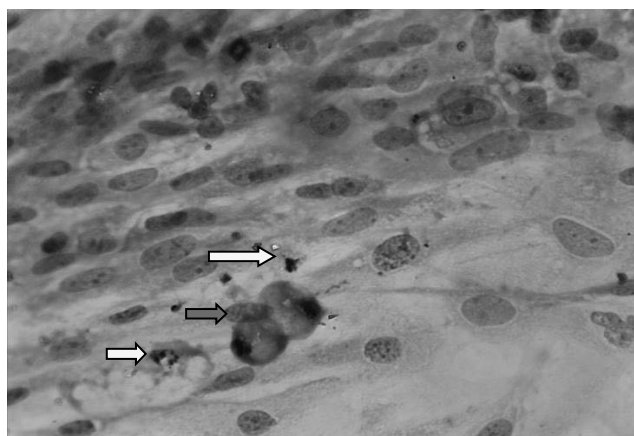
А



Б



В



Г

Рис. 5. Структура первинної культури клітин щитоподібної залози новонароджених щурів, опроміненіх ^{131}I на 14-ту добу гестації, на 6-у добу культивування: А – утворення фолікулів нетипової форми з нашаруванням, зб. 200; Б, В – спостерігають двоядерні клітини та клітини з мікроядрами (чорна стрілка), зб. 400; Г – апоптотичні (біла стрілка) та перснеподібні (сіра стрілка) клітини, зб. 400. Забарвлення гематоксилином та еозином.

Було показано, що у тварин, які отримували метилнітрозосечовину, всі тироцити з мікроядрами є тетраплоїдними. Це свідчить, що процес поділу тироцитів порушується на стадії метафази, в результаті чого подалше проходження клітин по циклу відбувається за механізмом ацитокинетичного (поліплоїдизуючого) мітозу [26, 27].

Таким чином, аналіз та кількісна характеристика морфофункціональних показників у первинній культурі клітин щитоподібної залози новонароджених щурів, опроміненних *in utero* ¹³¹I у різні терміни гестації, показала, що під впливом опромінення ЩЗ зазнає деструктивних змін на клітинному рівні, особливо це стосується малодиференційованих проліферуючих клітин та клітин на початкових стадіях диференціації, що призводить до порушення її функцій. Утворення в культурі клітин ЩЗ перснеподібних клітин свідчить про істотні генотоксичні порушення і вказує на нестабільність геному в нащадків тварин, опроміненних *in utero* ¹³¹I.

Грунтуючись на даних наукової літератури [25–28] та власних експериментальних дослідженнях, можна вважати, що подібні зміни в соматичних клітинах та поява в культурі клітин щитоподібної залози новонароджених щурів перснеподібних клітин, що є ознакою малігнізації, можуть призводити до генетичної трансформації і розвитку злоякісних новоутворень, а також до нестабільності геномного апарату, соматичних мутацій і, як наслідок, до зниження ефективності репарації опроміненних клітин, заміни їх сполучною тканиною, порушень фізіологічних внутрішньосистемних зв'язків і рецепторної взаємодії гормонів, що за літературними даними буде сприяти формуванню тканинної резистентності до їх дії, нездатності синтезувати адекватну кількість гормонів.

ВИСНОВКИ 1. Розроблено та апробовано спосіб отримання первинної культури клітин ЩЗ залози новонароджених щурів. Досліджено структурні та функціональні характеристики первинної культури тироцитів новонароджених щурів у контролі (без опромінення).

2. Вивчено структурно-функціональні зміни в первинній культурі клітин ЩЗ новонароджених щурів, надано оцінку цитотоксичності та мутагенності внутрішньоутробного впливу ¹³¹I з активністю 27,35 кБк на вагітну самку внаслідок надходження радіоізотопу в різні терміни гестації, а саме, на 12-ту, 13-ту та 14-ту доби, що формува-

ло дозу на ЩЗ плода (0,19±0,05), (0,37±0,06), (1,44±0,09) Гр відповідно.

3. У первинних культурах клітин ЩЗ новонароджених щурів, опроміненних ¹³¹I на 12-ту добу гестації, щільність клітинної популяції складала тільки 10 % від контролю, мітотична активність у культурі тироцитів зменшилась у 5 разів, водночас, кількість двоядерних та троядерних клітин і клітин з мікроядрами була у 17 разів вища порівняно з контролем. Наявні перснеподібні клітини, які є маркером неопластичної трансформації. Ці клітини є злоякісними і, як правило, субстратом карциноми.

4. У цитологічних препаратах культур клітин ЩЗ новонароджених щурів, опроміненних *in utero* унаслідок надходження ¹³¹I на 13-ту добу гестації виявлено аналогічні морфологічні і структурно-функціональні зміни в культурі тироцитів як і в культурах, опроміненних на 12-ту добу гестації. Кількісні показники зазначених змін відносно контролю характеризувалися зменшенням щільності клітинної популяції до 13 %, мітотичної активності – до 18 %; вміст двоядерних клітин і клітин з мікроядрами – збільшенням у 20 разів, апоптотичних клітин – у 14 разів, наявністю перснеподібних клітин.

5. За умов надходження ¹³¹I на 14-ту добу гестації спостерігали деяку подібність структури моношару клітин із контролем. Щільність клітинної популяції становила 62 % відносно контролю, мітотична активність була вищою, порівняно з опроміненням на 12-ту та 13-ту доби гестації, і становила 67 % відносно контролю. Значно менше було дво- та троядерних клітин і клітин з мікроядрами: 8 % від контролю. Водночас, кількість апоптотичних клітин була на рівні кількості в культурах клітин за опромінення плода на 12-ту й 13-ту доби гестації і становила 12 % відносно контрольних значень. Відзначено наявність у цих культурах клітин перснеподібних клітин, що опосередковано може свідчити про генетичну нестабільність і схильність до трансформації в культурі тироцитів.

Перспективи подальших досліджень У подальшому планується дослідження структурних та морфофункціональних змін у культурі тироцитів новонароджених щурів, опроміненних *in utero* зовнішнім рентгенівським випромінюванням в аналогічних дозах, і порівняти отримані радіобіологічні ефекти.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барьяхтар В. Г. Оценка масштабов катастрофы. Чернобыльская катастрофа / В. Г. Барьяхтар. – К. : Наукова думка, 1995. – С. 19–21.
2. Ukrainian thyroid doses after the Chernobyl accident / I. A. Likhtarev, N. K. Shandala, G. M. Gulko [et al.] // Health Physics. – 1993. – Vol. 64, No. 6. – P. 594–599.
3. Радиоактивный йод в проблеме радиационной безопасности / под ред. Л. А. Ильина. – М. : Атомиздат, 1972. – 272 с.
4. Москалев Ю. И. Отдаленные последствия ионизирующих излучений / Ю. И. Москалев. – М. : Медицина, 1991. – 464 с.
5. Радиойодтерапия рака щитовидной железы / П. И. Гарбузов, Б. Я. Дроздовский, А. А. Родичев [и др.] // Радиационная физика и биологические эффекты радиойода. – Обнинск, 2007. – С. 124–128.
6. Haugen B. Radioactive iodine treatment for hyperthyroidism / B. Haugen, J. V. Hennessey, L. Wartofsky // J. Clin. Endocrinol. Metabolism. – 2012. – Vol. 97 (4). – P. 29.
7. Лягинская А. М. Короткоживущие изотопы йода (131–135) в условиях радиационной аварии: особенности формирования

и распределения поглощенных доз в щитовидной железе, биологические эффекты / А. М. Лягинская, В. А. Осипов // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2005. – Т. 50, № 2. – С. 18–26.

8. Тихомиров Ф. А. Радиозекология йода / Ф. А. Тихомиров. – М. : Атомиздат, 1983. – 88 с.

9. World Health Organization. Health Effects of the Chernobyl Accident and Special Health Care Programmes. Report of the UN Chernobyl Forum Expert Group "Health" (EGH). Eds. B. Bennett, M. Repacholi, Zh. Carr. Geneva : World Health Organization. 2006. 160 p.

10. Krajewski D. A. Thyroid disorders in pregnancy / D. A. Krajewski, K. D. Burman // Endocrinol. Metab. Clin. North. Am. – 2011. – Vol. 40 (4). – P. 739–763. doi: 10.1016/j.ecl.2011.08.004.

11. Glinoe D. Pregnancy and iodine / D. Glinoe // Thyroid. – 2001. – Vol. 11, No. 5. – P. 471–481.

12. Connelly K. J. Congenital hypothyroidism caused by excess prenatal maternal iodine ingestion / K. J. Connelly // J. Pediatr. – 2012. – Vol. 161. – P. 760–762.

13. Morreale de Escobar G. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? / G. Morreale de Escobar, M. J. Obregón, F. Escobar del Rey // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 85. – P. 3975–3987.
14. Hershman J. M. Physiological and pathological aspects of the effect of human chorionic gonadotropin on the thyroid. *Best Practice & Research / J. M. Hershman // Clinical Endocrinology & Metabolism.* – 2004. – Vol. 18, No. 2. – P. 249–253.
15. Дослідження кінетики ^{131}I в організмі щурів за одноразового надходження / І. П. Дрозд, А. І. Липська, Л. К. Бездробна [та ін.] // *Ядерна фізика та енергетика.* – 2012. – Т. 13, № 3. – С. 283–288.
16. Пат. № 113045 UA Спосіб визначення поглиненої дози від інкорпорованого ^{131}I на щитоподібну залозу плоду лабораторних щурів / І. П. Дрозд, А. І. Липська, О. А. Сова, Є. М. Прохорова, О. А. Бойко, В. В. Талько; Інститут ядерних досліджень НАН України; ДУ “Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України”. Опубл. 10.01.2017, Бюл. № 1.
17. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України від 21.02.2006 № 3447-IV. – Відомості Верховної Ради України. – 2006. – № 27. – С. 230.
18. European convention for protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe. (18.03.1986). Strasburg, 1986. 52 p.
19. Волкова Н. О. Кріоконсервовані органи культури щитовидної залози при ало- та ксенотрансплантації: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук. / Н. О. Волкова. – Харків, 2004. – 20 с.
20. Білявська С. Б. Корекція експериментального гіпотиреозу шляхом комбінованої трансплантації: органотипових культур: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / С. Б. Білявська. – Харків, 2008. – 20 с.
21. Дьяконов Л. П. Животная клетка в культуре: методы и применение в биотехнологии / под ред. Л. П. Дьяконова. – М.: Спутник+, 2009. – 656 с.
22. Дослідження апоптозу у радіаційній імунології: метод. реком. – К.: ДУ “Науковий центр радіаційної медицини АМН України”. – 2010. – 27 с.
23. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач. – К.: МОРИОН, 2001. – 408 с.
24. Павлов А. В. Использование микроядерного теста для выявления генотоксических повреждений щитовидной железы / А. В. Павлов, М. А. Гансбургский, А. Н. Гансбургский // *Бюлл. Экспер. биол.* – 2006. – Т. 141, № 1. – С. 99–102.
25. Раскоша О. В. Морфологическое состояние щитовидной железы полевок-экономок после воздействия малых доз ионизирующего излучения в природных условиях и в эксперименте / О. В. Раскоша, О. В. Ермакова // *Матер. Междунар. конф. “Экология северных территорий России. Проблемы, прогноз ситуаций, пути развития, решения”.* – Архангельск, 2002. – Т. 2. – С. 199–203.
26. Ермакова О. В. Цитогенетические эффекты в фолликулярном эпителии щитовидной железы при длительном воздействии γ -излучения в малых дозах / О. В. Ермакова, А. В. Павлов, Т. В. Кораблева // *Радиац. биология. Радиоэкология.* – 2008. – Т. 48, № 2. – С. 160–166.
27. Агаджанян А. В. Геномная нестабильность у детей, рожденных после аварии на ЧАЭС (исследования in vitro и in vivo) / А. В. Агаджанян, И. И. Сусков // *Генетика.* – 2010. – Т. 46, № 6. – С. 834–843.
28. Гарькавцева Р. Ф. Генетические аспекты рака щитовидной железы / Р. Ф. Гарькавцева, Т. П. Казубская, И. Е. Лиснянский. – *Пробл. эндокринологии.* – 2002. – Т. 48, № 4. – С. 16–20.

Отримано 06.02.19

©О. А. Boyko¹, G. Y. Lavrenchuk¹, V. R. Gurando², A. I. Dovgalyuk³, I. M. Klishch³
National Scientific Center of Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine¹
Uzhhorod National University²
I. Horbachevsky Ternopil State Medical University³

MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN CELL CULTURES OF THYROID GLAND OF NEWBORN RATS IRRADIATED IN UTERO BY RADIO-IZOTOPES OF IODINE-131 IN VARIOUS TERMS OF GESTATION

SUMMARY. Human organism is especially sensitive to radiation exposure due to incorporated radioisotopes of iodine in the early stages of ontogenesis (prenatal and early postnatal). Period between the 9th and 40th days after conception is considered to be especially crucial. Among the affected contingents of the Chernobyl catastrophe, which were most exposed to radioactive ^{131}I , it was revealed that according to remote medical consequences the vulnerable individuals were not the only who irradiated in childhood and adolescence, but also those irradiated in utero in the first and third trimesters of the gestation.

The aim of the study – to find out the morphofunctional changes in the primary culture of the thyroid gland of newborn rats irradiated in utero by ^{131}I radioisotope in different gestational periods.

Materials and Methods. The experimental model of animal irradiation ^{131}I was developed together with the staff of the Department of Radiobiology and Radioecology of the Institute of Nuclear Research of the National Academy of Sciences of Ukraine. To create an experimental model of irradiation in utero, 12 pregnant females of the Wistar line rats with initial weight (200±15) g were injected with distilled water on 12th, 13th and 14th day of gestation, once orally through a probe. (27.35 kBq per animal). Animals were kept in a vivarium under standard conditions. The average daily consumption of stable iodine with food was 13-15 µg/day per animal. The study was conducted in accordance with the international principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for research and other scientific purposes (Strasbourg, 1986), the Law of Ukraine No. 3447 IV “On the Protection of Animals from Cruel Treatment” (2014).

Results and Discussion. Morphofunctional changes in the primary culture of thyroid cells of newborn rats were evaluated. Cytotoxicity and mutagenicity of intrauterine influence of ^{131}I with activity of 27.35 kBq per pregnant female as a result of the effect of radioisotope in different gestational periods on the 12th, 13th and the 14th day were established. The doses for the fetus thyroid gland were (0.19±0.05), (0.37±0.06), (1.44±0.09), respectively.

Conclusions. A comparative morphofunctional characteristic of the primary culture of the thyroid gland of the newborn rats obtained from intact animals and under the influence of ^{131}I radioisotope in different gestational periods was given. It was shown that the effect of ^{131}I in utero leads to the thyroid gland changes at the cellular level (binucleated cells and cells with micronuclei, apoptosis and disturbances of follicular formation). The presence of “ring-like” cells is an indicator of the genome instability and a sign of neoplastic transformation.

Key words: thyroid gland; ^{131}I ; prenatal irradiation; cell culture; micronucleus; apoptosis.

©А. А. Бойко¹, Г. И. Лавренчук¹, В. Р. Гурандо², А. И. Довгалюк³, И. Н. Клищ³
ГУ "Национальный научный центр радиационной медицины АМН Украины"¹
Ужгородский национальный университет²

ГБУЗ "Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского"³

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС, ОБЛУЧЕННЫХ IN UTERO РАДИОИЗОТОПАМИ ИОДА-131 В РАЗНЫЕ СРОКИ ГЕСТАЦИИ

Резюме. Организм человека особенно чувствителен к воздействию облучения за счет инкорпорированных радиоизотопов йода на ранних этапах онтогенеза (пренатальном и раннем постнатальном). Критическим считают период между 9–40-ми сутками после зачатия. Среди пострадавших Чернобыльской катастрофы, которые в наибольшей степени подверглись воздействию радиоактивного ¹³¹I, уязвимыми по отдаленных медицинских последствиях оказались не только облученные в детском и подростковом возрасте, но и облученные in utero в I и III триместрах гестации.

Цель исследования – изучить структурно-функциональные изменения в первичной культуре клеток щитовидной железы (ЩЖ) новорожденных крыс, облученных in utero вследствие поступления радиоизотопа ¹³¹I в различные сроки гестации.

Материалы и методы. Экспериментальную модель облучения животных ¹³¹I разработано вместе с сотрудниками отдела радиобиологии и радиоэкологии Института ядерных исследований НАН Украины. Для создания экспериментальной модели облучения in utero было привлечено 12 беременных самок крыс линии Вистар с исходной массой (200±15) г, которым на 12-и, 13-и и 14-и сутки гестации вводили однократно перорально через зонд раствор Na¹³¹I в дистиллированной воде (27,35 кБк на животное). Животных содержали в стандартных условиях вивария. Среднесуточное потребление стабильного йода с кормом составило 13–15 мкг/сутки на животное. Исследование выполнено в соответствии с международными принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей (Страсбург, 1986), Закона Украины № 3447 IV "О защите животных от жестокого обращения" (2014).

Результаты исследований и их обсуждение. Исследованы структурно-функциональные изменения в первичной культуре клеток щитовидной железы новорожденных крыс, дана оценка цитотоксичности и мутагенности внутриутробного воздействия ¹³¹I с активностью 27,35 кБк на беременную самку в результате поступления радиоизотопа в разные сроки гестации, а именно на 12-е, 13-е и 14-е сутки, что формировало дозу на ЩЖ плода (0,19±0,05), (0,37±0,06), (1,44±0,09) Гр соответственно.

Выводы. Представлена сравнительная морфофункциональная характеристика первичной культуры щитовидной железы новорожденных крыс, полученной из интактных животных после воздействия радиоизотопа ¹³¹I в разные сроки гестации. Показано, что в условиях поступления ¹³¹I in utero щитовидная железа претерпевает изменения на клеточном уровне (двухъядерные клетки и клетки с микроядрами, апоптоз и нарушения дифференциации фолликулов). Наличие перстневидных клеток является свидетельством нестабильности генома и признаком неопластической трансформации.

Ключевые слова: щитовидная железа; ¹³¹I; пренатальное облучение; культура клеток; микроядра; апоптоз.

Адреса для листування: Г. Й. Лавренчук, ДУ " Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України", вул. Мельникова, 53, Київ, 04050, Україна, e-mail: hl20071956@ukr.net