

## ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ И АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОГО ВЫВЕШИВАНИЯ НА ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА КРЫС

© *Е. А. Маркина,<sup>1</sup> В. С. Кохан, М. П. Рое, И. В. Андрианова,  
А. С. Штемберг, Л. Б. Буравкова*

*Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007;  
<sup>1</sup> электронный адрес: goncharova-tim@list.ru, markina\_elena@imbp.ru*

Важную роль в адаптации физиологических систем к космическому полету играют прогениторные клетки костного мозга мезенхимного происхождения, от функциональной активности которых зависят гемопоэз, иммунитет и гомеостаз костной ткани. В ходе исследований в рамках программ «Бион» и «Бион-М» были получены данные о том, что во время космического полета происходит угнетение лимфо- и эритропоэза при усилении гранулоцитарно-макрофагального роста на фоне снижения числа костномозговых гемических прогениторов крыс. Кроме этого, было показано негативное влияние на негемопоэтические прогениторные клетки костного мозга. До сих пор остается неясным патогенез действия ионизирующего излучения и микрогравитации на прогениторные клетки костного мозга. В связи с этим целью настоящего исследования было изучение влияния 30-суточной гравитационной разгрузки и 6-кратного  $\gamma$ -облучения на прогениторы костного мозга крыс. У контрольных самцов крыс (К), а также у животных, подвергавшихся воздействию вывешивания (В), облучения (О) и их комбинированному воздействию (ОВ), были определены клеточность костного мозга, иммунофенотип, пролиферативная активность кариоцитов костного мозга, число гемопоэтических КОЕ, КОЕ-ф, дифференцировочные потенции гемопоэтических и стромальных предшественников костного мозга. При моделировании эффектов космического полета клеточность и пролиферативная активность клеток костного мозга крыс не изменились, число КОЕ-ф снижалось. При облучении увеличивалась доля гемопоэтических клеток на фоне снижения активности гемических предшественников. Остеопотенциал стромальных предшественников не изменялся, а облучение привело к усилению адиподифференцировки. После 2 нед реадaptации функциональная активность прогениторных клеток костного мозга восстановилась. Таким образом, 30-суточное моделирование факторов космического полета оказывает обратимое негативное влияние на морфофункциональные свойства прогениторных клеток костного мозга крыс.

Ключевые слова: прогениторы костного мозга, радиация, антиортостатическое вывешивание.

Принятые сокращения: ГСК — гемопоэтические стволовые клетки, КМ — костный мозг, КП — космический полет, FITC — флуоресцеин-изоцианат, PE — фикоэритрин, PD — число удвоений популяций клеток.

Известно, что во время космического полета (КП) организм подвергается воздействию ряда экстремальных факторов, основными из которых являются микрогравитация и ионизирующее излучение. Наиболее выражено на отсутствие гравитации во время полетов реагируют костно-мышечная система, вестибулярный аппарат, нервная, эндокринная и сердечно-сосудистая системы (Smith et al., 2015; Zhu et al., 2015). Важную роль в адаптации физиологических систем к КП играют прогениторные клетки костного мозга мезенхимного происхождения, от функциональной активности которых зависят гемопоэз, иммунитет и гомеостаз костной ткани.

Космические эксперименты, проводимые на МКС и биоспутниках, сопряжены с большими материально-техническими затратами и рисками, поэтому разработка адекватных наземных моделей, имитирующих факторы КП, является одной из основных задач космической биологии и медицины. С целью моделирования физиологических изменений, возникающих при действии микрогра-

витаии, для мелких лабораторных животных (грызунов) успешно используется модель антиортостатического вывешивания (Morey-Holton, Globus, 2002; Morey-Holton et al., 2005; Globus, Morey-Holton, 2015). Этот метод позволяет длительно моделировать эффекты микрогравитации, что актуально в преддверии межпланетарных экспедиций (Луна, Марс). Для моделирования эффектов космического излучения используются установки с источником ионизирующего излучения (Штемберг, 1992).

В ходе предыдущих исследований в рамках программ «Бион» были получены данные о том, что во время КП происходит угнетение лимфо- и эритропоэза при усилении гранулоцитарно-макрофагального роста на фоне снижения числа костномозговых гемических прогениторов крыс (Швец, Кривенкова, 1977; Каландрова и др., 1981; Vasek et al., 1982, 1990, 1991; Швец и др., 1984; Газенко и др., 1987; Сотнезова и др., 2016). Кроме этого, было показано негативное влияние на негемопоэтические прогениторные клетки костного мозга (КМ) (Газенко

и др., 1987). При исследовании процессов реадaptации к земным условиям после КП нами показано, что эффекты в стромальных предшественниках КМ, вызванные космическим полетом, обратимы (Андреева и др., 2014; Маркина и др., 2015). Однако до сих пор остается неясным патогенез действия разных факторов (микрогравитация, ионизирующее излучение) на прогениторные клетки КМ, как и реакция клеток при их комбинированном воздействии. Несмотря на важность исследований по изучению комбинированного действия разных экстремальных факторов на организм, экспериментальные работы только начинаются (Штемберг, 2014; Chowdhury et al., 2016; Pani et al., 2016).

Целью работы было изучение характера адаптационных процессов прогениторных клеток КМ крыс в условиях гравитационной разгрузки и ионизирующего излучения и процессов восстановления в период 2-недельной реадaptации после прекращения воздействия.

### Материал и методика

Исследование проводили на самцах крыс линии Вистар (возраст 10—12 мес, масса 250—300 г), содержащихся на стандартном пищевом рационе с 2-недельным карантинном в условиях вивария. Подопытные животные были случайным образом разделены на 4 группы: 1) виварный контроль — К, 2) антиортостатическое вывешивание (вывешивание) — В, 3) облучение в суммарной дозе 3 Гр, 4) вывешивание + облучение — ОВ. После периода 2-недельной реадaptации животные также были разделены на группы: виварный контроль после восстановления — ВК, восстановление после воздействия вывешивания — ВВ, восстановление после облучения — ВО, восстановление после комбинированного воздействия вывешивания и ионизирующего облучения — ВОВ (Штемберг и др., 2014). Программа эксперимента и все процедуры с животными были одобрены Комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН.

Моделирование эффектов микрогравитации и космического облучения. Экспериментальные животные были подвергнуты воздействию 30-суточного вывешивания, которое является экспериментальной наземной моделью микрогравитации для мелких лабораторных животных (Morey-Holton, Globus, 2002; Morey-Holton et al., 2005; Globus, Morey-Holton, 2015). Для облучения животных использовали установку ГОБО-60 с источником ионизирующего излучения  $^{137}\text{Cs}$  (172 г-экв. Ра), мощность дозы составила 2.34 сГр/ч. В течение 30 сут было проведено 6 суточных сеансов облучения с интервалами от 3 до 5 сут. Подробно условия и порядок проведения эксперимента описаны в статье Штемберга с соавторами (2014).

Выделение кариоцитов костного мозга, определение клеточности. После декапитации выделяли КМ из бедренной кости по общепринятой методике в нашей модификации (Meirelles et al., 2003). Для подсчета клеток к клеточной суспензии добавляли лизирующий буфер в соотношении 1 : 10 и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. После полного лизиса эритроцитов проводили подсчет клеток в гемоцитометре. Культивирование клеток осуществляли в среде  $\alpha$ -МЕМ с 2 мМ глутамина (Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone,

США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия), в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе (Sanyo, Япония) согласно протоколу (Meirelles et al., 2003) в нашей модификации. В работе использовали клетки первичной культуры.

Иммунофенотип кариоцитов костного мозга. Иммунофенотип клеток, представленных в культуре, определяли с помощью моноклональных антител против следующих поверхностных маркеров: CD90, CD73, характерных для стромальных клеток, и основных маркеров лейкоцитов CD45 и CD11b. Окрашенные клетки были проанализированы на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США).

Аликвота клеток от каждого пула была использована для выявления поверхностных антигенов с помощью соответствующих моноклональных антител CD45 и CD90 (BD Biosciences, США) и CD11b и CD73 (Chemicon, США), конъюгированных с PE (CD90 и CD73) и FITC (CD45 и CD11b). В качестве изотипического контроля использовали IgG, конъюгированные с PE и FITC (Biolegend, США), того же подкласса, что и специфические антитела. На пробу отбирали по 100—300 тыс. клеток, отмывали от среды центрифугированием (5 мин при 1500 об/мин) и ресуспендировали в 100 мкл фосфатного буфера. К 100 мкл суспензии добавляли 1 мкл раствора антиген-специфичных или изотипических антител, встряхивали на вортексе, затем клетки инкубировали 15 мин в темноте при 4 °С. Далее в каждую пробу добавляли по 400 мкл фосфатного буфера. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Epics XL, используя программное обеспечение System II для захвата и анализа изображения (Beckman Coulter, США).

Криоконсервирование и культивирование гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Полученные после выделения клетки (2—3 млн) помещали в 1 мл среды для замораживания, осторожно ресуспендировали и переносили в пробирки для криоконсервации. Пробирки с суспензией клеток помещали в условия при  $-20$  °С на 1 ч, затем — в условия при  $-70$  °С. Длительное хранение осуществляли в парах жидкого азота. Криоконсервированные образцы суспензии клеток КМ крыс размораживали при 37 °С до появления жидкой фазы и отмывали от криопротектора в избытке среды культивирования  $\alpha$ -МЕМ с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. После осаждения клетки КМ крыс ресуспендировали в среде  $\alpha$ -МЕМ с 2 % сыворотки и оценивали число живых ядросодержащих клеток путем окрашивания трипановым синим (Gibco, Англия). Суспензию клеток вносили в полужидкую среду MethoCult (StemCell, Канада). Подготовку образцов и культивирование проводили согласно инструкции фирмы-производителя. Число и состав колоний оценивали через 8—10 сут на микроскопе Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония). Дальнейшую обработку изображений проводили в программе NIS-elements (Nikon, Япония).

Для определения числа КОЕ-ф суспензию мононуклеаров КМ высевали с плотностью  $5 \cdot 10^6$  кл./см<sup>2</sup> в чашки Петри диаметром 35 мм. Число колоний подсчитывали на 14-е сут культивирования после окраски 0.5%-ным раствором кристалл-виолета в метаноле в течение 5 мин.

Пролиферативная активность кариоцитов костного мозга. Подсчет культивируемых клеток проводили на световом фазово-контрастном микроскопе (Nikon Eclipse TiU, Япония) с помощью программы

Sigma Scan Pro 5 (SPSS, США). Для оценки пролиферативной активности мононуклеаров КМ определяли число удвоений популяций (PD). Расчет проводили по формуле  $PD = \log_2(N/N_0)$ , где  $N_0$  и  $N$  — начальное и конечное количество клеток.

Для оценки уровня спонтанной и индуцированной адипо- и остеодифференцировки мононуклеары КМ были посажены с плотностью  $10 \cdot 10^6$  кл./см<sup>2</sup> в чашки Петри диаметром 35 мм. Контролем дифференцировки служили клетки того же пассажа, высеванные в той же плотности, культивируемые в ростовой среде без индукторов дифференцировки.

Для индукции остеодифференцировки стромальных клеток использовали набор Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis Kit (Millipore, США). При достижении клетками 30 % монослоя их переносили в индукционную среду. На 7-е сут инкубации в индукционной среде гистохимически выявляли активность щелочной фосфатазы — раннего маркера остеодифференцировки, используя набор Alkaline Phosphatase Kit (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Наличие положительной окраски клеток определяли при помощи фазово-контрастного микроскопа (Nikon Eclipse TiU, Япония) в проходящем свете. Последующую обработку цифровых изображений проводили при помощи компьютерной программы Sigma Scan Pro 5 (SPSS, США).

Для адипоиндукции использовали набор Adipogenesis Assay (Millipore, США). После достижения клетками 80—90 % монослоя их переносили в индукционную среду. Коммитирование клеток в адипонаправлении определяли, выявляя наличие липидных включений в цитоплазме после окраски Oil Red O (Sigma, США) на 14-е сут культивирования при помощи фазово-контрастного микроскопа (Nikon Eclipse TiU, Япония) в проходящем свете.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводили с помощью пакетов программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 7.0, используя непараметрический критерий Манна—Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ . Данные были представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  — среднее значение,  $m$  — ошибка среднего.

## Результаты и обсуждение

Клеточность КМ. Число выделенных мононуклеаров КМ после моделирования эффектов микрогравитации и ионизирующего облучения достоверно не отлича-

лось от числа клеток в группе контроля, но следует отметить тенденцию к увеличению числа клеток в группах В и О. Наибольшее число клеток наблюдали в группе В ( $532 \cdot 10^6$  кл./10 мл), несколько меньше в группе О ( $410 \cdot 10^6$  кл./10 мл), в группе ОВ ( $340 \cdot 10^6$  кл./10 мл) число мононуклеаров было сходным с контрольными значениями ( $323 \cdot 10^6$  кл./10 мл) (рис. 1, а). Увеличение числа выделенных мононуклеаров в группах О и В может объясняться более легким выделением клеток из-за остеопороза костей задних конечностей после воздействия весовой разгрузки и ионизирующего излучения (Nabavi et al., 2011; Green, Rubin, 2014). Отсутствие значимого увеличения числа выделенных клеток в группе комбинированного воздействия может объясняться нелинейным эффектом действия нескольких факторов разной физической природы. Воздействие одного фактора, возможно, меняет чувствительность клеточных систем к действию другого.

После 14-суточного восстановления число выделенных мононуклеаров не отличалось от значений, характерных для контрольной группы. Стоит обратить внимание на то, что число выделенных клеток в группах ВВ и ВО было достоверно меньше по сравнению с данными, характерными для соответствующих групп до начала периода восстановления (рис. 1, б).

Иммунофенотип. Во всех экспериментальных группах большинство клеток (89—99 %) экспрессировало маркер CD90. Однако в группе ОВ доля клеток CD90<sup>+</sup> была меньше по сравнению с другими группами (рис. 2, а). Доля клеток CD73<sup>+</sup> в группах животных, подвергавшихся облучению, оказалась ниже, чем в контрольной группе. В группе В доля клеток CD73<sup>+</sup> была такой же, как и в контроле (рис. 2, б). Доля клеток CD45<sup>+</sup> и CD11b<sup>+</sup> в группе О была достоверно больше по сравнению со всеми остальными группами (рис. 2, в, г). Увеличение доли клеток CD45<sup>+</sup> и CD11b<sup>+</sup> в группе О может отражать усиление взаимодействия стромальных и гемопоэтических клеток, при этом уменьшение доли клеток CD73<sup>+</sup>, возможно, говорит о том, что взаимодействие с гемопоэтическими клетками снижает адгезивные свойства стромальных клеток. Отсутствие этого эффекта при комбинированном воздействии указывает на отсутствие аддитивности действующих факторов (Штемберг, 2014).

После реадaptации доля клеток CD90<sup>+</sup> во всех группах была одинаковой и составляла 98 % (рис. 3, а). Доля клеток CD73<sup>+</sup> увеличилась во всех экспериментальных группах, особенно в группе ВВ (98 %) (рис. 3, б). Число гемопоэтических клеток (CD45<sup>+</sup> и CD11b<sup>+</sup>) во всех груп-

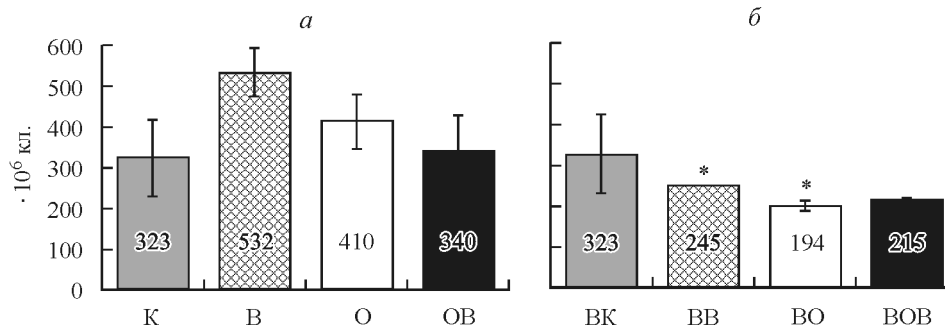


Рис. 1. Число мононуклеаров, выделенных из костного мозга бедренной кости крыс линии Wistar, после моделирования факторов космического полета (а) и после периода 2-недельной реадaptации (б).

По вертикали — число клеток. Данные представлены в форме  $M \pm m$ , звездочка — достоверное отличие показателя в группе ВВ от группы В, ВО от О ( $p < 0.05$ ).

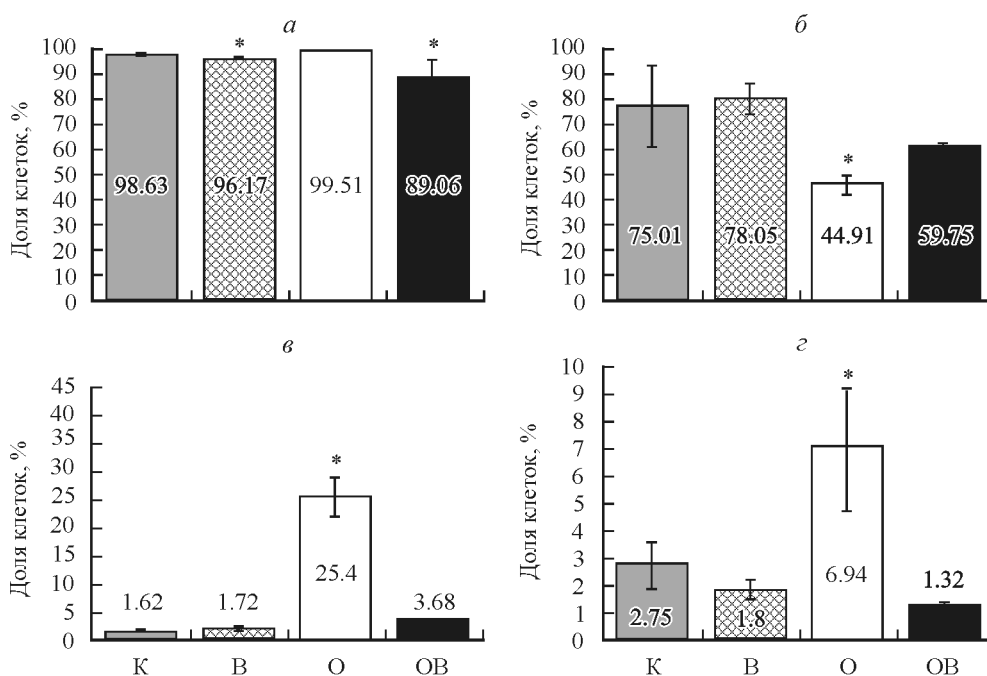


Рис. 2. Иммунофенотип клеток костного мозга бедренной кости крыс линии Wistar после моделирования факторов космического полета на 18-е сут культивирования.

По вертикали — доля клеток, экспрессирующих маркеры CD90 (а), CD73 (б), CD45 (в) и CD11b (г). Данные представлены в форме  $M \pm m$ , звездочка — достоверные отличия от показателя контрольной группы ( $p < 0.05$ ).

пах не превышала 5 % (рис. 3, в, г). В группах ВО и BOB доля клеток CD11b<sup>+</sup> была около 4 %, что несколько превышало значения в группах BK и BB (рис. 3, г). Стоит отметить также снижение в группе ВО числа клеток, несущих гемопоэтические маркеры после периода 2-недельной реадаптации.

Клоногенная активность гемопоэтических предшественников. После 30 сут общее число гемопоэтических колоний у облученных животных уменьшалось. Интересно, что облучение при вывешивании привело к незначительному увеличению числа колоний (рис. 4). Возможно, это объясняется, как и в случае

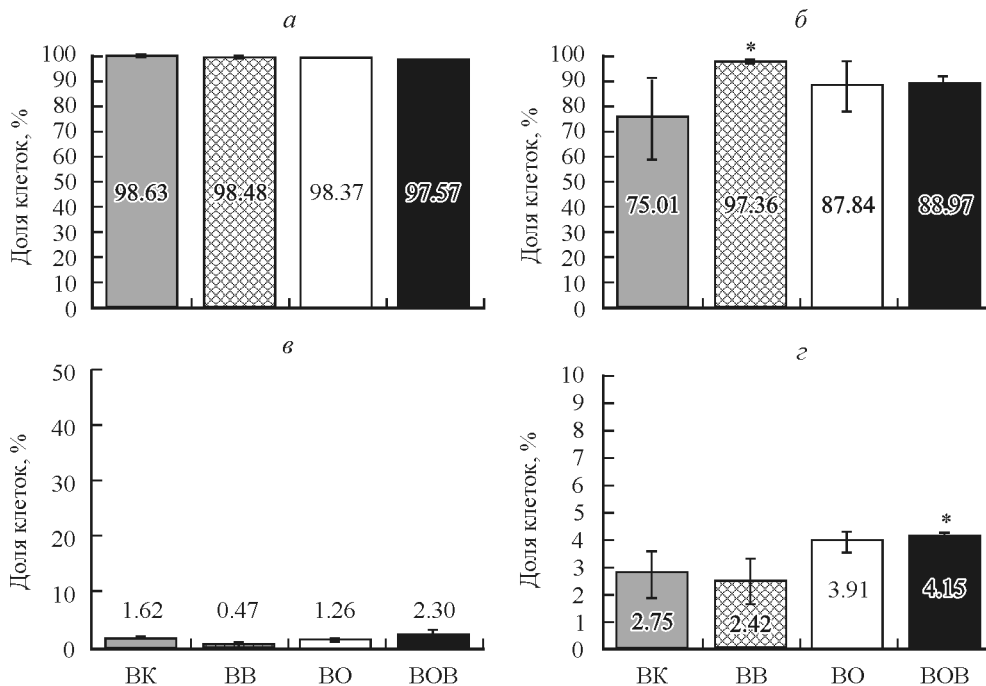


Рис. 3. Иммунофенотип клеток костного мозга бедренной кости крыс линии Wistar после периода 2-недельной реадаптации на 18-е сут культивирования.

По вертикали — доля клеток, экспрессирующих маркеры CD90 (а), CD73 (б), CD45 (в) и CD11b (г). Данные представлены в форме  $M \pm m$ , звездочка — достоверные отличия от показателя контрольной группы ( $p < 0.05$ ).



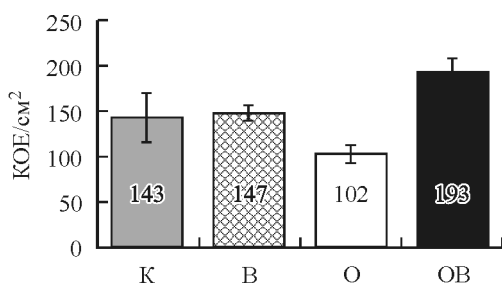


Рис. 4. Число гемопоэтических колоний, образованных миелоидными предшественниками костного мозга крыс линии Wistar, после моделирования факторов космического полета.

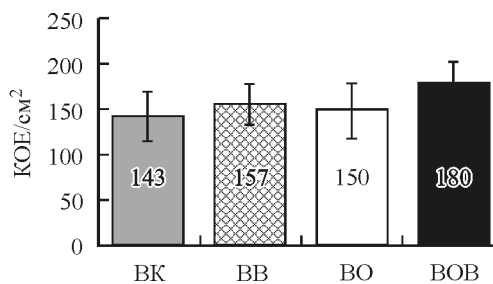


Рис. 6. Число гемопоэтических колоний, образованных миелоидными предшественниками костного мозга бедренной кости крыс, после 2-недельной реадaptации.

Таблица 1

Число КОЕ разных миелоидных ростков в костном мозге крыс после моделирования факторов космического полета

Группа животных	КОЕ-ГМ	КОЕ-Г	КОЕ-М
К	20 ± 11	94 ± 46	31 ± 10
В	40 ± 3	93 ± 18	14 ± 9
О	13 ± 2	35 ± 1 <sup>a</sup>	39 ± 13
ОВ	31 ± 13	101 ± 44	62 ± 16

<sup>a</sup> Достоверное отличие от контроля,  $p < 0.05$ .

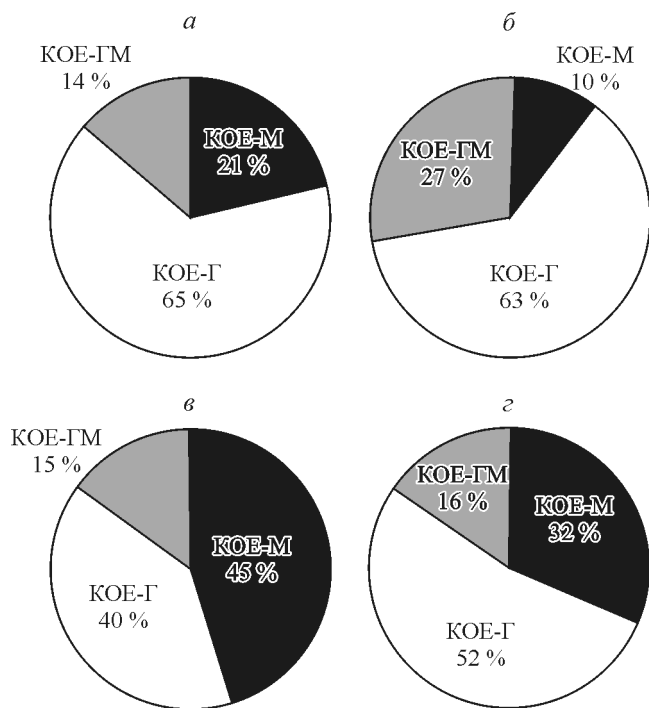


Рис. 5. Соотношение разных типов гемопоэтических колоний, образованных гемопоэтическими предшественниками костного мозга бедренной кости крыс линии Wistar, после моделирования факторов космического полета.

а — контроль, б — вывешивание, в — облучение, г — комбинированное действие облучения и вывешивания.

изменения иммунофенотипа, неустановленным характером влияния на клетки факторов гиподинамии и облучения (Штемберг, 2014); кроме того, имеются данные о том, что в 50 % случаев низкие дозы  $\gamma$ -облучения приводят к увеличению числа гемопоэтических колоний *in vitro* (Домарацкая и др., 2003).

Снижение числа колоний в группе О в основном происходило за счет уменьшения количества КОЕ-ГМ и КОЕ-Г, причем снижение числа КОЕ-Г было наиболее выраженным (табл. 1). В группе ОВ увеличивалось число всех типов КОЕ, но более всего увеличилось число КОЕ-М (табл. 1).

Следует отметить изменение соотношения разных типов гемопоэтических колоний в экспериментальных группах по сравнению с контролем (рис. 5). В группе В доля КОЕ-ГМ увеличилась в 2 раза по сравнению с контролем, доля КОЕ-М уменьшилась вдвое. В группах О и ОВ доля КОЕ-М возросла в 2 и 1.5 раза соответственно, доля КОЕ-Г снизилась в 1.3—1.6 раза. После вывешивания число колоний, образованных ранними плюрипотентными предшественниками, было больше (30 %) по сравнению с остальными группами (15 %), в которых соотношение плюри- и монопотентных колоний было одинаковым.

После 14 сут реадaptации общее количество КОЕ приблизилось к контрольным значениям (рис. 6). Число колоний в группе ВО увеличилось в 1.6 раза, в основном за счет увеличения числа КОЕ-Г, а в группе ВОВ незначительно снизилось из-за уменьшения числа КОЕ-М (табл. 2). Соотношение долей гемопоэтических КОЕ разных типов после 2-недельной реадaptации вернулось к контрольным значениям (рис. 7). Увеличилась доля КОЕ-Г во всех группах, при этом доля КОЕ-М в группах ВО и ВОВ снизилась в 2—2.5 раза. Доля КОЕ-ГМ уменьшилась также во всех группах, наиболее значительно в группе ВВ — в 2 раза, а в группах ВО и ВОВ — незначительно. Соотношение плюри- и монопотентных колоний во

Таблица 2

Число КОЕ разных миелоидных ростков в костном мозге крыс после периода 2-недельной реадaptации

Группа животных	КОЕ-ГМ	КОЕ-Г	КОЕ-М
ВК	20 ± 11	94 ± 46	31 ± 19
ВВ	19 ± 8	117 ± 32	21 ± 7
ВО	12 ± 9	111 ± 46	27 ± 8
ВОВ	19 ± 11	128 ± 23	33 ± 17

всех группах после периода восстановления было сходным.

Пролиферативная активность клеток первичной культуры костного мозга. Анализ числа удвоений популяций клеток (PD) показал, что изменения пролиферативной активности произошли только в группе В, где этот показатель был максимальным (рис. 8, *a*). Следует отметить тенденцию к снижению пролиферативной активности в группе комбинированного воздействия двух факторов. Возможно, что вывешивание нарушает взаимодействие между стромальными и гемопоэтическими клетками (это предположение подтверждается данными по числу выделенных клеток и иммунофенотипированию), приводя к активации пролиферации стромальных клеток при вывешивании. В группе ОВ действие двух факторов приводило к незначительному снижению пролиферативной активности клеток КМ.

После 2-недельной реадaptации пролиферативная активность мононуклеаров КМ крыс в группах статистически не отличалась от контроля (рис. 8, *b*). Стоит отметить, что относительное снижение этого показателя в группе ВВ уменьшилось по сравнению со значениями, полученными после вывешивания. Ранее было показано, что при культивировании клеток КМ грызунов (первичной культуры) гемопоэтические клетки негативно влияют на пролиферацию стромальных предшественников (Phinney et al., 1999; Anjos-Afonso et al., 2004). Во время реадaptации могло восстановиться взаимодействие стромальных и гемопоэтических клеток, что и отразилось на пролиферативной активности первых. В группе ВО не происходило значимого изменения пролиферации. Комбинированное действие факторов оказывало выраженное негативное влияние на пролиферативную активность клеток КМ (низкое значение показателя PD в группах ОВ и ВОВ), отсутствие увеличения PD после периода реадaptации может являться следствием неполного восстановления после повреждающего воздействия.

При анализе влияния моделирования факторов КП на первичную культуру КМ необходимо учитывать, что она представлена гетерогенной популяцией клеток (Анохина, Буравкова, 2007), которые неодинаково реагируют на действия разных экстремальных факторов. Гемопоэтические клетки наиболее чувствительны к действию ионизирующего излучения (Green, Rubin, 2014), в то время как стромальные клетки сильнее реагируют на изменение кинетико-динамической нагрузки (Буравкова и др., 2010; Delaine-Smith, Reilly, 2012). Из-за этого ответ клеток, вхо-

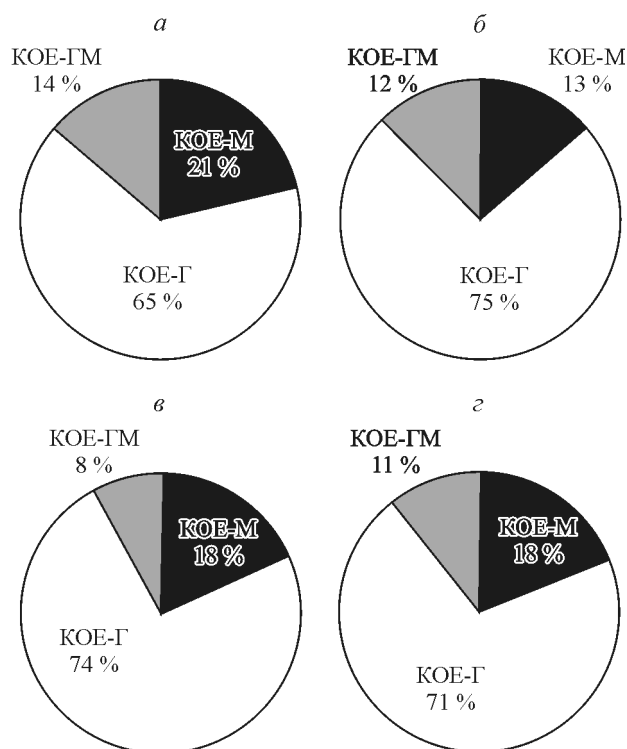


Рис. 7. Соотношение разных типов гемопоэтических колоний, образованных гемопоэтическими предшественниками костного мозга бедренной кости крыс линии Wistar, после периода 2-недельной реадaptации.

*a* — контроль, *б* — вывешивание, *в* — облучение, *z* — комбинированное действие облучения и вывешивания.

дящих в состав КМ, на различные действия может различаться.

КОЕ-ф. Для анализа функциональной активности стромальных предшественников были определены число КОЕ-ф и площадь, занимаемая ими. Число КОЕ-ф групп В, О и ОВ снижалось, особенно в группе ОВ, что свидетельствует о негативном влиянии ионизирующего излучения и вывешивания на клоногенную активность стромальных предшественников КМ крыс (рис. 9, *a*). После 2-недельного восстановления число колоний в группах ВВ, ВО и ВОВ увеличилось до контрольных значений (рис. 9, *б*). Такой же характер носило изменение площади, занятой колониями.

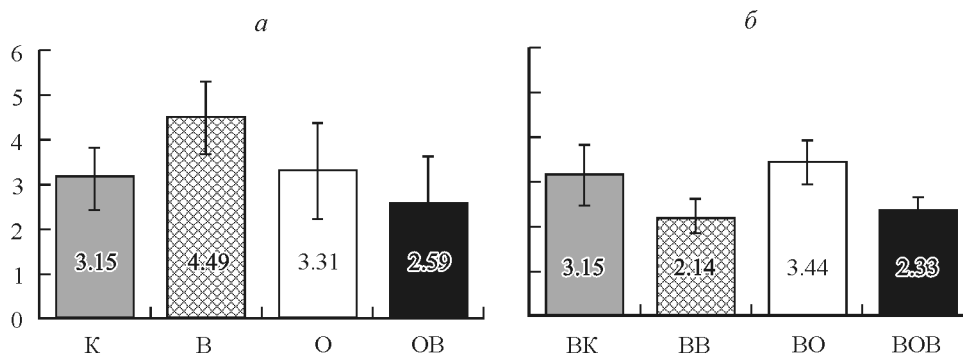


Рис. 8. Число удвоений популяций клеток в культуре костного мозга бедренной кости крыс линии Wistar, после моделирования факторов космического полета (*a*) и после периода 2-недельной реадaptации (*б*).

Данные представлены в форме  $M \pm m$ , звездочка — достоверное различие значений в группах вывешивания до и после периода реадaptации ( $p < 0.05$ ).

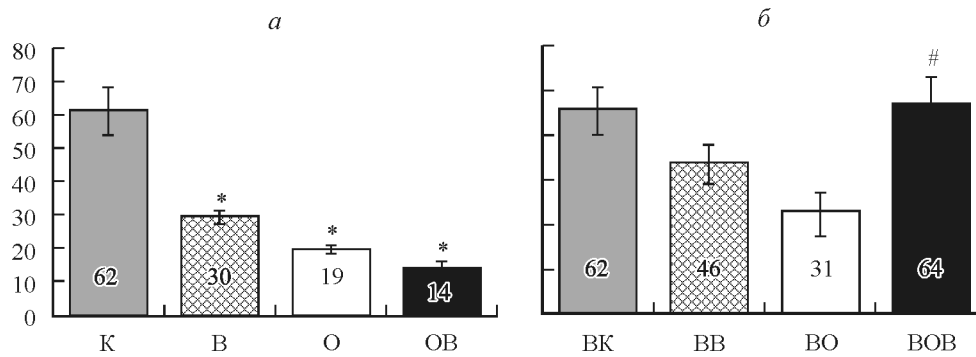


Рис. 9. Количество КОЕ-ф, образованных стромальными предшественниками костного мозга бедренной кости крыс линии Wistar, после моделирования факторов космического полета (а) и после периода 2-недельной адаптации (б).

По вертикали — количество КОЕ-ф, данные представлены в форме  $M \pm m$ , звездочка — достоверное отличие от значений в контрольной группе ( $p < 0.05$ ), решетка — достоверное различие значений в группах комбинированного воздействия до и после периода реадaptации от показателя контрольной группы ( $p < 0.05$ ).

Остеодифференцировка. Спонтанный остеогенный потенциал клеток КМ крыс был одинаковым во всех экспериментальных группах после действия факторов весовой разгрузки и облучения (рис. 10, а). Стоит отметить небольшое снижение числа зон с низкой активностью щелочной фосфатазы в группе В. Хотя средние значения активности фермента не различались между

клетками разных групп, наблюдалась тенденция к увеличению в группе В и уменьшению в группах О и ОВ (рис. 10, а). После индукции остеодифференцировки доля клеток с низкой активностью щелочной фосфатазы в группе В увеличилась (рис. 10, б).

В период восстановления спонтанный остеопотенциал клеток групп ВВ, ВО и ВОВ был снижен, что при уси-

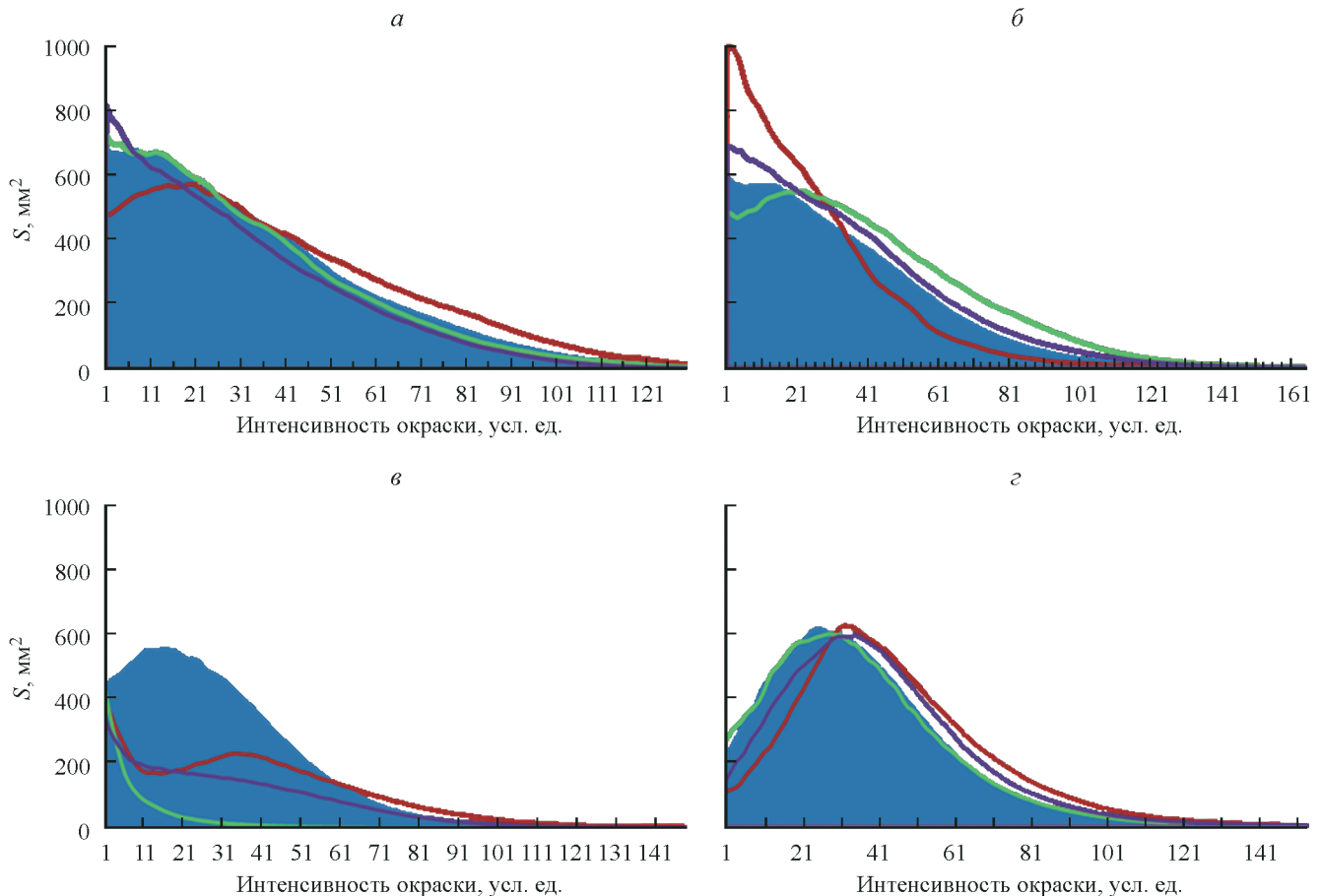


Рис. 10. Остеогенный потенциал стромальных предшественников костного мозга бедренной кости крыс линии Wistar. а, в — спонтанный остеопотенциал после моделирования факторов космического полета и периода 2-недельной реадaptации; б, г — индуцированная остеодифференцировка в клетках костного мозга крыс после моделирования факторов космического полета и периода 2-недельной реадaptации. Синий цвет — виварный контроль, красный — вывешивание, зеленый — облучение, фиолетовый — комбинированное действие облучения и вывешивания.



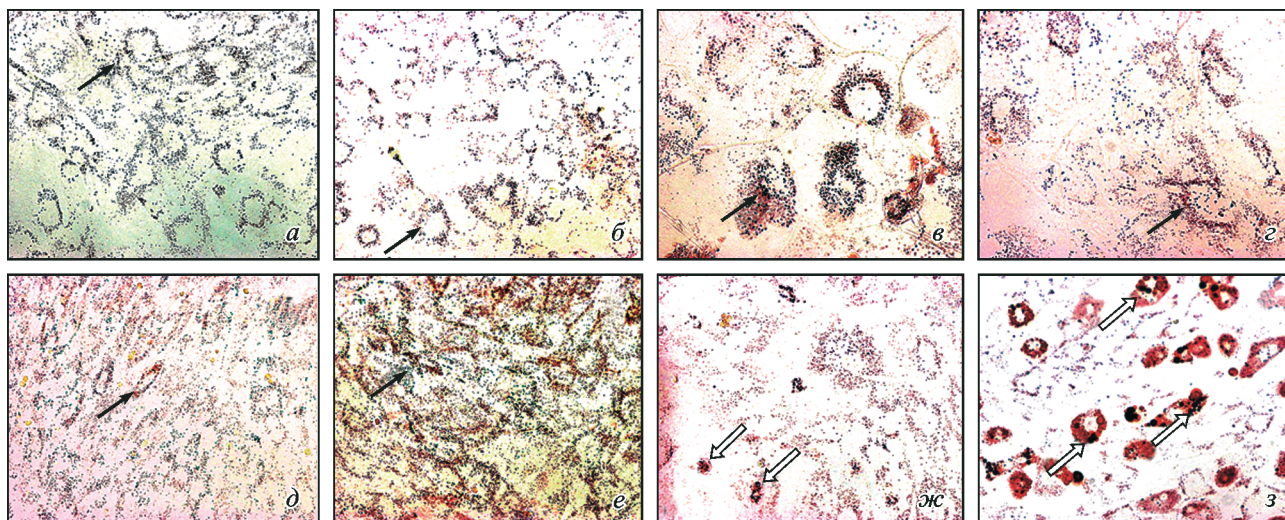


Рис. 11. Липидные включения в цитоплазме стромальных клеток костного мозга крыс линии Wistar после моделирования факторов космического полета.

*a—z* — спонтанный адипопотенциал стромальных клеток костного мозга крыс; *д—з* — индуцированная адиподифференцировка в стромальных клетках костного мозга. *a, д* — контроль; *б, е* — вывешивание; *в, ж* — облучение; *з, з* — комбинированное действие облучения и вывешивания. *Одинарные стрелки* — мелкие липидные включения, *двойные стрелки* — крупные липидные капли. Окраска Oil Red O, 40×.

ленной пролиферативной активности говорит о меньшей коммитированности стромальных предшественников КМ, т. е. о возможном обновлении стромального дифферона (рис. 10, в). После индукции остеодифференцировки в стромальных предшественниках КМ активность щелочной фосфатазы увеличилась до уровня контроля (рис. 10, з). Следует отметить, что в контрольной группе число клеток, коммитированных в остеонаправление, до индукции и после было одинаковым, но средняя активность фермента увеличилась после индукции. Постоянный высокий уровень активности щелочной фосфатазы в контрольной группе свидетельствует о том, что в нормальных условиях (в отсутствие стрессовых воздействий) стромальные предшественники КМ крыс предкоммитированы.

**Адиподифференцировка.** После моделирования факторов КП было выявлено большое количество мелких липидных включений в клетках (рис. 11). После индукции адипогенеза в группах облучения (О и ОВ) наблюдается усиление адипогенеза, появляются клетки с большим количеством крупных липидных капель (рис. 11). Это может свидетельствовать о негативном влиянии комбинированного воздействия факторов, так как показано, что при воздействии ионизирующего излучения или весовой разгрузке происходит усиление адипогенеза при уменьшении остеопотенциала этих клеток (Буравкова и др., 2010; Green et al., 2014).

После реадaptации качественная оценка микрофотографий показала тенденцию к уменьшению выраженности спонтанного адипопотенциала клеток эксперименталь-

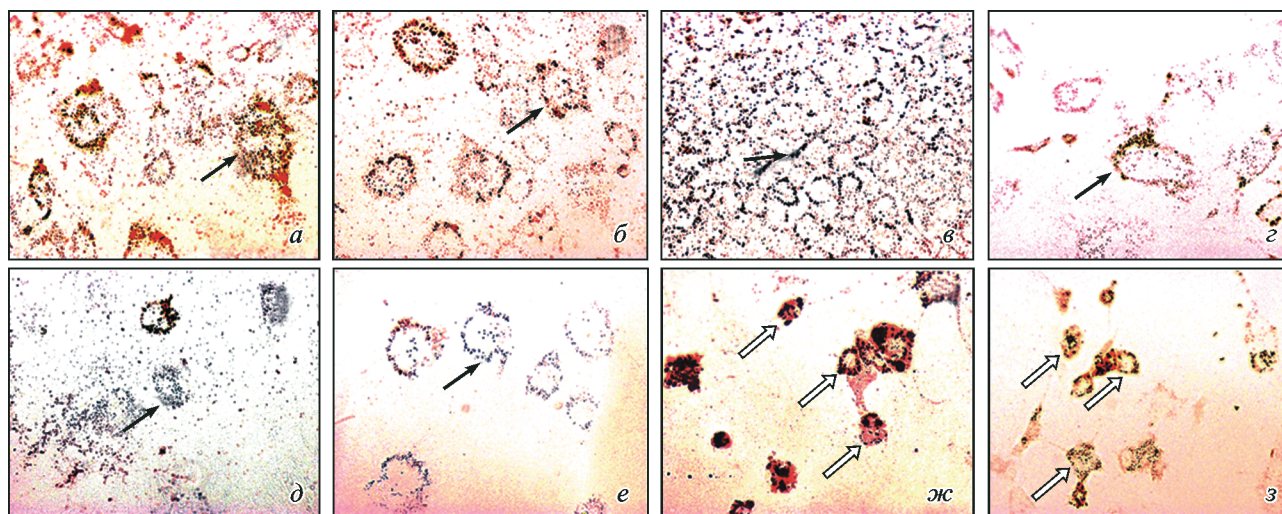


Рис. 12. Липидные включения в цитоплазме стромальных клеток костного мозга крыс линии Wistar после периода 2-недельной реадaptации.

*a—z* — спонтанный адипопотенциал стромальных клеток костного мозга крыс; *д—з* — индуцированная адиподифференцировка в стромальных клетках костного мозга. *a, д* — контроль; *б, е* — вывешивание; *в, ж* — облучение; *з, з* — комбинированное действие облучения и вывешивания. *Одинарные стрелки* — мелкие липидные включения, *двойные стрелки* — крупные липидные капли. Окраска Oil Red O, 40×.



ных групп (рис. 12). После индукции адиподифференцировки в группах, подвергшихся облучению (ВО и ВОВ), в отличие от контроля наблюдали клетки с крупными липидными включениями (рис. 12), что косвенно свидетельствует о выраженной адиподифференцировке стромальных предшественников КМ этих групп.

Усиление остео- и адиподифференцировки после реадaptации говорит об обновлении клеток стромального дифферона после повреждающего воздействия факторов весовой разгрузки и ионизирующего излучения.

### Обсуждение

В составе КМ можно выделить разные популяции клеток-предшественников, которые обладают разной чувствительностью к весовой разгрузке и воздействию радиации. ГСК более чувствительны к действию ионизирующего излучения (Green, Rubin, 2014). Стромальные предшественники, в том числе и мультипотентные мезенхимные стволовые клетки, более устойчивы к влиянию ионизирующего излучения (Green, Rubin, 2014), являются механочувствительными клетками (Буравкова и др., 2010; Delaine-Smith, Reilly, 2012), поэтому негативные последствия антиортоостатического вывешивания в них выражены сильнее. Возможно, что разнонаправленные эффекты обусловлены характером ответа гетерогенной культуры клеток КМ на одновременное воздействие разных по природе факторов. При моделировании эффектов микрогравитации изменяется цитоскелет и ухудшаются адгезивные свойства стромальных предшественников КМ (Гершович и др., 2004). Развивающиеся остеоопения и остеоопороз (Shahnazari et al., 2012; Green, Rubin, 2014), возможно, являются причиной увеличения числа выделенных мононуклеаров непосредственно после вывешивания. Восстановление пула стромальных прогениторов в период реадaptации приводит к снижению числа выделенных клеток. Это согласуется с данными по иммунофенотипированию культуры КМ.

Опорная разгрузка приводит к увеличению доли клеток, несущих стромальные маркеры среди выделенных мононуклеаров, в то время как на фоне облучения доля клеток CD73<sup>+</sup> была наименьшей, т. е. большая часть этих клеток осталась в периостальных синусах. Во фракции выделенных клеток КМ после облучения, возможно, усиливались межклеточные взаимодействия с гемопоэтическими клетками, что объясняет высокую долю содержания клеток CD45<sup>+</sup> на поздних сроках культивирования, что не характерно для культуры КМ крыс (Паюшина и др., 2004). В период реадaptации после моделирования факторов КП, вероятно, происходит восстановление межклеточного взаимодействия и адгезивных свойств клеток КМ. Следует отметить статистически значимое снижение клоногенной активности адгезированных клеток по сравнению с контролем и ослабление индуцированной остеоидифференцировки стромальных прекурсоров. Кроме того, увеличение числа адипоцитов в группах О и ОВ является следствием замещения поврежденных гемопоэтических клеток жировыми, а усиление адиподифференцировки, особенно в группе комбинированного воздействия, — результат повреждения клеток стромального дифферона (Green, Rubin, 2014). Увеличение числа колоний после периода реадaptации демонстрирует восстановление клеточности стромального пула. Кроме этого, снижение спонтанного остеопотенци-

ала относительно контроля, усиление дифференцировочных потенциалов в остео- и адипонаправлениях показывает обновление популяции стромальных предшественников.

Наибольший негативный эффект на ГСК оказало ионизирующее излучение. Число колоний в этой группе было наименьшим, причем наиболее сильно пострадали гранулоцитарные предшественники. Интересно, что при комбинированном воздействии такого не наблюдается, кроме этого, увеличивалось число макрофагальных предшественников, что может демонстрировать усиление врожденного иммунитета и последующее повышение активности макрофагов, характерных для облучения в малых дозах (Pandey et al., 2005). Нельзя исключить и усиление резорбции кости при комбинированном воздействии факторов и связанным с этим увеличением остеокластов, являющихся по своей сути макрофагами (Blaber et al., 2013). Отсюда следует, что гранулоцитарные предшественники более чувствительны к действию ионизирующего излучения. Кроме этого, можно сделать вывод о том, что весовая разгрузка и ионизирующее излучение могут приводить к активации врожденного иммунитета, в том числе и при их комбинированном воздействии (Аклеев, 2009).

Интересно сравнить результаты, полученные в ходе наземного моделирования эффектов КП с данными, полученными после реального КП. Так, после полетов крыс Вистар на биоспутниках «Космос» продолжительностью 7—22 сут выявлено снижение числа прогениторных гемопоэтических клеток в КМ (Каландрова и др., 1981; Vacek et al., 1982, 1991; Domaratskaya et al., 2002) и угнетение эритроидного и лимфоидного ростков при усилении гранулоцитопоэза (Швец и др., 1984; Газенко и др., 1987). Аналогичные данные получены в эксперименте на СЛС-2 с крысами линии Спейг-Доули после 13—14 сут пребывания в условиях невесомости. Анализ КМ полетных крыс свидетельствует о торможении эритропоэза и лимфопоэза, снижении числа циркулирующих эритроцитов и лимфоцитов, усилении гранулоцитопоэза, появлении недифференцированных клеток и снижении активности иммунных клеток при сохранении митотической активности клеток КМ (Allebban et al., 1996; Ichiki et al., 1996; Lesnyak et al., 1996). Таким образом, анализ гемопоэза выявил угнетающее действие факторов космического полета, которое носило обратимый характер и полностью компенсировалось через 25—27 сут реадaptации (Vacek et al., 1985).

Полеты на биоспутниках «Космос» разной продолжительности приводили к уменьшению массы минерализованной ткани, особенно в длинных трубчатых костях, увеличению жировой ткани в костном мозге, снижению количества остеобластов при сохранении или увеличении числа остеокластов и появлению их ранних предшественников, угнетению периостального ремоделирования в трубчатых костях (Jee et al., 1983; Wronski, Morey, 1983; Рогачева и др., 1984; Дурнова и др., 1990). Кроме того, было продемонстрировано уменьшение числа КОЕ-ф у полетных животных (Швец, Кривенкова, 1977; Vacek et al., 1990), происходило снижение активности щелочной фосфатазы и повышение активности кислой фосфатазы в костях (Григорьев, Ильин, 2007). Результаты, полученные в эксперименте в СЛС-1 и СЛС-2, показали, что после 9—14 сут пребывания в условиях невесомости имелись начальные признаки развития остеоопении большеберцовой кости и торможения роста кости в длину, а

также наличие моноклеарных клеток-предшественников остеокластов (Григорьев, Ильин, 2007).

В рамках возобновленной программы «Бион» после 30 сут полета биоспутника «Бион-М1» нами было показано уменьшение числа кариоцитов КМ мышей после полета с последующим восстановлением в течение 2 нед реадaptации к земным условиям (Андреева и др., 2014). При этом факторы КП не оказали негативного влияния на пролиферативную активность, число КОЕ-ф и спонтанные остео- и адипопотенциал стромальных предшественников КМ мышей линии C57BL/6N. После 7-дневной реадaptации выявлено снижение пролиферативной активности и эффективности прикрепления стромальных клеток КМ мышей (Маркина и др., 2015). При этом в КМ мышей наблюдали значительное снижение эритропоэза, в том числе на уровне общего миелоидного предшественника — КОЕ-ГЭММ, и неполное восстановление соотношения миелоидных и эритроидных КОЕ (Сотнезова и др., 2016).

Интересно отметить, что при проведении эксперимента с дополнительной лучевой нагрузкой  $\gamma$ -облучением в дозе 2 сГр на борту биоспутника «Космос-690» данные в общем были сопоставимы с результатами, полученными на других биоспутниках, но при этом изменялась чувствительность клеток к ионизирующему излучению (Григорьев и др., 1977). Был отмечен более активный миелопоэз у облученных животных, что выражалось в высоком уровне лейкоцитов, нейтрофилов и молодых форм гранулоцитов (Григорьев и др., 1977; Portugalov et al., 1977). Морфологический анализ селезеночных колоний показал отсутствие существенных нарушений потенции к дифференцировке ГСК. Способность к формированию колоний эритроидного и миелоидного типов не изменялась (Григорьев и др., 1977; Portugalov et al., 1977). Кроме этого, был показан более выраженный эффект облучения на радиорезистентные клетки (Григорьев и др., 1977) по сравнению с другими биоспутниками. В данной работе комбинированное действие весовой разгрузки и ионизирующего излучения на прогениторные клетки также носило неоднозначный характер. Частичное повреждение стромальных предшественников, являющихся компонентами ниши ГСК костного мозга, так называемого гемпродуцирующего микроокружения, приводит к изменению миелопоэза.

Таким образом, при моделировании эффектов двух основных факторов КП — весовой разгрузки и облучения — клеточность и пролиферативная активность клеток КМ крыс не изменялись. Происходило снижение доли клеток CD73<sup>+</sup> при облучении и увеличение доли клеток CD45<sup>+</sup> и CD11b<sup>+</sup>. При этом снижалось число гемических колоний за счет КОЕ-Г, а облучение на фоне вывешивания увеличивало их число за счет КОЕ-М. Дифференцировка гранулоцитов была снижена, в том числе и на уровне ранних предшественников, на фоне активации макрофагальных предшественников. Число КОЕ-ф во всех экспериментальных группах было снижено, а спонтанный и индуцированный остеопотенциал стромальных предшественников остался неизменным. Индуцированная адиподифференцировка при облучении усиливалась.

После периода 2-недельной реадaptации произошло восстановление функциональной активности прогениторных клеток КМ, кроме того, полученные нами данные говорят об обновлении пула стромальных предшественников в костном мозге крыс. Таким образом, 30-суточное моделирование факторов КП (опорная разгрузка и иони-

зирующее излучение) оказывает негативное влияние на нишу прогениторных клеток КМ крыс, но повреждения являются обратимыми и не затрагивают пула прогениторов на ранней стадии дифференцировки, о чем свидетельствует обновление стромальных и гемических предшественников в период 2-недельной реадaptации после моделирования условий КП.

Работа выполнена в рамках Госзадания Института медико-биологических проблем РАН и при частичной финансовой поддержке Программы НШ-7471.2016.4.

### Список литературы

- Аклеев А. В. 2009. Реакции тканей на хроническое воздействие ионизирующего излучения. Радиационная биология. Радиоэкология. 49 (31) : 5—20. (Akleev A. V. 2009. Reaction of tissues to chronic exposure to ionizing radiation. Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya. 49 (31) : 5—20.)
- Андреева Е. Р., Гончарова Е. А., Горностаева А. Н., Григорьева О. В., Буравкова Л. Б. 2014. Характеристика кариоцитов костного мозга большеберцовой кости мышей после космического полета на биоспутнике «Бион-М1». Авиакосм. и эколог. мед. 48 (2) : 5—11. (Andreeva E. R., Goncharova E. A., Gornostaeva A. N., Grigor'eva O. V., Buravkova L. B. 2014. Bone marrow mononuclear cells from murine tibia after spaceflight on biosatellite «Bion-M1». Aviakosm. Ekolog. Med. 48 (2) : 5—11.)
- Анохина Е. Б., Буравкова Л. Б. 2007. Гетерогенность стромальных клеток-предшественников, выделенных из КМ крыс. Цитология. 49 (1) : 40—47. (Anokhina E. B., Buravkova L. B. 2007. Heterogeneity of stromal precursor cells isolated from rat bone marrow. Tsitologiya. 49 (1) : 40—47.)
- Буравкова Л. Б., Гершович П. М., Гершович Ю. Г., Григорьев А. И. 2010. Механизмы гравитационной чувствительности остеогенных клеток-предшественников. Acta Naturae. 2 (14) : 30—39. (Buravkova L. B., Gershovich P. M., Gershovich J. G., Grigor'ev A. I. 2010. Mechanisms of gravitational sensitivity of osteogenic precursor cells. Acta Naturae. 2 (14) : 28—36.)
- Газенко О. Г., Ильин Е. А., Савина Е. А., Серова Л. В., Капланский А. С., Оганов В. С., Попова И. А., Смирнов К. В., Константинова И. В. 1987. Эксперимент на крысах, экспонированных на биоспутнике «Космос-1667». Косм. авиакосм. мед. 21 (4) : 9—16. (Gazenko O. G., Ilyin E. A., Savina E. A., Serova L. V., Kaplansky A. S., Oganov V. S., Popova I. A., Smirnov K. V., Konstantinova I. V. 1987. The experiment on rats exposed aboard «Kosmos-1667 biosatellite». Kosm. Aviakosm. Med. 21 (4) : 9—16.)
- Гершович П. М., Гершович Ю. Г., Буравкова Л. Б. 2004. Роль мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток КМ в адаптации клеток остеогенного дифферона к микрогравитации. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 96 (4) : 406—418. (Gershovich P. M., Gershovich J. G., Buravkova L. B. 2004. The role of multipotent mesenchymal stromal cells in adaptation of cells of osteogenic differon to microgravity. Formely I. M. Sechenov Physiol. J. 96 (4) : 406—418.)
- Григорьев А. И., Ильин Е. А. 2007. Животные в космосе. Вестн. РАН. 77 (11) : 963—986. (Grigor'ev A. I., Ilyin E. A. 2007. Animals in the space. Herald of the RAS. 77 (11) : 963—986.)
- Григорьев Ю. Г., Дружинин Ю. П., Вериге В. В., Ильин Е. А. 1977. Основные задачи и результаты радиобиологического эксперимента на борту биоспутника «Космос-690». Косм. биол. авиакосм. мед. 5 : 58—66. (Grigoriev Yu. G., Druzhinin Yu. P., Verigo V. V., Ilyin E. A. 1977. Main tasks and results of the radiobiological experiment aboard the Cosmos-690 biosatellite. Kosm. Biol. and Aviakosm. Med. 5 : 58—66.)
- Домарацкая Е. И., Старостин В. И., Цетлин В. В., Буеверова Э. И., Хрущев Н. Г. 2003. Эффект 10-суточного  $\gamma$ -облучения в низких дозах на костномозговые клетки мыши. Радиационная биология. Радиоэкология. 43 (2) : 213—215. (Domarat-skaya E. I., Starostin V. I., Tsetlin V. V., Bueverova E. I.,

- Khrushchev N. G. 2003. Effects of ten day long exposure to  $\gamma$ -irradiation at low doses on bone marrow cells in mice. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya*. 43 (2) :213—215.)
- Дурнова Г. Н., Капланский А. С., Ильина-Какуева Е. И., Сахарова З. Ф. 1990. Гистоморфометрический анализ костей крыс, экспонированных на биоспутнике «Космос-1887». *Косм. биол. авиакосм. мед.* 24 (5) : 42—45. (Durnova G. N., Kaplan-sky A. S., Ilyina-Kakueva E. I., Sakharova Z. F. 1990. Histomorphometric analysis bone of rat exposed onboard «Kosmos-1887» biosatellite. *Aviakosm. Ekolog. Med.* 24 (5) : 42—45.)
- Каландрова М. П., Родина Г. П., Серова Л. В. 1981. Особенности течения физиологической и репаративной регенерации КМ крыс, экспонированных на биоспутниках «Космос-605 и 690». *Проблемы гематологии и переливания крови*. 26 (12) : 26—30. (Kalandrova M. P., Rodina G. P., Serova L. V. 1981. Peculiarities of physiological and reparative regeneration of the bone marrow of rats exposed to biosatellites «Kosmos-605 and 690». *Problemy Gematologii i Perelivaniya Krovi*. 26 (12) : 26—30.)
- Маркина Е. А., Бобылева П. И., Андрианова И. В., Андреева Е. Р., Буравкова Л. Б. 2015. Характеристика популяции стромальных предшественников костного мозга мышей C57BL/6N после полета на биоспутнике «Бюн-М1». *Авиакосм. и эколог. мед.* 49 (6) : 41—48. (Markina E. A., Bobyleva P. I., Andrianova I. V., Andreeva E. R., Buravkova L. B. 2015. Profile of the marrow-derived stromal precursors population in C57BL/6N mice flown on biosatellite «Bion-M1». *Aviakosm. Ekolog. Med.* 49 (6) : 41—48.)
- Паюшина О. В., Бувверова Э. И., Самдыкова Г. П., Старостин В. И., Доморацкая Е. И., Хрущов Н. Г. 2004. Сравнительное исследование мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из КМ и эмбриональной печени мыши и крысы. *Изв. РАН. Сер. биол.* 6 : 659—664. (Payushina O. V., Bueverova E. I., Satdykova G. P., Starostin V. I., Domaratskaya E. I., Khrushchev N. G. 2004. Comparative study of mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and fetal liver of mouse and rat. *Izvestiya RAS. Ser. Biol.* 6 : 659—664.)
- Рогачева И. В., Ступаков Г. Н., Волжин А. И., Павлова М. Н., Поляков А. Н. 1984. Характеристика костной ткани крыс после полета на биоспутнике «Космос-1129». *Косм. биол. и авиакосм. мед.* 18 (5) : 39—44. (Rogacheva I. V., Stupakov G. N., Volozhin A. I., Pavlova M. N., Polyakov A. N. 1984. Characteristics of bone tissue of rats after flight biosatellite «Kosmos-1129». *Kosm. Biol. Aviakosm. Med.* 18 (5) : 39—44.)
- Сотнезова Е. В., Маркина Е. А., Андреева Е. Р., Буравкова Л. Б. 2016. Миелоидные предшественники в костном мозге мышей после 30-суточного полета на биоспутнике «Бюн-М1». *Бюл. эксперим. биол. мед.* 162 (10) : 495—499. (Sotnezova E. V., Markina E. A., Andreeva E. R., Buravkova L. B. 2016. Myeloid precursors in the bone marrow of mice after a 30-day space mission on a Bion-M1 Biosatellite. *Bull. Exp. Biol. Med.* 162 (4) : 496—500.)
- Швец В. Н., Вацек А., Козинец Г. И., Бритван И., Корольков В. И., Чельная Н. А. 1984. Состояние гемопоэза у крыс, находившихся в невесомости. *Косм. биол. авиакосм. мед.* 11 (4) : 12—16. (Shvetz V. N., Vacek A., Kozinets G. I., Britvan I., Korol'kov V. I., Chelnaya N. A. 1984. Hematopoiesis state in rats after weightlessness. *Kosm. Biol. Aviakosm. Med.* 11 (4) :12—16.)
- Швец В. Н., Кривенкова Н. П. 1977. Морфология клеток костного мозга крыс на биоспутнике «Космос-605». *Косм. биол. авиакосм. мед.* 4 (6) : 75—78. (Shvetz V. N., Krivenkova N. P. 1977. Morphology of bone marrow cells of rats on board «Cosmos-605» biosatellite. *Kosm. Biol. Aviakosm. Med.* 4 : 12—16.)
- Штемберг А. С. 1992. Комбинированное действие антиортостатической гиподинамии и гамма-облучения на высшую нервную деятельность крыс. *Авиакосм. эколог. мед.* 26 (4) : 64—67. (Shtemberg A. S. 1992. The combined action of head-down tilt hypodynamia and gamma irradiation on higher nervous activity in rats. *Aviakosm. Ekolog. Med.* 26 (4) : 64—67.)
- Штемберг А. С. 2014. Проблемы экспериментального исследования комбинированного действия факторов космического полета на функции организма животных. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*. 100 (10) : 1152—1168. (Shtemberg A. S. 2014. Problems of experimental studies of combined action of space flight factors on functions of the animal organism. *Formely I. M. Sechenov Physiol. J.* 100 (10) : 1152—1168.)
- Штемберг А. С., Лебедева-Георгиевская К. Б., Матвеева М. И., Кудрин В. С., Наркевич В. Б., Клодт П. М., Базян А. С. 2014. Влияние факторов космического полета, моделируемых в наземном эксперименте, на поведение, дискримантное обучение и обмен моноаминов в различных структурах мозга крыс. *Изв. РАН. Сер. биол.* 2 : 168—175. (Shtemberg A. S., Lebedeva-Georgievskaya K. B., Matveeva M. I., Kudrin V. S., Narkevich V. B., Klodt P. M., Bazian A. S. 2014. Effect of space flight factors simulated in ground-based experiments on the behavior, discriminant learning, and exchange of monoamines in different brain structures of rats. *Izvestiya RAS. Ser. Biol.* (2) : 168—175.)
- Allebban Z., Gibson L. A., Lange R. D., Jago T. L., Strickland K. M., Johnson D. L., Ichiki A. T. 1996. Effects of spaceflight on rat erythroid parameters. *J. Appl. Physiol.* 81 : 117—122.
- Amos-Afonso F., Siapati E. K., Bonnet D. 2004. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J. Cell Sci.* 117 : 5655—5664.
- Blaber E. A., Dvorochkin N., Lee C. Alwood J. S., Yousuf R., Piero Pianetta, Globus R. K., Burns B. P., Almeida E. A. C. 2013. Microgravity induces pelvic bone loss through osteoclastic activity, osteocytic osteolysis, and osteoblastic cell cycle inhibition by CDKN1a/p21. *PLoS ONE*. 8 : e61372.
- Chowdhury P., Akel N., Jamshidi-Parsian A., Gaddy D., Griffin R. J., Yadlapalli J. S. K., Dobretsov M. 2016. Degenerative tissue responses to space-like radiation doses in a rodent model of simulated microgravity. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 46 : 190—197.
- Delaine-Smith R. M., Reilly G. D. 2012. Mesenchymal stem cell responses to mechanical stimuli. *Muscles, Ligaments and Tendons J.* 2 : 169—180.
- Domaratskaya E. I., Michurina T. V., Bueverova E. I., Payushina O. I., Butorina N. N., Khrushchov N. G., Starostin V. I. 2002. Studies on clonogenic hemopoietic cells of vertebrate in space: problems and perspectives. *Adv. Space Res.* 30 : 771—776.
- Globus R. K., Morey-Holton E. R. 2016. Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity. *J. Appl. Physiol.* (1985). 120 : 1196—1206.
- Green D. E., Rubin C. T. 2014. Consequences of irradiation on bone and marrow phenotypes, and its relation to disruption of hematopoietic precursors. *Bone*. 63 : 87—94.
- Ichiki A. T., Gibson L. A., Jago T. L., Strickland K. M., Johnson D. L., Lange R. D., Allebban Z. 1996. Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. *J. Leukocyte Biol.* 60 : 37—43.
- Lee W. S., Wronski T. J., Morey E. R., Kimmel D. B. 1983. Effects of spaceflight on trabecular bone in rats. *Amer. J. Physiol.* 244 : 310—314.
- Lesnyak A., Sonnenfeld G., Avery L., Konstantinova I., Rykova M., Meshkov D., Orlova T. 1996. Effect of SLS-2 Spaceflight on immunologic parameters of rats. *J. Appl. Physiol.* 81 : 178—182.
- Meirelles Lda S., Nardi N. B. 2003. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *Br. J. Haematol.* 123 : 702—711.
- Morey-Holton E. R., Globus R. K. 2002. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J. Appl. Physiol.* 92 : 1367—1377.
- Morey-Holton E. R., Globus R. K., Kaplansky A., Durnova G. 2005. The hindlimb unloading rat model: overview, technique update and comparison with space flight data. *Adv. Space Biol. Med.* 10 : 7—40.
- Nabavi N., Khandani A., Camirand A., Harrison R. E. 2011. Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion. *Bone*. 49 : 965—974.
- Pandey R., Shancar B. S., Sharma D., Sainis K. B. 2005. Low dose radiation induced immunomodulation: effect on macrophages and CD8+ T cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 81 : 801—812.
- Pani G., Verslegers M., Quintens R., Samari N., Louis de Saint-Georges, Patrick van Oostveldt, Baatout S., Benotmane M. A. 2016. Combined exposure to simulated microgravity and acute or



chronic radiation reduces neuronal network integrity and survival. PLoS ONE. 11 : e0155260.

Phinney D. G., Kopen G., Isaacson R. L., Procop D. G. 1999. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. J. Cell. Biochem. 72 : 570—585.

Portugalov V. V., Savina E. A., Kaplansky A. S., Yakovleva V. I., Durnova G. N., Pankova A. S., Shvets V. N., Alekseyev E. I., Katunyan P. I. 1977. Discussion of the combined effect of weightlessness and ionizing radiation on the mammalian body: morphological data. Aviat. Space Environ. Med. 48 : 33—36.

Shahnazari M., Kurimoto P., Boudignon B. M., Orwoll B. E., Bikle D. D., Halloran B. P. 2012. Simulated spaceflight produces a rapid and sustained loss of osteoprogenitors and an acute but transitory rise of osteoclast precursors in two genetic strains of mice. Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 303 : 1354—1362.

Smith S. M., Heer M., Shackelford L. C., Sibonga J. D., Spatz J., Pietrzyk R. A., Hudson E. K., Zwart S. R. 2015. Bone metabolism and renal stone risk during International Space Station missions. Bone. 81 : 712—720.

Vacek A., Bueverova E. I., Michurina T. V., Rotkovsky D., Serova L. V., Bartonickova A. 1990. Decrease in the number of progenitors of fibroblast (CFU(f)) in bone marrow of rats after a 14-days

flight onboard the Cosmos-2044 biosatellite. Folia Biol. 36 : 194—197.

Vacek A., Michurina T. V., Serova L. V., Rotkovsky D., Bartonickova A. 1991. Decrease in the number of progenitors of erythrocytes (BFUe, CFUe), granulocytes and macrophages (GM-CFC) in bone marrow of rats after a 14-days flight onboard the Cosmos-2044 biosatellite. Folia Biol. 37 : 35—41.

Vacek A., Serova L. V., Rotkovsky D., Mitchurina T. V., Damaratskaya E. I., Bartonickova A., Pryanishnikova O. D., Khrushchov N. G. 1985. Changes in the number of haemopoietic stem cells (CFUs) in bone marrow and spleens of pregnant rats after a short space flight onboard the Cosmos-1514 biosatellite. Folia Biol. (Praha). 31 : 61—65.

Vacek A., Tkadlecek L., Shvets V. N., Bartonickova A., Viklika S., Rotkovsky D., Serova L. V., Michurina T. V. 1982. Space flight effect on haemopoietic stem cells of the bone marrow of rats. Cell Tissue Kinetics. 15 : 643—649.

Wronski T. J., Morey E. R. 1983. Effect of spaceflight on periosteal bone formation in rats. Amer. J. Physiol. 244 : 305—309.

Zhu H., Wang H., Liu Z. 2015. Effects of real and simulated weightlessness on the cardiac and peripheral vascular functions of humans: a review. Int. J. Occup. Med. Environ. Health. 28 : 793—802.

Поступила 24 V 2017

#### THE INFLUENCE OF RADIATION AND HINDLIMB UNLOADING ON RATS' BONE MARROW PROGENITOR CELLS

E. A. Markina,<sup>1</sup> V. S. Kokhan, M. P. Roe, I. V. Andrianova,  
A. S. Stemberg, L. B. Buravkova

Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow, 123007;

<sup>1</sup> e-mail: goncharova-tim@list.ru, markina\_elena@imbp.ru

Bone marrow cells of mesenchymal origin play an important role in adaptation of physiological systems to space flight. Hemopoiesis, immunity and homeostasis of bone tissue depend on their functional activity. During the research within the framework of «Bion» and «Bion-M» programs the following data was received. Depression of lympho- and erythropoiesis in conditions of granulocyte-macrophage line activation the background of decreasing the number of rats' bone marrow hematopoietic progenitors takes place. Besides, the negative influence on nonhematopoietic bone marrow cells was shown. The mechanism of pathogenesis of ionic radiation and microgravity influence on bone marrow progenitor cells has remained unclear so far. The aim of the research was to study the impact of 30-day weight unloading and 6-fold  $\gamma$ -radiation on rats' bone marrow progenitors. The research has been conducted with male-rats from four groups: vivarium control, hindlimb unloading, irradiation and combine action. The following parameters have been defined: cellularity of bone marrow, proliferation activity of marrow nucleus cells, immunophenotype, number of hematopoietic CFU and CFU-f, differentiating potency of hematopoietic and stromal bone marrow precursors. While modeling space flight cellularity and proliferation activity of rats' bone marrow cells have not changed. The number of CFU-f has decreased. In condition of irradiation, the share of hematopoietic cell has increased on the background of decreasing the activity. Osteopotential of the stromal precursors has not changed and irradiation caused stimulation of adipodifferentiation. The functional activity of bone marrow progenitor cells was restored after two weeks of readaptation. Thus, 30-day modeling of space flight factors negativity affects morphofunctional properties of rats' bone marrow progenitor cells, but this effect is not fatal.

Key words: bone marrow progenitor, irradiation, hindlimb unloading.