

# Особливості клітинного складу кісткового мозку щурів при гострому опроміненні та введенні S-гетерилмодифікованого цистеаміну

Н.Є. Узленкова<sup>1</sup>, Н.Г. Скоробогатова<sup>1</sup>, Н.М. Моїсєєва<sup>2</sup>, О.Л. Масленнікова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України, Харків;

<sup>2</sup> Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків;

e-mail: nuzlenkova@gmail.com

*Вивчали зміни клітинного складу кісткового мозку (КМ) при введенні сполуки S-гетерилмодифікованого цистеаміну (S-ГМЦ) в експерименті з гострим *in vivo* опроміненням. Після тотального опромінення у дозі 7,0 Гр спостерігали клітинне спустошення КМ з максимумом на 3-тю добу до  $2,6 \pm 0,9$  % клітин від вихідних значень та порушення співвідношення ранніх і диференційованих елементів гранулоцитарного, лімфоїдного та еритроїдного ряду. Внутрішньоочеревинне введення S-ГМЦ (150 мг/кг) за 15 хв до опромінення призводило до підвищення загальної кількості мієлокаріоцитів на 3-тю добу у 2,2 раза та нормалізації цього показника на 7-му добу відносно опроміненого контролю. Відновлення гранулоцито-, лімфо- та еритропоезу відбувалося у більш скорочені строки та запобігало виснаженню гемопоетичного пулу КМ після опромінення. В умовах культивування *in vitro* встановлено зменшення кількості клоногенних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) у КМ на 3-тю добу після опромінення до  $29,3 \pm 3,6$  на стежкову кістку. При введенні S-ГМЦ зберігалася більша кількість (у 2,7 раза) клоногенних МСК КМ. Таким чином, отримані результати вказують на виражений мієлопротекторний ефект сполуки S-ГМЦ.*

*Ключові слова:* кістковий мозок; гемопоетичні клітини; мезенхімальні стромальні клітини; опромінення; S-гетерилмодифікований цистеамін.

## ВСТУП

Гемопоетичний (кістковомозковий) синдром є найбільш класичним проявом гострого радіаційного синдрому, який визначається при тотальному опроміненні в дозах 2-10 Гр. Це пояснюється тим, що кістковий мозок (КМ) є високорадіочутливою тканиною і радіаційні ефекти проявляються при опроміненні значно нижчими дозами, ніж для інших критичних органів і систем. КМ включає пул гемопоетичних клітин і клітини кровотворного мікрооточення, серед яких центральне місце займають мезенхімальні стромальні клітини (МСК), що відповідають за формування гемопоєзіндукувального мікрооточення та підтримку кровотворення. До високорадіочутливих відносять гемопоетичні стовбурові й прогеніторні клітини КМ [1].

© Н.Є. Узленкова, Н.Г. Скоробогатова, Н.М. Моїсєєва, О.Л. Масленнікова

Однак щодо МСК КМ немає єдиної думки. Одні автори вважають, що вони є сприйнятливі до дії радіації [2], інші відносять їх до радіорезистентного типу [3, 4].

Як і раніше актуальним залишається питання пошуку ефективних мієлопротекторів, призначених для захисту гемопоєзу при опроміненні в «кістковомозковому» діапазоні доз. Найбільш перспективними в цьому відношенні є похідні амініотіолів, серед яких найбільш вивченим є аміфостин. Ramdas і співавт. показали радіозахисну дію аміфостину на гемопоетичні та мезенхімальні клітини КМ при опроміненні *in vitro* [5]. Також був вивчений радіопротекторний ефект нової сполуки тіолового ряду (GM2011) щодо збереження клоногенних МСК КМ і поліпшення показників виживання тварин при

опроміненні *in vivo* у дозі 6,7 Гр [6]. Наші попередні дослідження в експериментах з тотальним опроміненням у мінімальній абсолютно летальній дозі ЛД<sub>95/30</sub> дали змогу виявити високу радіопротекторну активність сполуки з ряду модифікованих амінотіолів – гідрохлорид-S-(6-етокси-2-метилхінолін-4-іл)-цистеаміну – S-гетерилмодифікованого цистеаміну (S-ГМЦ). Отримані результати свідчили про підвищення виживання та прискорення темпів відновлення гематологічних показників периферичної крові у опроміненних тварин в умовах введення S-ГМЦ [7, 8].

Метою нашої роботи було оцінити відповідь гемопоетичних клітин і МСК КМ при гострому радіаційному ураженні та введенні S-ГМЦ.

## МЕТОДИКА

Досліди проводили на 72 статевозрілих білих нелінійних щурах-самицях з масою 160-180 г, яких утримували за стандартними умовами на звичайному раціоні віварію. Всі експериментальні процедури виконано відповідно до внутрішнього протоколу Комітету з біоетики ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України», створеного на міжнародних принципах Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і норм біомедичної етики згідно із Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Київ, 2006).

Експериментальну модель гострого радіаційного ураження здійснювали при тотальному опромінюванні тварин на лінійному прискорювачі CLINAC за наступними технічними умовами: ефективна енергія 6 МеВ; поле опромінення 15×15; дистанція джерело-об'єкт 100 см; потужність дози 3,2 Гр/хв; поглинена доза у м'яких тканин становила 7,0 Гр. Досліджувана сполука S-ГМЦ синтезована в лабораторії біотехнології фізіологічно активних речовин За-

порізького національного університету (зав. лабораторії докт. біол. наук О.А. Бражко).

Тварин було поділено на 3 групи: 1-ша – інтактні (інтактний контроль); 2-га – тварини, яких тотально опромінювали (опромінений контроль); 3-тя – тварини, яким попередньо вводили S-ГМЦ з наступним тотальним опроміненням (дослідна група). S-ГМЦ вводили внутрішньоочеревинно у фізіологічному розчині в концентрації 150 мг/кг за 15 хв до опромінення. У кожній серії дослідів було використано не менше ніж 7-9 тварин.

Отримання суспензії клітин КМ здійснювали в умовах стерильного боксу багаторазовим вимиванням з використанням середовища 199 («РАА», Австрія), яке пропускали за допомогою стерильного шприца з голкою (0,8 мм х 38мм) через стегнову кістку. Отриману суспензію центрифугували при 200 g протягом 10 хв. Після видалення супернатанту клітинний осад поміщали у 2 мл середовища для культивування. Кількість ядровмісних клітин КМ (мієлокаріоцитів) визначали за стандартним підрахунком у камері Горяєва з 3%-ю оцтовою кислотою.

Цитологічне дослідження КМ проводили у мазках отриманої клітинної суспензії, які фіксували розчином еозин-метиленовим синім (за Май-Грюнвальдом) і фарбували розчином азур-еозину (за Романовським). Препарати аналізували за допомогою світлового мікроскопа PZO-Warszawa (Польща). Цитологічне дослідження препаратів КМ включало аналіз 500 клітин, кількісні показники мієлограм виражали у відсотках. Оцінку кількості клоногенних (колонієутворювальних) МСК КМ проводили в умовах культивування *in vitro*. У стерильні флакони («SPL», Корея) площею 25 см<sup>2</sup> вносили по 3 мл модифікованого середовища Ігла (α-MEM, «BioWest», Франція) з 20%-ю фетальною бичачою сироваткою (FBS, «BioWest», Франція), доповненого 2 ммоль/л L-глутаміну («РАА», Австрія) та антибіотиками (пеніцилін 50 од./мл і стрептоміцин 50 мкг/мл) і засівали клітини з отриманої суспензії із розрахунку  $(1-2) \cdot 10^5$

мієлокаріоцитів/см<sup>2</sup>. Для кожної тварини дослід проводили з подвійним повтором. Культивування здійснювали протягом 14 діб у СО<sub>2</sub>-інкубаторі за умов 37°C, 5 % СО<sub>2</sub>, 100 % вологості. Для приготування препаратів культури промивали розчином Хенкса, фіксували 96%-м етанолом і фарбували азур-еозином за Романовським.

Кількість колоній підраховували у фіксованих препаратах культур за допомогою інвертованого світлового мікроскопа Leica DM IL LED (Німеччина). Колоніями МСК вважали клони, які вміщували 40-50 і більше фібробластоподібних клітин [9]. Ефективність колонієутворення (ЕКУ) визначали як співвідношення кількостей утворених у культурі колоній МСК (n) до висіяних мієлокаріоцитів (a), одержаний показник виражали у відсотках за формулою [10]:

$$EKY = \frac{n}{a} \times 100\%$$

Загальну кількість клоногенних МСК у КМ (N), отриманому із стегнової кістки, розраховували за формулою:

$$N = \frac{nA}{a},$$

де N – загальна кількість клоногенних МСК КМ стегнової кістки; n – кількість утворених у культурі колоній МСК КМ; A – загальна кількість мієлокаріоцитів в отриманій суспензії КМ стегнової кістки; a – кількість висіяних мієлокаріоцитів.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні. Відмінності між групами вважали статистично вірогідними при P<0,05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після тотального опромінення спостерігали класичну картину спустошення КМ. У початковому періоді після опромінення, а саме на 3-тю добу, загальна кількість мієло-

каріоцитів максимально знижувалася до 2,6 ± 0,9% відносно вихідних значень (інтактний контроль). Починаючи з 7-ї доби після опромінення поступово відновлювалося загальне число клітин у КМ, яке не сягало контрольних значень протягом 14-ти діб спостереження.

В умовах попереднього введення досліджуваної сполуки S-ГМЦ до опромінення загальне число мієлокаріоцитів у період максимального спустошення КМ (3-тя доба) у 2,2 раза (P<0,05) перевищувала значення у тварин 2-ї групи. Виявлене зростання темпів відновлення КМ при введенні S-ГМЦ призводило до збільшення кількості мієлокаріоцитів до значень інтактного контролю вже до 7-ї доби після опромінення, що було в 3,1 раза вище порівняно з опроміненим контролем, на 14-ту добу – у 1,7 раза (P<0,05).

З огляду на той факт, що серед мієлокаріоцитів переважно домінують гемопоетичні клітини, описана вище динаміка загальної кількості мієлокаріоцитів, у першу чергу, відображає ступінь спустошення і потім відновлення гемопоетичного пулу КМ після гострого опромінення. Встановленою особливістю змін у складі клітин гранулоцитарного ряду в ранній термін після опромінення було зростання бластних форм у 1,7 раза (мієлобласти) і ранніх попередників (промієлоцити, мієлоцити, метамієлоцити), що відповідало фазі короткочасного абортивного підйому, зумовленого проліферативною активністю тих клітин, що вижили після опромінення. Можливою причиною подальшого зростання загального числа клітин гранулоцитарного ряду, що спостерігається на 21-шу добу після опромінення, був вірогідно високий вміст молодих проліферуючих клітин (рис. 1, а).

Водночас динаміка кількості зрілих клітин (паличко- і сегментоядерні гранулоцити) значно відрізнялася. На 3-тю добу після опромінення число диференційованих клітин різко знижувалася, практично вдвічі (P<0,05), і збільшення не спостерігалось протягом усього періоду спостережень. Це свідчить про порушення процесів диференціювання

значної кількості клітин гранулоцитарного ряду у відповідь на опромінення (див. рис. 1, б). В умовах введення S-ГМЦ вони зазнавали менш виражених змін. На 3-тю добу кількість диференційованих форм гранулоцитів (паличкоядерні і сегментоядерні) у 3,1 раза ( $P<0,05$ ) перевищувала їх вміст в опроміненному контролі, що вказувало на відновлення цього показника у коротший термін (див. рис. 1, а, б).

Аналізуючи стан кістковомозкового лімфопоезу було показано, що на 3-тю добу спостерігалися структурні зміни лімфоцитів (вакуолізація, пікноз ядер і цитоліз), що свідчило про ушкодження клітин у перші дні після опромінення. Виражене збільшення сумарного числа молодих форм лімфоцитів (лімфобласти, пролімфоцити) на 14-ту добу не супроводжувалося зміною вмісту зрілих клітин (лімфоцитів). На 21-шу добу було відзначено виснаження лімфоцитарного ряду, загальний вміст лімфоїдних клітин був у 3,2 раза ( $P<0,05$ ) нижче від значень в інтактному контролі (рис. 2, а, б). Відомо, що зниження числа лімфоцитів після опромінення є чутливим показником радіаційного ураження КМ [11]. Мієлопротекторна активність S-ГМЦ проявлялася в забезпеченні нормального ди-

ференціювання клітин-попередників лімфоцитів, у запобіганні виснаження лімфопоезу, що визначено до 21-ї доби після радіаційного впливу (див. рис. 2, а, б).

За даними мієлограм при кількісній оцінці еритроїдних клітин КМ опромінених тварин показано, що клітини цього типу є найбільш радіостійкими, тому що їх загальне число вірогідно не зменшувалося у початковий період, на 3-тю і 7-му добу після опромінення. Суттєві зміни еритроїдного ряду відбувалися в більш пізній термін. На 14-ту і 21-шу добу кількість незрілих попередників еритроцитів (пронормобласти, еритробласти) була вірогідно нижча від інтактного контролю в 3,5 і 1,7 раза ( $P<0,05$ ) відповідно (рис. 3, а). Водночас не відбувалося значних кількісних змін з боку зрілих клітин (базофільні, поліхроматофільні й оксифільні нормоцити; див. рис. 3, б). При введенні S-ГМЦ спостерігали більш ранню активацію проліферації клітин еритроїдного ряду. На 3-тю добу після опромінення кількість бластних форм вірогідно перевищувала відповідні значення опромінених тварин, при цьому число зрілих клітин не змінювалося (див. рис. 3, а, б).

Таким чином, встановлені кількісні зміни в складі клітин гемопоетичного пулу КМ

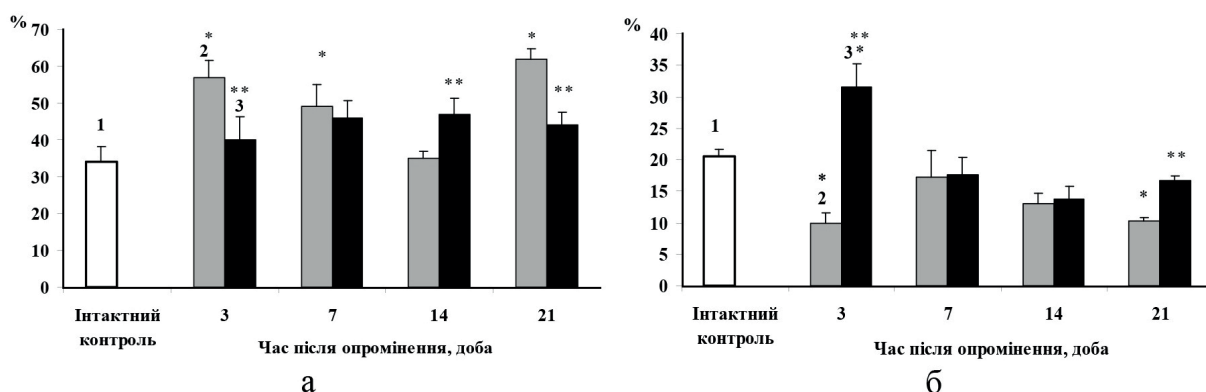


Рис. 1. Кількість клітин гранулоцитарного ряду кісткового мозку щурів після опромінення та при введенні S-гетерилмодифікованого цистеаміну (S-ГМЦ) у дозі 150 мг/кг: а – ранні попередники (мієлобласти, промієлоцити, мієлоцити, метамієлоцити), б – диференційовані гранулоцити (паличкоядерні та сегментоядерні гранулоцити); 1 – інтактні тварини (інтактний контроль); 2 – тварини, яких тотально опромінювали (опромінений контроль); 3 – тварини, яким попередньо вводили S-ГМЦ та опромінювали (дослідна група). \* $P<0,05$  порівняно з інтактним контролем, \*\* $P<0,05$  порівняно з 2-ю групою (опромінений контроль)

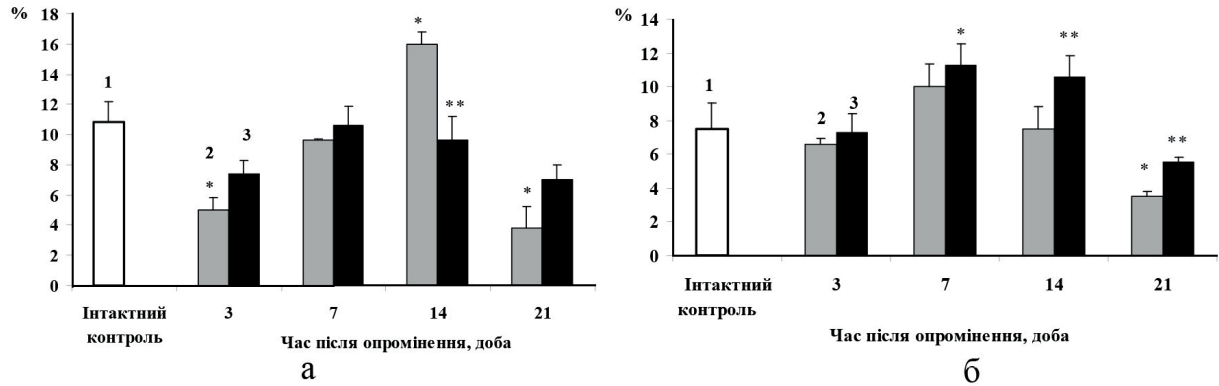


Рис. 2. Кількість клітин лімфоїдного ряду кісткового мозку шурів після опромінення та при введенні S-гетерилмодифікованого цистеаміну (S-ГМЦ) у дозі 150 мг/кг: а – ранні попередники (лімфобласти, пролімфоцити), б – диференційовані клітини (лімфоцити); 1 – інтактні тварини (інтактний контроль); 2 – тварини, яких тотально опромінювали (опромінений контроль); 3 – тварини, яким попередньо вводили S-ГМЦ та опромінювали (дослідна група). \* $P < 0,05$  порівняно з інтактним контролем, \*\* $P < 0,05$  порівняно з 2-ю групою (опромінений контроль)

вказували на порушення всіх досліджених напрямків кровотворення у відповідь на опромінення. Введення S-ГМЦ запобігало виснаженню гемопоетичного пулу клітин КМ після гострого опромінення, нормалізуючи процеси відновлення гранулоцито-, лімфо- та еритропоезу в більш ранній термін порівняно з опроміненим контролем.

Відомо, що при порушеннях гемопоезу, які виникають у відповідь на опромінення, можуть бути пошкоджені не тільки безпосередньо гемопоетичні клітини, а й стромальні

елементи КМ. Головною умовою відновлення кровотворення є складна взаємодія всіх типів гемопоетичних і стромальних клітин, що відбувається у зоні кровотворних ніш у КМ [12]. У наших дослідженнях була проведена оцінка впливу гострого опромінення організму на пул клоногенних (колонієутворювальних) МСК КМ. У разі культивування *in vitro* формуються дискретні адгезивні колонії фібробластоподібних клітин, кожна з яких є похідною однієї клоногенної МСК КМ [9]. ЕКУ – це показник, що відображає

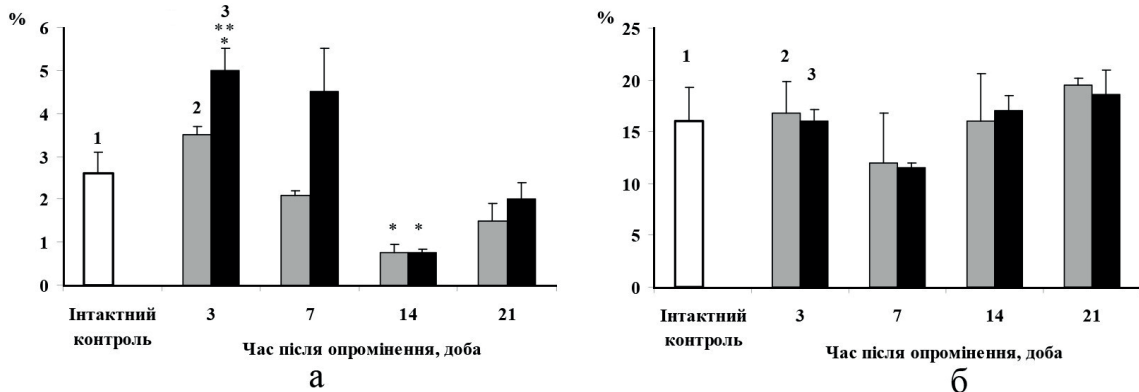


Рис. 3. Кількість клітин еритроїдного ряду кісткового мозку шурів після опромінення та при введенні S-гетерилмодифікованого цистеаміну (S-ГМЦ) у дозі 150 мг/кг: а – бласти (еритробласти, пронормобласти), б – нормоцити (базофільні, поліхроматофільні, оксифільні); 1 – інтактні тварини (інтактний контроль); 2 – тварини, яких тотально опромінювали (опромінений контроль); 3 – тварини, яким попередньо вводили S-ГМЦ та опромінювали (дослідна група). \* $P < 0,05$  порівняно з інтактним контролем, \*\* $P < 0,05$  порівняно з 2-ю групою (опромінений контроль)



кількість клоногенних МСК у визначеній дозі експлантованих у культуру клітин. За нашими результатами у інтактних тварин було виявлено в середньому 8 колоній МСК на  $10^6$  експлантованих мієлокаріоцитів (таблиця).

Колонії були сформовані веретеноподібними, трикутними і подовженими фібро-бластоподібними клітинами. Можна було умовно виділити три типи колоній: малі, що включали 40-50 клітин; середні – з 50-100 клітин та великі – містили більш ніж 100 клітин, деякі великі колонії сягали макроскопічних розмірів – до 5 мм у діаметрі. Останні становили найбільший інтерес, тому що їхня центральна частина характеризувалася щільноупакованим розташуванням клітин, що свідчило про високий проліферативний потенціал вихідної клоногенної МСК. Вони, вочевидь, мають здатність давати початок субпопуляціям активно проліферуючих стромальних попередників і, швидше за все, є претендентами для стовбурового компартмента пулу МСК КМ.

Культитивування МСК, виділених із КМ тварин за умов гострого опромінення, дало змогу простежити за характером радіаційних змін у стромі КМ. На 3-тю добу після опромінення значення ЕКУ свідчили про те, що вміст клоногенних МСК у  $10^6$  посіяних у

культуру мієлокаріоцитів залишався на рівні інтактного контролю. Надалі, на 7-му добу, було виявлено близько двох клоногенних МСК на  $10^6$  мієлокаріоцитів у культурі, а до 14-ї доби їх кількість знижувалася (див. таблицю). Оскільки ЕКУ відображає кількість клоногенних МСК у висіяній дозі, він не дає повної картини щодо їхньої загальної кількості у КМ. У зв'язку з цим нами додатково був використаний розрахунок загальної кількості клоногенних МСК у повному об'ємі суспензії КМ, виділеної з стегнової кістки. На підставі цього підходу було встановлено зниження загального числа клоногенних МСК у КМ вже на 3-тю добу після опромінення, яке зберігалося протягом усього терміну спостереження (див. таблицю).

Зниження кількості клоногенних МСК у КМ після гострого опромінення може бути пов'язане як з елімінацією ушкоджених клітин і/чи порушенням здатності до колонієутворення у частини з них, так і з можливою міграцією мезенхімальних попередників із КМ в інші ділянки радіаційного ушкодження в організмі. Крім того, слід відзначити, що на 7-му добу у складі колоній МСК КМ регулярно зустрічалися сплюснені клітини з ознаками старіння – великим об'ємом цитоплазми та зернистістю, а також

**Ефективність колонієутворення та кількість клоногенних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) кісткового мозку (КМ) стегнової кістки щурів після гострого опромінення у дозі 7,0 Гр та попереднього введення S-гетерилмодифікованого цистеаміну (S-ГМЦ) у дозі 150 мг/кг ( $M \pm m$ ,  $n = 7-9$ )**

Групи	Ефективність колонієутворення, x 10 <sup>-4</sup> %			Загальна кількість клоногенних МСК КМ		
Інтактний контроль (1-ша група)	8,3 ± 2,2			704,8 ± 133,7		
	Час після опромінення, доба					
	3	7	14	3	7	14
Опромінений контроль (2-га група)	7,3 ± 2,6	1,8 ± 0,6*	0,7 ± 0,2*	29,3 ± 3,6*	69,5 ± 28,6*	31,3 ± 11,1*
Тварини після введення S-ГМЦ та опромінення (3-тя група)	13,0 ± 3,0	1,5 ± 0,6*	0,4 ± 0,1*	77,7 ± 16,1***	175,3 ± 58,7*	59,3 ± 33,7*

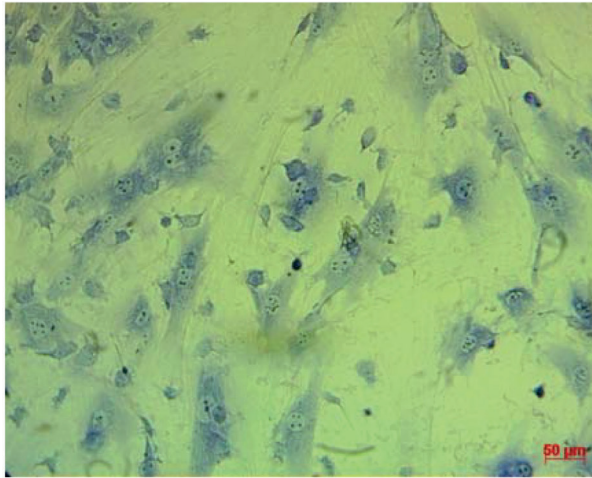
\* $P < 0,05$  порівняно з інтактним контролем; \*\* $P < 0,05$  порівняно з відповідним показником 2-ї групи

двоядерні клітини (рис. 4, а), що може бути зумовлено зміною властивостей клоногенних МСК, які були під радіаційним впливом. На 14-ту добу після опромінення клітини з аномальними морфологічними ознаками виявлялися рідше (див. рис. 4, в). При введенні S-ГМЦ значення ЕКУ були подібні до таких в групі опроміненого контролю (див. таблицю). Однак, на 3-тю добу після опромінення загальна кількість клоногенних МСК у КМ була значно нижче від рівня контролю, але

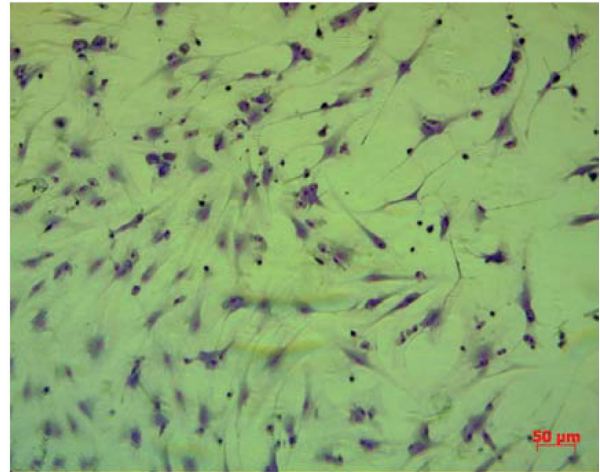
вірогідно вища у 2,7 раза ( $P < 0,05$ ) порівняно з опроміненим контролем (див. таблицю). У наступний термін, на 7-му і 14-ту добу після опромінення, у групі тварин із введенням S-ГМЦ зберігалася тенденція до збільшення загальної кількості клоногенних МСК КМ, ніж в опроміненому контролі. Крім того, аномальних морфологічних змін досліджуваних клітин у колоніях, характерних для опроміненого контролю, практично не виявлялося (див. рис. 4, б, г).

Опромінення

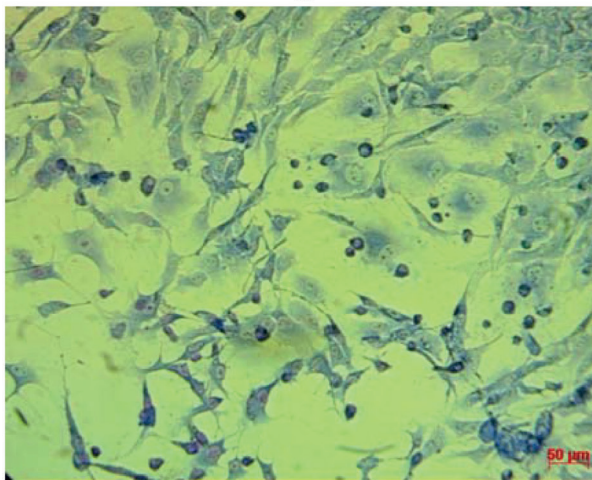
Введення S-гетерил  
модифікованого цистеаміну та  
опромінення



а



б



в



г

Рис. 4. Фрагмент колонії мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку щурів: 7-ма доба (а, б) і 14-та доба (в, г) після тотального опромінення та введення S-гетерилмодифікованого цистеаміну (S-ГМЦ). Фарбування азур-еозином

Таким чином, у нашому дослідженні було встановлене ушкодження і редукція пулу клоногенних МСК у КМ після гострого опромінення. Це узгоджується з даними дослідників, що описали зниження кількості клоногенних МСК при *in vitro* опроміненні [13, 14]. В обох групах після опромінення в культурі переважали великі колонії МСК, рідко зустрічалися середні й поодинокими були малі колонії. Цей факт указує на різну радіочутливість представників пулу клоногенних МСК КМ, що збігається з думкою інших авторів [5]. Виявлена більша радіостійкість у клоногенних МСК КМ з високим проліферативним потенціалом, вочевидь, полягає в основі їхньої важливої біологічної ролі у відновленні та підтримці гемопоезу в опроміненому організмі. Встановлений радіопротекторний ефект S-ГМЦ виражався в збереженні більшої кількості клоногенних МСК КМ і запобіганні порушень їх колонієутворювальних властивостей у початковому періоді після опромінення.

## ВИСНОВКИ

1. Показано, що при гострому радіаційному ураженні відбувається зниження загальної кількості мієлокаріоцитів, кількісні зміни у складі гемопоетичних клітин КМ і редукція пулу клоногенних МСК КМ.

2. Встановлений мієлопротекторний ефект S-ГМЦ проявлявся у запобіганні виснаження гемопоетичного пулу КМ, відновленні гранулоцито-, лімфо- та еритропоезу у скорочені строки після опромінення та збереженні більшої кількості (у 2,7 раза) клоногенних МСК КМ.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**Н.Е. Узленкова, Н.Г. Скоробогатова,  
Н.Н. Моисеева, Е.Л. Масленникова**

## ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА КОСТНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ОСТРОМ ОБЛУЧЕНИИ И ВВЕДЕНИИ S-ГЕТЕРИЛМОДИФИЦИРОВАННОГО ЦИСТЕАМИНА

Изучали изменения клеточного состава костного мозга (КМ) при введении соединения S-гетерилмодифицированного цистеамин (S-ГМЦ) в эксперименте с острым *in vivo* облучением. После тотального облучения в дозе 7,0 Гр наблюдали клеточное опустошение КМ с максимумом на 3-и сутки до  $2,6 \pm 0,9$  % клеток от исходного уровня и нарушение соотношения ранних и дифференцированных элементов гранулоцитарного, лимфоидного и эритроидного ряда. Внутривенное введение S-ГМЦ (150 мг/кг) за 15 мин до облучения приводило к повышению общего количества миелокариоцитов на 3-и сутки в 2,2 раза и нормализации этого показателя на 7-е сутки относительно облученного контроля. Восстановление гранулоцито-, лимфо- и эритропоеза происходило в более сокращенные сроки и предотвращало истощение гемопоэтического пула КМ после облучения. В условиях культивирования *in vitro* установлено уменьшение количества клоногенных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в КМ на 3-и сутки после облучения до  $29,3 \pm 3,6$  на бедренную кость. При введении S-ГМЦ сохранялось большее количество (в 2,7 раза) клоногенных МСК КМ. Таким образом, полученные результаты указывают на выраженный миелопротекторный эффект соединения S-ГМЦ.

Ключевые слова: костный мозг; гемопоэтические клетки; мезенхимальные стромальные клетки; облучение; S-гетерилмодифицированный цистеамин.

**N.E. Uzlenkova<sup>1</sup>, N.G. Skorobogatova<sup>1</sup>,  
N.N. Moiseyeva<sup>2</sup>, E.L. Maslennikova<sup>1</sup>**

## THE FEATURES OF CELLULAR COMPOSITION OF RAT BONE MARROW AT ACUTE IRRADIATION AND S-HETERYL MODIFIED CYSTEAMINE ADMINISTRATION

We studied the changes in the bone marrow (BM) cell composition at administration of the compound S-heteryl modified cysteamine (S-HMC) in the experiment with acute *in vivo* irradiation. After total irradiation at a dose of 7,0 Gy depletion of BM cell pool with a maximum at day 3 to  $2,6 \pm 0,9$  % cells of control level was observed and changing the ratios of early and differentiated elements of granulocytic, lymphoid and erythroid lineages was detected. Intraperitoneal administration of S-HMC (150 mg / kg) in 15 minutes before irradiation resulted in an increase of the total myelokaryocytes number by 2.2 times at day 3 and it led to normalization of



this parameter on day 7 relatively to the irradiated control. Recovery of granulocyto-, lympho- and erythropoiesis was in shorter terms and it prevented the hematopoietic BM pool depletion after irradiation. Under *in vitro* culture conditions it was established a decrease in number of clonogenic mesenchymal stromal cells (MSCs) in BM at day 3 after irradiation to  $29,3 \pm 3,6$  per femoral bone. It was determined survival of a greater number (2.7 times) of the clonogenic BM MSCs when S-HMC was administrated. Thus, the results indicate the manifest myeloprotective effect of the S-HMC compound. Key words: bone marrow; hematopoietic cells; mesenchymal stromal cells; irradiation; S-heteryl modified cysteamine.

<sup>1</sup> SI "Grigoriev Institute for Medical Radiology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv;

<sup>2</sup> Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv.

## REFERENCES

1. Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(9):1447-62.
2. Alessio N, Gaudio SD, Capasso S, Di Bernardo G, Capabianca S, Cipollaro M, et al. Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process. *Oncotarget*. 2014;6(10):8155-66.
3. Chen MF, Lin CT, Chen WC, Yang CT, Chen CC, Liao SK, et al. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol. Biol Phys*. 2006;66(Nº 1):244-53.
4. Nicolay NH, Sommer E, Lopez R, Wirkner U, Trinh T, Sisombath S, et al. Mesenchymal stem cells retain their defining stem cell characteristics after exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013;87(5):1171-78.
5. Ramdas J, Warriar RP, Scher C, Larussa V. Effects of Amifostine on Clonogenic Mesenchymal Progenitors and Hematopoietic Progenitors Exposed to Radiation. *J Pediatr Hematol/Oncol*. 2003 Jan 25(1):19-26.
6. Okic-Djordjevic I, Trivanovic D, Iovanovic M, Ignatovic M, Secerov B, Mojovic M, et al. Increased survival after irradiation followed by regeneration of bone marrow stromal cells with a novel thiol-based radioprotector. *Croat Med. J*. 2014;55:45-9.
7. Uzlenkova NE, Brazhko OA, Kornet MM, Pasiuga VN, Skorobogatova NG, Leonova IA, et al. The experimental study of the potential radioprotectors – S(azaheteryl) substituted cysteamine. *Ukr J Radiol*. 2014;2:149-54. [Ukrainian].
8. Uzlenkova NE, Skorobogatova NG, Magda IY, Leonova IA, Nenyukova EV, Maslennikova EL. Efficiency of S-heterylmodified cysteamine at acute radiation syndrome in rats. *Ukr J Radiol*. 2017;25(1):37-44. [Ukrainian].
9. Friedensteyn AJa, Luria EA. Cellular Bases of Hemopoietic Microenvironment. 1-st ed. Moskow: Meditsina; 1980. [Russian].
10. Davis JM. Basic Cell Culture. Practical approach. 2-nd ed. Oxford: University Press; 2001.
11. Dainiak N, Gent RN, Carr Z, Schneider R, Bader J, Buglova E, et al. First global consensus for evidence-based management of the hematopoietic syndrome resulting from exposure to ionizing radiation. *Disaster Med Public Health Prep*. 2011;5(3):202-12.
12. Nikolskaya EI, Butenko GM. Structural-functional organization of the bone marrow hematopoietic stem cells niches. *Klitiin ta Organ Transplantol*. 2016;4(1):101-17. [Russian].
13. Islam MS, Steming ME, Takahashi Y, Hui SK. Radiation response of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and human pluripotent stem cells. *J Radiation Res*. 2015;56:269-77.
14. Wang Y, Zhu G, Wang J, Chen J. Irradiation alter the differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep*. 2016;13(1):213-23.

Матеріал надійшов до  
редакції 24.10.2017