

УДК 612.419:612.014.482+59.085+582.284

Д. І. Білько, І. З. Руссу, Н. М. Білько✉

Національний університет «Києво-Могилянська академія», вул. Г. Сковороди, 2, Київ, 04070, Україна

## ОЦІНКА РАДІОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ МЕЛАНІНОВИХ ПІГМЕНТІВ БАЗИДІОМІЦЕТІВ НА ГЕМОПОЕТИЧНУ СИСТЕМУ МИШЕЙ Balb/C ПРИ ОПРОМІНЕННІ ІОНІЗУЮЧОЮ РАДІАЦІЄЮ У СУБЛЕТАЛЬНІЙ ДОЗІ

**Мета:** оцінка радіопротекторної дії меланінових пігментів базидіоміцетів на кровотворні стовбурові клітини та клітини-попередники кісткового мозку мишей Balb/C у разі впливу іонізуючої радіації в сублетальній дозі.

**Матеріали і методи.** За допомогою оригінального методу культивування у гелевих дифузійних камерах *in vivo* клітин кісткового мозку мишей Balb/C було досліджено ефективність колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників тварин, яких було піддано дії іонізуючої радіації у сублетальній дозі, за умов застосування розчину меланінових пігментів базидіоміцетових грибів у якості радіопротектора.

**Результати та висновки.** Дослідження функціональної активності клітин-попередників кісткового мозку опромінених мишей Balb/C дозволило оцінити стан кровотворення за умов дії іонізуючої радіації та при попередній обробці тварин розчином меланінових пігментів у якості радіопротектора. Було з'ясовано, що під впливом іонізуючого випромінювання знижувалася колонієутворююча активність кісткового мозку мишей порівняно з контролем. Розчин меланінових пігментів був здатним підвищувати функціональну активність кісткового мозку опромінених тварин. Отримані результати радіопротекторної дії розчину меланінових пігментів базидіоміцетів на опромінені стовбурові клітини та їх нащадки (клітини-попередники) можуть бути підґрунтям для розробки засобів захисту організму людини від пошкоджуючої дії іонізуючої радіації.

**Ключові слова:** гемопоез, іонізуюча радіація, клітини-попередники, меланіни, культура клітин.

*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2019. Вип. 24. С. 210–219. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-210-219*

✉ Білько Надія Михайлівна, e-mail: [nadia.bilko@gmail.com](mailto:nadia.bilko@gmail.com)

D. I. Bilko, I. Z. Russu, N. M. Bilko✉

National University of Kyiv-Mohyla Academy, 2, Hryhoriia Skovorody St., Kyiv, 04070, Ukraine

## ASSESSMENT OF RADIOPROTECTIVE ACTION OF BASIDIOMYCOTIC MELANIN PIGMENTS ON THE HEMATOPOIETIC SYSTEM OF Balb/C MICE UNDER EXPOSURE TO IONIZING RADIATION IN SUBLETHAL DOSE

**Objective.** Assessment of radioprotective action of basidiomycotic melanin pigments on hematopoietic stem and progenitor bone marrow cells of Balb/C mice in case of exposure to ionizing radiation in sublethal dose.

**Materials and methods.** Using original method of cultivation in gel diffusion chambers in vivo of bone marrow cells of Balb/C mice we investigated the colony-forming efficiency of hematopoietic progenitor cells of the animals, which were exposed to ionizing radiation action in sublethal dose, in case of treatment with melanin pigments solution of basidiomycotic fungi as radioprotector.

**Results and conclusions.** Investigation of functional activity of bone marrow progenitor cells of Balb/C mice allowed assessing their hematopoiesis state in case of ionizing radiation action, as well as in case of previous treatment of the animals with the solution of melanin pigments as radioprotector. It was determined that under the influence of ionizing radiation the colony-forming activity of mice bone marrow has decreased comparing to control. Solution of melanin pigments was able to enhance the functional activity of bone marrow of irradiated animals. Obtained results of radioprotective action of basidiomycotic melanin pigments solution on irradiated stem cells and their descendants (progenitor cells) may become the evidence for development of the protective means for human organism from the injuring action of ionizing radiation.

**Key words:** hematopoiesis, ionizing radiation, progenitor cells, melanins, cell culture.

*Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2019;24:210-219. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-210-219*

### ВСТУП

Кістковий мозок належить до тканин, що мають високий мітотичний індекс, а отже й високу чутливість до іонізуючої радіації. Накопичений в радіобіології досвід показав, що активно проліферуючі клітини є радіочутливими, а зріліші мають більшу стійкість до опромінення [1, 2]. Слід підкреслити, що стовбурова кровотворна клітина залежно від стадії клітинного циклу по-різному реагує на променеве ураження – найбільш радіочутливою вона виявляється під час мітозу [3]. Критичними для відновлення гемопоезу є гемопоетичні стовбурові клітини, що залишилися інтактними після опромінення.

Особливої актуальності набуває завдання захисту організму людини при контакті з джерелами іонізуючої радіації, а також пошук і вивчення препаратів, що мають радіопротекторні властивості. Проте сьогодні не існує такого радіопротектора, який би одночасно не був токсичним для організму, був дієвим протягом тривалого часу, недорогим у виробництві та зручним у застосуванні. Тому перспективним є пошук і дослідження речовин природного походження, що позбавлені токсичного впливу на організм та можуть мати виражені радіопротекторні властивості.

### INTRODUCTION

Bone marrow belongs to the tissues which have high mitotic index and therefore high sensitivity to ionizing radiation. The experience accumulated in radiobiology has shown that actively proliferating cells are radiosensitive, but more mature ones have higher resistance to irradiation [1, 2]. It should be mentioned that stem hematopoietic cell diversely reacts to radiation damage depending on the stage of cell cycle – it is the most sensitive during mitosis [3]. Hematopoietic stem cells which stayed intact after irradiation are critical for the hematopoiesis repair.

Particular relevance appears in the task of human organism protection during the contact with ionizing radiation sources, as well as the search and study of compounds with radioprotective properties. However, for today no such protector exists, which would be both non-toxic for the organism and effective during the long time, as well as inexpensive to manufacture and convenient in usage. Hence, it is very promising to research and investigate the substances of natural origin, which are devoid of toxic influence on the organism and may have pronounced radioprotective properties.

✉ Bilko Nadiia Mykhailivna, e-mail: [nadia.bilko@gmail.com](mailto:nadia.bilko@gmail.com)

## МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Метою дослідження була оцінка радіопротекторної дії меланінових пігментів базидіоміцетів на кровотворні стовбурові клітини та клітини-попередники кісткового мозку мишей Balb/C у разі впливу іонізуючої радіації у сублетальній дозі.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У роботі об'єктом дослідження був кістковий мозок, вилучений зі стегнових кісток мишей-самців лінії Balb/C на 1, 7 та 30-ту добу після опромінення іонізуючою радіацією у сублетальній дозі 5,85 Гр. Серед ліній лабораторних мишей, що використовуються у радіобіологічних дослідженнях, вони мають найвищу чутливість до іонізуючої радіації – їх  $LD_{50/30}$  становить 5,7–5,9 Гр [4]. Тварин було поділено на три групи – контроль ( $n = 3$ ), опромінені тварини ( $n = 3$ ) та тварини, яким безпосередньо перед опроміненням було зроблено внутрішньочеревну ін'єкцію розчину меланінових пігментів у дозі 0,05 мкг на 100 г ваги тварин ( $n = 3$ ). Розчин було надано співробітниками Інституту проблем безпеки атомних електростанцій НАН України. Тваринами-реципієнтами були інтактні миші лінії Balb/C ( $n = 45$ ). Усі маніпуляції з тваринами проводилися згідно з вимогами, що стосуються робіт з використанням експериментальних тварин.

Для отримання клітин кісткового мозку тварин забирали методом цервікальної дислокації спинного мозку в шийному відділі та вилучали стегнові кістки. Після цього за умов стерильності відкривали кісткомозковий канал і за допомогою шприца з середовищем RPMI-1640 (Gibco) вимивали клітини кісткового мозку у стерильну пластикову пробірку. Отриману суспензію ресуспендували крізь голки, діаметр яких поступово зменшували (20G, 21G, 23G, 25G та 26G) та фільтрували крізь 4-шаровий капроновий фільтр.

Кількість клітин кісткового мозку у попередньо приготіваній суспензії визначали шляхом їх підрахунку у камері Горяєва. Далі проводили розрахунки та розводили суспензію клітин повним живильним середовищем таким чином, щоб у кінцевому результаті в кожній гелевій дифузійній камері, яка використовується для культивування, було 100 000 клітин.

Повне живильне середовище, що застосовувалося для культивування у гелевих дифузійних камерах *in vivo*, готували на основі середовища RPMI-1640 (90 %), до якого додавали 10 % ембріональної телячої сироватки (Sigma), пеніцилін та стрептоміцин («Київмедпрепарат») по 100 Од/мл, а також 10 мМ L-глю-

## OBJECTIVE

The aim of investigation was to assess the radio-protective action of basidiomycotic melanin pigments on the hematopoietic stem and progenitor cells of the bone marrow of Balb/C mice under the influence of ionizing radiation in sublethal dose.

## MATERIALS AND METHODS

In the current work the object of investigation was bone marrow obtained from the femoral bones of male Balb/C mice on the 1st, 7th and 30th day after the exposure to ionizing radiation in sublethal dose of 5.85 Gy. Among the laboratory mice lines, which are used in radiobiological investigations, they have the highest sensitivity to ionizing radiation – their  $LD_{50/30}$  is equal to 5.7–5.9 Gy [4]. The animals were divided into three groups: control ( $n = 3$ ), irradiated animals ( $n = 30$ ), and animals which directly before irradiation were intraperitoneally injected with melanin pigments solution in the dose of 0.05  $\mu$ g per 100 g of body weight ( $n = 3$ ). The solution was provided by the colleagues from the Institute for Safety Problems of Nuclear Power Plants NAS of Ukraine. The recipient animals were intact Balb/C mice ( $n = 45$ ). All the manipulations with the animals were performed according to the requirements which concern the works with experimental animals' usage.

To obtain bone marrow cells the animals were euthanized using the method of cervical dislocation of spinal cord in cervical region and femoral bones were excluded. After that in sterile conditions medullary canal was opened and using the syringe with RPMI-1640 medium (Gibco) bone marrow cells were flushed out into sterile plastic tube. Acquired suspension was resuspended through the needles with gradually decreasing diameter (20G, 21G, 23G, 25G, and 26G) and filtered through 4-layered capron filter.

The number of bone marrow cells in previously prepared suspension was determined by their counting in Goryaev's chamber. Subsequently the estimation was performed and cell suspension was diluted with complete medium so that as a result 100 000 cells were in each diffusion chamber, which is used for cultivation.

Complete growth medium, which was applied for the cultivation in gel diffusion chambers *in vivo*, was prepared based on the RPMI-1640 medium (90 %), with adding 10 % of fetal calf serum (Sigma), penicillin and streptomycin (Kyivmedpreparat) each 10 U/ml, as well as 10 mM of L-glutamine

таміну (Sigma). Отримане середовище змішували із 0,66 % агаровим гелем (Difco) у співвідношенні 1:1.

Приготовану суспензію за допомогою шприца швидко розливали по камерах по 0,2 мл у кожен. Дифузійна камера являє собою прозорий циліндр, що має діаметр 0,8–1 см і висоту 5 мм. Вона виготовлена зі спеціального гелю, що містить у собі пори діаметром 0,2–0,22 мм, які є повністю непроникними ззовні для клітин імунної системи тварини-реципієнта, проте не перешкоджають дифузії макромолекул, таких як інтерлейкіни, колонієстимулюючі фактори, хемокіни, ростові фактори та ін. [5].

Тваринами-реципієнтами камер виступали неопромінені миші лінії Balb/C. За добу до імплантації гелевих камер мишей обробляли циклофосфаном («Arterium») у дозі 200 мг/кг маси тварин для пригнічення їх імунологічної активності. Для цього тваринам робили ін'єкцію циклофосфану внутрішньочеревно. За 20 хвилин до оперування мишам у черевну порожнину вводили наркоз Sagatal (RMB Animal Health) у дозі 200 мг/кг маси тварини.

На 11-ту добу культивування тварин-реципієнтів забивали методом цервікальної дислокації спинного мозку у шийному відділі, вилучали камери та під інвертованим мікроскопом (Olympus) підраховували загальну кількість колоній (агрегати, що складаються більш, ніж із 40 клітин) та кластерів (до 40 клітин), що утворилися в процесі культивування.

З метою оцінки стану клітин периферійної крові та кісткового мозку опромінених тварин готували препарати на попередньо знежирених скельцях. Для цього отримували периферійну кров із хвостової вени мишей Balb/C та виготовляли мазок з подальшою фіксацією його висушуванням. Препарати кісткового мозку готували з готової суспензії з використанням цитоцентрифуги Cytospin (Shandon) і підсушували на повітрі.

Забарвлення препаратів проводили з використанням гематологічних барвників. Попередньо зафіксовані препарати периферійної крові та кісткового мозку забарвлювали за методом Паппенгейма барвниками Май-Грюнвальда та Романовського-Гімза (Sigma). Готові препарати досліджували під світловим мікроскопом (Leica).

Для визначення статистичної достовірності показників кожної групи даних використовували непараметричний дисперсійний аналіз Краскела–Уолліса та критерій Ньюмена–Кейлса для порівняння груп даних. Різницю вважали достовірною на рівні значущості 5 %.

(Sigma). Obtained medium was mixed with 0.66 % agar gel (Difco) in proportion 1:1.

Prepared suspension was quickly dispensed using syringe into chambers, 0.2 ml in each one. Diffusion chamber is transparent cylinder which has the diameter of 0.8–1 cm and the height of 5 mm. It is made of a special gel containing pores with a diameter of 0.2–0.22 mm, which are completely impermeable from outside to the immune cells of the recipient animal, but do not prevent the diffusion of macromolecules such as interleukins, colony-stimulating factors, chemokines, growth factors, etc. [5].

Recipient animals for the chambers were non-irradiated Balb/C mice. The day before the implantation of gel chambers mice were treated with cyclophosphamide (Arterium) in the dose of 200 mg/kg of animal's body weight to depress their immunological activity. For this animals were intraperitoneally injected with cyclophosphamide. 20 minutes before the operation mice were abdominally injected with Sagatal narcosis (RMB Animal Health) in the dose of 200 mg/kg of animal's body weight.

On the 11<sup>th</sup> day of cultivation the recipient animals were euthanized using the method of cervical dislocation of spinal cord in cervical region, the chambers were taken out, and the estimation was performed using inverted microscope (Olympus), that is general number of colonies (aggregates of more than 40 cells) and clusters (less than 40 cells), which appeared during the cultivation.

In order to evaluate the state of peripheral blood and bone marrow cells of irradiated animals we prepared the smears on the previously degreased slides. For that we obtained the peripheral blood from the tail vein of Balb/C mice and prepared the smear with its further fixation by dehydration. Bone marrow specimens were prepared from the stock suspension using cytocentrifuge Cytospin (Shandon) and then air-cured.

Staining of the specimens was performed with the usage of hematological stains. Previously fixed smears of peripheral blood and bone marrow were stained according to Pappenheim method with May-Grunwald and Giemsa stains (Sigma). Prepared specimens were investigated under the light microscope (Leica).

To determine statistical validity of the indices of each data group we used non-parametrical dispersion analysis of Kruskal-Wallis and Newman-Keuls criterion to compare data groups. The difference was considered significant at the 5 % level.



## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

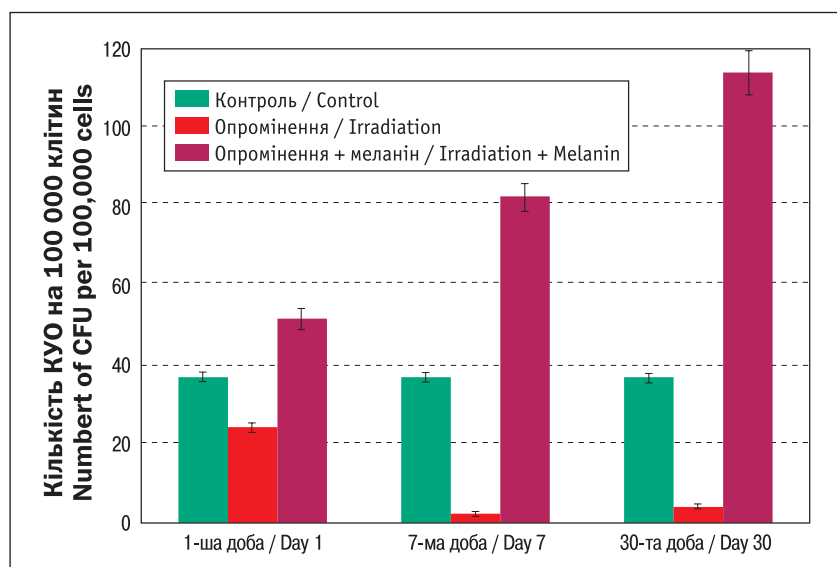
Результати культивування у дифузійних камерах *in vivo* клітин кісткового мозку мишей Balb/C дозволили оцінити функціональну активність клітин-попередників за умов опромінення іонізуючою радіацією та при дії розчину меланінових пігментів у якості радіопротектора. Після проведення культивування кісткового мозку, отриманого на 1-шу добу після опромінення, було виявлено, що колонієутворююча активність гемопоетичних клітин-попередників мишей, яких не було оброблено розчином меланіну перед опроміненням, була значно нижчою порівняно з контролем ( $24,2 \pm 1,0$  та  $36,8 \pm 1,2$  колонієутворюючих одиниць, відповідно), тоді як після обробки мишей-донорів розчином меланінових пігментів перед опроміненням функціональна активність клітин-попередників у культурі збільшувалась до  $51,6 \pm 2,6$  колонієутворюючих одиниць на 100 тис. експлантованих клітин (рис. 1).

Як відомо, безпосередньо під час впливу іонізуючого випромінювання у кістковому мозку зменшується кількість гемопоетичних клітин-попередників. Як наслідок, кровотворним мікрооточенням, а саме клітинами строми кісткового мозку, починає вироблятися велика кількість цитокінів і ростових факторів, що здатні стимулювати стовбурові клітини до активної проліферації [6]. Проте у тій групі тварин, яка була опромінена іонізуючою радіацією у сублетальній дозі, всі ростові фактори були знищені надмірною кількістю вільних радикалів, що утворюються в клітинах під час проходження крізь них іонізуючих частинок [7]. Водночас у групі опромінених тварин, яких було попередньо оброблено розчином меланіну, вільні радикали швидко нейтралізувалися, тож підвищена кількість ростових факторів призвела до гіперпродукції кісткомозкових клітин.

## RESULTS AND DISCUSSION

The results of cultivation in diffusion chambers *in vivo* of bone marrow cells of Balb/C mice allowed evaluating the functional activity of progenitor cells under the exposure to ionizing radiation and with the action of melanin pigments solution as radio-protector. After the cultivation of bone marrow obtained on the 1st day after irradiation it was revealed that colony-forming activity of hematopoietic progenitor cells of the mice, which were not treated with melanin solution before the irradiation, was significantly lower comparing to control ( $24.2 \pm 1.0$  and  $36.8 \pm 1.2$  colony-forming units, respectively), whereas after the treatment of donor mice with melanin pigments solution previously to irradiation the functional activity of progenitor cells in culture increased to  $51.6 \pm 2.6$  colony-forming units per 100 000 explanted cells (Fig. 1).

It is known, that directly during the influence of ionizing radiation the number of hematopoietic progenitor cells in bone marrow is decreased. As a result, hematopoietic microenvironment, namely, bone marrow stromal cells start to produce a large number of cytokines and growth factors, which are able to stimulate stem cells to active proliferation [6]. However, in the group of animals, which were exposed to sublethal dose of ionizing radiation, all the growth factors were destroyed by excessive number of free radicals produced in the cells during the transmission of ionizing particles through them [7]. At the same time, in the group of irradiated animals previously treated with melanin solution free radicals were quickly neutralized, so the elevated level of growth factors led to hyperproduction of bone marrow cells.



**Рисунок 1.** Ефективність колонієутворення клітин кісткового мозку мишей Balb/C при дії іонізуючої радіації та з попередньою обробкою розчином меланіну ( $p < 0,05$ )

**Figure 1.** Colony-forming efficiency of bone marrow cells of Balb/C mice under exposure to ionizing radiation and with melanin solution previous treatment ( $p < 0.05$ )

При культивуванні клітин кісткового мозку мишей Balb/C на 7-му добу після опромінення було з'ясовано, що попередня обробка тварин розчином меланінових пігментів призвела до суттєвого зростання проліферації гемопоетичних клітин-попередників (ефективність колонієутворення становила  $82,5 \pm 3,4$ ). При цьому спостерігали глибоке пригнічення колонієутворення ( $2,3 \pm 0,4$ ) у групі опромінених тварин, яких не піддавали дії розчину меланіну. Ці дані є свідченням того, що у кістковому мозку опромінених тварин пул більш пізніх клітин-попередників поступово вичерпався [3].

Якщо розглядати групу тварин, яким була зроблена ін'єкція розчину меланінових пігментів перед опроміненням, то показник колонієутворення в кістковому мозку мишей цієї групи продовжував зростати протягом усього експерименту. Здавалося б, що за 7 діб концентрація ростових факторів у стромі мала нормалізуватися і колонієутворююча активність кісткового мозку тварин повинна була повернутися до рівня контрольної групи. Проте у групі тварин, оброблених розчином меланінових пігментів, показники колонієутворення продовжували зростати. Ми припускаємо, що це явище могло бути викликане здатністю меланіну стимулювати кістковомозкове мікрооточення до продукування цитокінів та ростових факторів [8].

Нарешті, при культивуванні клітин-попередників кісткового мозку на 30-ту добу після опромінення співвідношення між кількістю отриманих колонієутворюючих одиниць у тварин, що були оброблені розчином меланінових пігментів, та у групі без дії розчину, дещо зменшилося. Це пояснюється незначним збільшенням ефективності колонієутворення кісткового мозку опромінених тварин ( $4,0 \pm 0,4$ ). Проте цей показник у мишей, що були піддані дії розчину меланіну, продовжував зростати ( $113,8 \pm 5,7$ ). Ці дані свідчать про початок поступового відновлення кісткового мозку опромінених тварин за рахунок так званого золотого запасу стовбурових клітин, що під час опромінення знаходилися глибоко у стромі і, таким чином, залишилися неушкодженими [6].

У процесі дослідження морфологічних особливостей гемопоетичної системи опромінених та контрольних мишей було з'ясовано, що кровотворні клітини опромінених тварин мають суттєві морфологічні зміни. Слід також зауважити, що зміни, які були виявлені в периферійній крові опромінених мишей, були зумовлені процесами, що відбувалися у кістковому мозку.

Так, у периферійній крові тварин, яких було піддано дії іонізуючої радіації, виявляли гіперсегментацію

During the cultivation of bone marrow cells of Balb/C mice on the 7<sup>th</sup> day after irradiation, it was found that previous treatment of animals with melanin pigments solution led to significant raise in the proliferation of hematopoietic progenitor cells (colony-forming efficiency was equal to  $82.5 \pm 3.4$ ). Along with that we observed the deep depression of colony forming ( $2.3 \pm 0.4$ ) in the group of irradiated animals, which were not treated with melanin solution. These data testifies that in the bone marrow of irradiated animals, the pool of later progenitor cells was gradually depleted [3].

Concerning the group of animals, which were injected with melanin pigments solution before irradiation, the rate of colony forming in the bone marrow of mice in this group continued to increase throughout the experiment. It seems that within 7 days the concentration of growth factors in stroma should be normalized and bone marrow colony-forming activity of the animals should return to the level of the control group. However, in the group of animals pretreated with melanin pigments solution the indices of colony forming continued to rise. We assume that this phenomenon could be caused by the ability of melanin to stimulate bone marrow microenvironment to produce cytokines and growth factors [8].

Finally, after cultivating the progenitor bone marrow cells on the 30<sup>th</sup> day after irradiation, the ratio has reduced between the numbers of obtained colony-forming units in the animals pretreated with melanin pigments solution and in the group without solution influence. It is explained by minor increase of bone marrow colony-forming efficiency of irradiated animals ( $4.0 \pm 0.4$ ). However, this index continued to grow in mice which were treated with melanin solution ( $113.8 \pm 5.7$ ). These data reveal the beginning of gradual renewal of bone marrow of irradiated animals by means of so called gold reserve of stem cells, which during the irradiation remained deep in stroma and hence stayed intact [6].

In the process of investigating the morphological features of the hematopoietic system of irradiated and control mice, it was revealed that hematopoietic cells of irradiated animals have substantive morphological changes. It should be also mentioned that the alterations detected in peripheral blood of irradiated mice were determined by the processes occurring in bone marrow.

Hence, in the peripheral blood of the animals which were exposed to ionizing radiation we

та дегрануляцію сегментоядерних нейтрофілів. Сегментоядерні нейтрофіли мишей у нормі мають 3–6 сегментів. Збільшення кількості сегментів у ядрі сегментоядерних нейтрофілів до 6–10 може свідчити про наслідки, які виникають у клітинах крові при опроміненні. Крім того, виявлена нами підвищена кількість еозинофілів у периферійній крові опромінених мишей була прямим наслідком дії іонізуючої радіації.

Для оцінки стану кровотворної системи опромінених мишей Balb/C було проведено кількісне дослідження їх периферійної крові (табл. 1) та кісткового мозку.

У гемограмі контрольних тварин показники гемопоетичних клітин знаходились у межах фізіологічних величин протягом всього періоду спостереження. У той же час внаслідок опромінення було виявлено типові гематологічні зміни, характерні для дії іонізуючої радіації. Зокрема, спостерігалось зниження кількості еритроцитів та гемоглобіну на 1, 7 та 30-ту добу у групі опромінених мишей, не оброблених розчином меланінових пігментів, тоді як дія цього розчину зменшувала ураження гемопоетичної системи, що проявлялося у ближчих до контрольних показниках еритроцитів та гемоглобіну у цій групі тварин.

Подібним чином, кількість лейкоцитів та тромбоцитів суттєво знижувалася в опроміненій групі протягом всього періоду спостереження, тоді як вплив

revealed hypersegmentation and degranulation of segmented neutrophils. Mice segmented neutrophils normally have 3–6 segments. Increase in the number of segments in the nucleus of segmented neutrophils to 6–10 can be attributed to the consequences which appear in blood cells during irradiation. Besides, excessive amount of eosinophils in peripheral blood of irradiated animals was the direct consequence of ionizing radiation influence.

To evaluate the state of hematopoietic system of irradiated Balb/C mice, a quantitative study of their peripheral blood (Table 1) and bone marrow was performed.

In the hemogram of control animals hematopoietic cell indices were within physiological values during the whole observation period. At the same time, owing to irradiation we detected typical hematological alterations relevant to ionizing radiation action. In particular, we observed the decrease in the number of erythrocytes and hemoglobin on the 1<sup>st</sup>, 7<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> day in the group of irradiated animals, not treated with melanin pigments solution, whereas the influence of this solution has reduced the injury of hematopoietic system, which was revealed in closer to control indices of erythrocytes and hemoglobin in this group of animals.

Similarly, leukocyte and platelet counts were significantly decreased in the irradiated group during the whole observation period, whereas the influence

**Таблиця 1**

**Динаміка клітинного складу периферійної крові опромінених мишей Balb/C у порівнянні із контрольною групою та при дії радіопротектора**

**Table 1**

**Dynamics of the cellular content of peripheral blood of irradiated Balb/C mice compared to the control group and the effect of radioprotector**

№ Показники Indices	Група / Group	Термін після опромінення, доба / Period after irradiation (days)		
		1	7	30
1. Гемоглобін, г/л Hemoglobin, G/L	Контроль / Control	128,1 ± 3,4	130,3 ± 4,1	125,4 ± 3,5
	Опромінення / Irradiation	95,4 ± 2,4*	90,2 ± 3,1*	98,5 ± 3,3*
	Опромінення + Меланін / Irradiation + Melanin	120,5 ± 4,2	118,7 ± 3,1	123,1 ± 4,0
2. Еритроцити, × 10 <sup>12</sup> /л Erythrocytes, × 10 <sup>12</sup> /L	Контроль / Control	8,5 ± 0,4	9,1 ± 0,4	8,9 ± 0,4
	Опромінення / Irradiation	6,5 ± 0,2*	5,8 ± 0,3*	5,9 ± 0,2*
	Опромінення + Меланін / Irradiation + Melanin	7,9 ± 0,3	8,3 ± 0,3	8,1 ± 0,2
3. Лейкоцити, × 10 <sup>9</sup> /л Leucocytes, × 10 <sup>9</sup> /L	Контроль / Control	2,9 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,0 ± 0,1
	Опромінення / Irradiation	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1
	Опромінення + Меланін / Irradiation + Melanin	2,3 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,1
4. Тромбоцити, × 10 <sup>9</sup> /л Platelets, × 10 <sup>9</sup> /L	Контроль / Control	581 ± 18	590 ± 20	577 ± 23
	Опромінення / Irradiation	422 ± 19*	438 ± 18*	455 ± 21*
	Опромінення + Меланін / Irradiation + Melanin	550 ± 23	530 ± 25	547 ± 22

Примітки. \* – різниця між групами достовірна, p < 0,05.  
Notes. \* – the difference between groups is reliable, p < 0.05.

меланінових пігментів проявлявся у менш значному ураженні цих гемопоетичних клітин мишей, підданих дії іонізуючої радіації у сублетальній дозі.

Результати аналізу клітинного складу кісткового мозку також свідчили про суттєвий вплив іонізуючої радіації на кровотворні клітини, що проявлялося у змінах нормального співвідношення між кількостями клітин у мієлограмі опромінених тварин (табл. 2).

У кістковому мозку опромінених мишей було виявлено підвищену у порівнянні із контролем кількість клітин еозинофільного та базофільного напрямів диференціювання, що вказує на суттєві зміни у системі регуляції гемопоезу внаслідок дії іонізуючої радіації. Зокрема, показники вмісту сегментоядерних еозинофілів для групи опромінених тварин становили  $4,6 \pm 0,1$  % у порівнянні із контрольними ( $2,4 \pm 0,1$ ) %. При цьому вміст базофільних сегментоядерних клітин у групі опромінених мишей склав  $(2,5 \pm 0,1)$  % у порівнянні із  $(1,3 \pm 0,1)$  % у кістковому мозку тварин контрольної групи. Водночас у групі, обробленій розчином меланінових пігментів, таких суттєвих відмінностей не було виявлено.

Крім того, суттєві зміни спостерігалися у еритроїдному ростку кровотворення. Зокрема, виявляли значне зниження кількості еритробластів та нормоцитів у препаратах кісткового мозку опромінених тварин. Для еритробластів цей показ-

of melanin pigments was displayed in the less substantive damage of these hematopoietic cells of mice exposed to ionizing radiation in the sublethal dose.

Results of the analysis of bone marrow cellular content have also indicated notable influence of ionizing radiation on the hematopoietic cells, which was revealed in alterations in the ratio between cell numbers in myelograms of irradiated animals (Table 2).

In the bone marrow of irradiated mice we detected increased comparing to control number of the cells of eosinophilic and basophilic differentiation lineage, which shows serious changes in the system of hematopoiesis regulation as a result of ionizing radiation action. In particular, the content indices of segmented eosinophils for the group of irradiated animals were equal to  $4.6 \pm 0.1$  % comparing to control ( $2.4 \pm 0.1$ ) %. In addition, the fraction of basophilic segmented cells in the group of irradiated mice was equal to  $(2.5 \pm 0.1)$  % comparing to  $(1.3 \pm 0.1)$  % in the bone marrow of control animals. At the same time, in the group treated with melanin pigments solution such pronounced differences were not revealed

In addition, substantive changes were observed in the erythroid lineage of hematopoiesis. In particular, we revealed significant decrease in the number of erythroblasts and normocytes in bone marrow specimens of irradiated animals. For the erythroblasts

**Таблиця 2**

**Динаміка клітинного складу периферійної крові опромінених мишей Balb/C у порівнянні з контрольною групою та при дії радіопротектора**

**Table 2**

**Dynamics of the cellular content of peripheral blood of irradiated Balb/C mice compared to the control group and the effect of radioprotector**

№ Елементи кісткового мозку / Bone marrow elements	Вміст клітин (%) / Cell count (%)		
	Контроль / Control	Опромінення / Irradiation	Опромінення + Меланін / Irradiation + Melanin
1. Бласти / Blasts	$5,1 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,2$
2. Мієлоцити нейтрофільні / Myelocytes neutrophilic	$6,8 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,2$
3. Нейтрофіли паличкоядерні / Band neutrophils	$16,3 \pm 0,5$	$15,9 \pm 0,6$	$16,1 \pm 0,5$
4. Нейтрофіли сегментоядерні / Segmented neutrophils	$15,8 \pm 0,6$	$15,3 \pm 0,5$	$15,6 \pm 0,7$
5. Мієлоцити еозинофільні / Myelocytes eosinophilic	$3,1 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,2^*$	$4,7 \pm 0,1$
6. Еозинофіли паличкоядерні / Band eosinophils	$3,6 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,2^*$	$3,8 \pm 0,1$
7. Еозинофіли сегментоядерні / Segmented eosinophils	$2,4 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,1^*$	$3,1 \pm 0,1$
8. Базофіли сегментоядерні / Segmented basophils	$1,3 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$
9. Еритробласти / Erythroblasts	$19,5 \pm 0,8$	$15,5 \pm 0,5^*$	$18,5 \pm 0,6$
10. Нормоцити / Normocytes	$13,1 \pm 0,4$	$10,8 \pm 0,3^*$	$11,5 \pm 0,3$
11. Лімфоцити / Lymphocytes	$5,2 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,2$
12. Плазматичні клітини / Plasma cells	$1,3 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,1^*$	$2,0 \pm 0,2$
13. Моноцити / Monocytes	$2,6 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$
14. Промегакаріоцити / Promegakaryocytes	$1,5 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$
15. Мегакаріоцити / Megakaryocytes	$2,4 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$

Примітки. \* – різниця між групами достовірна,  $p < 0,05$ .  
Notes. \* – the difference between groups is reliable,  $p < 0.05$ .



ник складав  $(15,5 \pm 0,5) \%$  порівняно з групою контролю –  $(19,5 \pm 0,8) \%$ .

Вказані зміни у співвідношеннях кількості кровотворних клітин опромінених тварин можуть слугувати показником дії іонізуючої радіації на гемопоетичну систему мишей. При цьому у групі тварин, попередньо оброблених розчином меланінових пігментів, радіаційно індуковані зміни були менш виражені.

## ВИСНОВКИ

Дослідження функціональної активності клітин-попередників кісткового мозку опромінених мишей Balb/C дозволило оцінити стан кровотворення за умов дії іонізуючої радіації та при попередній обробці тварин розчином меланінових пігментів у якості радіопротектора. Було з'ясовано, що під впливом іонізуючого випромінювання знижувалася колонієутворююча активність кісткового мозку мишей у порівнянні із контролем. Так, кількість колонієутворюючих одиниць у культурі дифузійних камер *in vivo* на 1-шу добу після опромінення становила  $24,2 \pm 1,0$ , на 7-му –  $2,3 \pm 0,4$  та  $4,0 \pm 0,4$  на 30-ту добу після опромінення у порівнянні із контрольним показником  $36,8 \pm 1,2$  колоній на 100 тис. культивованих клітин. Розчин меланінових пігментів був здатним підвищувати функціональну активність кісткового мозку опромінених тварин. Зокрема, кількість колоній на 1-шу добу дорівнювала  $51,6 \pm 2,6$ , на 7-му –  $82,5 \pm 3,4$  та  $113,8 \pm 5,7$  на 30-ту добу після опромінення тварин-донорів. Внаслідок опромінення спостерігалось зниження кількості еритроцитів, лейкоцитів та тромбоцитів у периферійній крові мишей, тоді як дія меланінових пігментів зумовлювала менший ступінь ураження гемопоетичних клітин. Результати аналізу мієлограми свідчили про суттєві зміни у співвідношеннях між різними групами клітин у опромінених тварин, що може слугувати показником дії іонізуючої радіації на гемопоетичну систему мишей. Отримані результати радіопротекторної дії розчину меланінових пігментів базидіоміцетів на опромінені стовбурові клітини та їх нащадки (клітини-попередники) можуть бути підґрунтям для розробки засобів захисту організму людини від пошкоджуючої дії іонізуючої радіації.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Серкіз Я., Липська А., Дрозд І. Радіобіологічні ефекти у ссавців: погляд через 20 років після аварії на ЧАЕС. Вісн. НАН України. 2006. № 4. С. 14–27.

this index was equal to  $(15.5 \pm 0.5) \%$  comparing to control group –  $(19.5 \pm 0.8) \%$ .

Specified changes in the ratios of hematopoietic cells in the irradiated animals may serve as the indicator of ionizing radiation action on mice hematopoietic system. Along with that, in the group of animals previously treated with melanin pigments solution, radiation-induced changes were less pronounced.

## CONCLUSIONS

Investigation of the functional activity of bone marrow progenitor cells in Balb/C irradiated mice allowed assessing the hematopoiesis state in case of ionizing radiation action, as well as with previous treatment of the animals with melanin pigments solution as radioprotector. It was determined that under the influence of ionizing radiation the colony-forming activity of mice bone marrow was decreased comparing to control. Thus, the number of colony-forming units in cell culture in diffusion chambers *in vivo* was equal to  $24.2 \pm 1.0$  on the 1<sup>st</sup> day after irradiation,  $2.3 \pm 0.4$  on the 7<sup>th</sup> day, and  $4.0 \pm 0.4$  on the 30<sup>th</sup> day after the irradiation comparing to control index of  $36.8 \pm 1.2$  colonies per 10 000 cultivated cells. The melanin pigments solution was able to increase functional activity of the bone marrow of irradiated animals. In particular, the number of colonies on the 1<sup>st</sup> day was equal to  $51.6 \pm 2.6$ ,  $82.5 \pm 3.4$  on the 7<sup>th</sup> day, and  $113.8 \pm 5.7$  on the 30<sup>th</sup> day after the irradiation of donor animals. As a result of irradiation we observed the decrease in erythrocyte, leukocyte and platelets number in mice peripheral blood, whereas the action of melanin pigments caused lower level of hematopoietic cell damage. Results of myelogram analysis have shown significant alterations in the ratios between different groups of cells in irradiated animals, which may serve as the indicator of the ionizing radiation action on mice hematopoietic system. Obtained results of radioprotective action of basidiomycotic melanin pigments solution on irradiated stem cells and their descendants (progenitor cells) may become the evidence for development of the protective means for human organism from the injuring action of ionizing radiation.

## REFERENCES

1. Serkiz Y, Lypska A, Drozd I. [Radiobiological effects in mammals: view in 20 years after the accident on CAES]. Visnyk Natsionalnoi Akademii Nauk Ukrainy. 2006;(4):14-27. Ukrainian.

2. Sensitivity and dose dependency of radiation-induced injury in hematopoietic stem/progenitor cells in mice / C.Y. Guo, L. Luo, Y. Urata et al. *Sci Rep.* 2015. Vol. 5. P. 8055. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep08055>.
3. Hemopoietic response to low dose-rates of ionizing radiation shows stem cell tolerance and adaptation / T. M. Fliedner, D. H. Graessle, V. Meineke, L. E. Feinendegen. *Dose Response.* 2012. Vol. 10(4). P. 644–663. DOI: 10.2203/dose-response.12-014.Feinendegen.
4. Білько Д. І. Методи культури клітин і тканин у біології, біотехнології та медицині : навч.-метод. посіб. Київ : НАУКМА, 2017. 88 с.
5. Bilko N. M., Bilko D. I. Novel methodological approaches in assessment and enrichment of stem cell population. *In: Stem cells and their potential for clinical application* / ed. by N. M. Bilko, B. Fehse et al. Springer, 2008. P. 201–210.
6. Asada N., Takeishi S., Frenette P. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Int. J. Hematol.* 2017. Vol. 106, N 1. P. 45–54. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12185-017-2262-9>.
7. Yamaguchi M., Kashiwakura I. Role of reactive oxygen species in the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells. / M. Yamaguchi. *PLoS One.* 2013. Vol. 8(7). P. e70503. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070503>.
8. Radiobiological characterization of environment around object «Shelter» / N. Rashydov, O. Kliuchnikov, O. Seniuk, et al. *In: Nuclear Power Plants* / ed. by Soon Heung Chang. InTechOpen, 2012. P. 231–279.
2. Guo CY, Luo L, Urata Y, Goto S, Huang WJ, Takamura S, et al. Sensitivity and dose dependency of radiation-induced injury in hematopoietic stem/progenitor cells in mice. *Sci Rep.* 2015;5:8055. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep08055>.
3. Fliedner TM, Graessle DH, Meineke V, Feinendegen LE. Hemopoietic response to low dose-rates of ionizing radiation shows stem cell tolerance and adaptation. *Dose Response.* 2012;10(4):644-63. DOI: 10.2203/dose-response.12-014.Feinendegen.
4. Bilko DI. [Methods of cell and tissue culture in biology, biotechnology and medicine]. Kyiv: NaUKMA; 2017. 88 p. Ukrainian.
5. Bilko NM, Bilko DI. Novel methodological approaches in assessment and enrichment of stem cell population. *In: Stem cells and their potential for clinical application.* Springer; 2008. p. 201-10.
6. Asada N, Takeishi S, Frenette P. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Int J Hematol.* 2017;106(1):45-54. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12185-017-2262-9>.
7. Yamaguchi M, Kashiwakura I. Role of reactive oxygen species in the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells. *PLoS One.* 2013;8(7):e70503. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070503>.
8. Rashydov N, Kliuchnikov O, Seniuk O, Gorovyy L, Zhidkov A, Ribalka V, et al. Radiobiological characterization of environment around object «Shelter». *In: Dr. Soon Heung Chang, editor. Nuclear Power Plants.* InTechOpen; 2012. p. 231-79.

## ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

**Білько Денис Іванович** – кандидат біологічних наук, доцент, доцент кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія», м. Київ, Україна

**Руссу Ірина Зіновіївна** – кандидат біологічних наук, доцент кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія», м. Київ, Україна

**Білько Надія Михайлівна** – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія», м. Київ, Україна

## INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Denys I. Bilko** – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Laboratory Diagnostics of Biological Systems, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine

**Iryna Z. Russu** – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Laboratory Diagnostics of Biological Systems, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine

**Nadiia M. Bilko** – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Laboratory Diagnostics of Biological Systems, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine

Стаття надійшла до редакції 6.05.2019

Received: 6.05.2019