ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2023. Вип. 28.

УДК: 612.119+59.085+576.535+539.16.04

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

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

ГЕМОПОЕТИЧНІ КЛІТИНИ-ПОПЕРЕДНИКИ У ПЕРИФЕРИЧНІЙ КРОВІ МИШЕЙ BALB/C ЗА ДІЇ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ У СУБЛЕТАЛЬНІЙ ДОЗІ

Мета: визначення вмісту гемопоетичних клітин-попередників, що циркулюють у периферичній крові мишей Balb/C, за дії іонізуючої радіації у сублетальній дозі, у різні терміни після опромінення, з використанням культури клітин у дифузійних камерах *in vivo*.

Методи. Готували та досліджували препарати-мазки периферичної крові мишей Balb/C, визначали її клітинний склад, а також шляхом культивування клітин периферичної крові у дифузійних камерах in vivo визначали ефективність їх колонієутворення на 0, 5 та 30-ту добу після зовнішнього опромінення у сублетальній дозі 5,85 Гр.

Результати. Вміст мієлоцитів та метамієлоцитів серед ядровмісних клітин крові опромінених тварин був підвищеним, порівняно з контролем, протягом всього досліджуваного періоду. Зокрема, на 30-ту добу після опромінення вміст мієлоцитів у периферичній крові складав (3,3 ± 0,7) % проти (0,8 ± 0,4) % у контролі, а вміст метамієлоцитів – (3,4 ± 0,7) % проти (0,9 ± 0,3) % у контролі. Суттєве зростання кількості циркулюючих клітин-попередників у периферичній крові спостерігалося у ранні терміни після опромінення порівняно з контролем: 12,5 ± 1,6 проти 5,1 ± 0,8 колонієутворюючих одиниць на 100 тис. експлантованих клітин відповідно. Проте на 5-ту добу їх вміст був дещо знижений порівняно з контролем – 1,3 ± 0,9 на 100 тис. експлантованих клітин, і лише до 30-ї доби відбувалася нормалізація кількості клітин-попередників у периферичній крові – 6,8 ± 0,7 колонієутворюючих одиниць на 100 тис. експлантованих клітин.

Висновки. Аналіз отриманих результатів свідчив про підвищений рівень незрілих форм клітин у периферичній крові опромінених тварин, у порівнянні з контролем, у ранні терміни після опромінення, у тому числі гемопоетичних клітин-попередників, що здатні до колонієутворення у культурі клітин. Отже, дія іонізуючої радіації в сублетальній дозі критично впливала на проліферацію гемопоетичних клітин у кістковому мозку та провокувала їхню підвищену міграцію у кровоносне русло. Визначення вмісту незрілих форм гемопоетичних клітин у периферичній крові дозволило оцінити ступінь ураження гемопоезу внаслідок дії іонізуючого опромінення.

Ключові слова: кровотворення, циркулюючі клітини-попередники, іонізуюча радіація, сублетальна доза, культура клітин *in vivo*.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2023. Вип. 28. С. 216–224. doi: 10.33145/2304-8336-2023-28-216-224

✉ Ірина Зіновіївна Руссу, *e-mail: iryna.russu@ukma.edu.ua*

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

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

HEMATOPOIETIC PROGENITORS CELLS IN PERIPHERAL BLOOD OF BALB/C MICE UNDER IONIZING RADIATION ACTION IN SUBLETHAL DOSE

Objective: determination of the content of hematopoietic progenitor cells circulating in peripheral blood of Balb/C mice, under ionizing radiation action in sublethal dose, at different periods after the irradiation, using cell culture in diffusion chambers *in vivo*.

Methods. Peripheral blood smears of Balb/C mice were prepared and studied, its cellular composition was determined, as well as by cultivation of peripheral blood cells in diffusion chambers in vivo their colony-forming efficiency was determined on the 0th, 5th, and 30th day after external irradiation in sublethal dose 5.85 Gy.

Results. The content of myelocytes and metamyelocytes among blood nucleated cells of the irradiated animals was increased, compared to control, during the whole investigated period. In particular, on the 30th day after irradiation the content of myelocytes in peripheral blood was 3.3 ± 0.7 % compared to (0.8 ± 0.4) % in control, and the content of metamyelocytes – (3.4 ± 0.7) % compared to (0.9 ± 0.3) % in control. A significant increase in the amount of circulating progenitor cells in the peripheral blood was observed in the early stages after irradiation (12.5 ± 1.6 colony-forming units per 100,000 explanted cells, compared to 5.1 ± 0.8 in control). However, on the 5th day their content was slightly reduced compared to control (1.3 ± 0.9), and only to the 30th day a normalization of the amount of progenitor cells occurred in the peripheral blood (6.8 ± 0.7 colony-forming units per 100,000 explanted cells).

Conclusions. The analysis of the obtained results revealed an increased level of immature forms of cells in the peripheral blood of irradiated animals, compared to control, in the early stages after irradiation, including hematopoietic progenitor cells, which are able to colony forming in cell culture. Therefore, the action of ionizing radiation in sublethal dose had a critical effect on the proliferation of hematopoietic cells in bone marrow and provoked their increased migration into the bloodstream. Determination of the content of hematopoietic cells' immature forms in peripheral blood allowed assessing the degree of hematopoietic damage due to the action of ionizing radiation.

Key words: hematopoiesis, circulating progenitor cells, ionizing radiation, sublethal dose, cell culture *in vivo*.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2023;28:216-224. doi: 10.33145/2304-8336-2023-28-216-224

ВСТУП

Опромінення організму людини може відбутися при дії джерел іонізуючої радіації, наявних у довкіллі (природного радіаційного фону), або ж як результат професійної діяльності чи ряду медичних маніпуляцій. Наслідки впливу іонізуючої радіації на організм значною мірою проявляються саме у гемопоетичній системі як одній з найбільш радіочутливих. Тому дослідження стану кровотворення, як на рівні кісткового мозку, так і на рівні периферичної крові, може слугувати джерелом діагностичних даних для оцінки ступеня ураження всього опроміненого організму.

Гемопоетичні клітини-попередники ссавців зазвичай можуть бути присутні серед мононуклеарів периферичної крові, проте у дуже незначній кількості [1]. Ці клітини можуть бути ідентифіковані за

INTRODUCTION

Irradiation of the human organism can occur under the action of ionizing radiation sources, existent in the environment (natural background radiation), or as a result of professional activity or a number of medical manipulations. Consequences of ionizing radiation influence on the organism are largely manifested in the hematopoietic system as one of the most radiosensitive. Therefore, the investigation of hematopoiesis state, both at the level of bone marrow and at the level of peripheral blood, can serve as a source of diagnostic data for assessing the level of damage to the entire irradiated organism.

Hematopoietic progenitor cells of mammals can usually be present among peripheral blood mononuclears, however, in a very small amount [1]. These cells can be identified by their clonogenic potential

✉ Iryna Z. Russu, *e-mail: iryna.russu@ukma.edu.ua*

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2023. Вип. 28.

своїм клоногенним потенціалом або за поверхневими маркерами. Відомо, що циркулюючі у кровоносному руслі гемопоетичні клітини-попередники та навіть стовбурові клітини здатні після виходу з кісткового мозку повертатися туди через деякий час [2]. На думку деяких дослідників, ці клітини можуть довго знаходитись поза кістковим мозком і персистувати в інших тканинах, наприклад, у скелетних м'язах [3]. Можливо, циркулюючі кровотворні клітини-попередники здатні відновлювати ушкоджені тканини при деяких захворюваннях і травмах. Факторами, що провокують їх вихід із кісткового мозку, можуть бути колонієстимулюючі фактори – гранулоцитарний і гранулоцитарно-макрофагальний [4], інтерлейкін-8 та сфінгозин-1-фосфат [5]; ця мобілізація клітин у периферичну кров застосовується, зокрема, з метою їх подальшої трансплантації. Зростання вмісту клітин-попередників у периферичній крові спостерігається також після дії цитостатичних агентів (наприклад, циклофосфаміду) [6].

Разом з тим, результати ряду досліджень свідчать, що підвищений вихід гемопоетичних клітин-попередників у периферичну кров у ссавців може спостерігатися внаслідок дії іонізуючої радіації [7, 8]. Це підтверджують дані, отримані при дослідженні гемопоезу осіб, які мешкають на забруднених радіонуклідами територіях [9]. Проте недостатньо вивченими залишаються механізми та етапи міграції гемопоетичних клітин-попередників із кісткового мозку у кровоносне русло при опроміненні, а також фактори, які можуть впливати на цей процес, зокрема, роль кровотворного мікрооточення.

МЕТА

Визначення вмісту гемопоетичних клітин-попередників, що циркулюють у периферичній крові мишей Balb/C, за дії іонізуючої радіації у сублетальній дозі, в різні терміни після опромінення, з використанням культури клітин у дифузійних камерах *in vivo*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідженні було використано 36 мишей лінії Balb/C, що характеризуються високою радіочутливістю. Мишей піддавали одноразовому зовнішньому опроміненню у сублетальній дозі 5,85 Гр протягом 8,5 хв. Модель опромінення тварин було розроблено в Інституті проблем безпеки атомних електростанцій НАН України [10]. Контролем та реципієнтами слугували інтактні миші Balb/C, яких утримували у стандартних умовах віварію. Усі маніпуляції з тваринами виконували згідно з вимогами біоетики та

or surface markers. It is known that circulating in bloodstream hematopoietic progenitor cells and even stem cells are able after leaving the bone marrow to return there after a while [2]. According to some researchers, these cells can reside outside the bone marrow for a long time and persist in other tissues, for example, in skeletal muscles [3]. Perhaps, circulating hematopoietic progenitor cells are able to regenerate damaged tissues in some diseases and injuries. Factors, which provoke their release from bone marrow, can be colony-stimulating factors – granulocyte and granulocyte-macrophage [4], interleukin-8 and sphingosine-1-phosphate [5]; this mobilization of the cells into peripheral blood is used, in particular, for the purpose of their subsequent transplantation. The enhancement in the content of progenitor cells in the peripheral blood is also observed after the action of cytostatic agents (for example, cyclophosphamide) [6].

Along with that, the results of a number of studies indicate that the increased release of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood in mammals can be observed as a result of ionizing radiation action [7, 8]. This is confirmed by the data obtained during the investigation of hematopoiesis of people living in areas contaminated with radionuclides [9]. However, the mechanisms and stages of hematopoietic progenitor cells' migration from bone marrow into the bloodstream under irradiation remain insufficiently studied, as well as the factors, which can influence this process, in particular, the role of hematopoietic microenvironment.

OBJECTIVE

Determination of the content of hematopoietic progenitor cells circulating in peripheral blood of Balb/C mice, under ionizing radiation action in sublethal dose, at different periods after the irradiation, using cell culture in diffusion chambers *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

36 mice of the Balb/C line, which are characterized by high radiosensitivity, were used in the study. Mice were subjected to single external irradiation in sublethal dose 5.85 Gy during 8.5 min. The model of animals' irradiation was developed at the Institute for Safety Problems of Nuclear Power Plants of NAS of Ukraine [10]. Intact Balb/C mice served as control and recipients, which were kept in standard vivarium conditions. All manipulations with animals were performed in accordance with the require-

міжнародними принципами Європейської конвенції про захист тварин, а також відповідно до національного законодавства щодо гуманного поводження з тваринами, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей [11].

Вилучення гемопоетичних клітин для подальшого дослідження проводили через 3 год після опромінення, а також на 5-ту та 30-ту добу після дії іонізуючої радіації. Для приготування препаратів-мазків периферичної крові проводили забір крові з хвостової вени мишей. Препарати готували за стандартною методикою, підсушували та забарвлювали за Паппенгеймом, після чого досліджували їх під мікроскопом для визначення лейкоцитарної формули.

Забір периферичної крові у мишей для подальшого виділення мононуклеарів проводили після евтаназії шляхом декапітації. Загальний обсяг периферичної крові у мишей – зазвичай близько 2 мл; максимальний обсяг крові, який можна отримати таким методом, становить близько 1 мл. Виділення мононуклеарів периферичної крові здійснювали розділенням клітин на градієнті щільності (Histopaque, 1,077 г/мл).

Для дослідження клоногенного потенціалу гемопоетичних клітин-попередників проводили їх культивування у культурі клітин in vivo з використанням гелевих дифузійних камер [12]. Культуральну суспензію готували на основі повного живильного середовища з додаванням фетальної телячої сироватки, L-глутаміну та антибіотиків, після чого змішували її з напіврідким агаром. Заповнювали камери та вносили їх у черевну порожнину мишей-реципієнтів Balb/C (з використанням анестезії), оброблених за добу до експерименту циклофосфамідом, що сприяє колоніутворенню гемопоетичних клітин.

Культивування in vivo тривало протягом 11 діб; після цього мишей-реципієнтів піддавали евтаназії шляхом цервікальної дислокації. Камери вилучали та досліджували під інвертованим мікроскопом з метою підрахунку кількості отриманих клітинних агрегатів на 100 тис. експлантованих клітин.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Одним із показників стану кровотворення у кістковому мозку є кількість та співвідношення зрілих клітин у периферичній крові. Дослідження препаратів крові дозволило виявити, що в ранні терміни після опромінення спостерігалось різке падіння кількості лімфоцитів, яке в подальшому супроводжувалось суттєвим зниженням кількості нейтрофільних гранулоцитів (таблиця 1). Разом з тим, на 5-ту добу

ments of bioethics and international principles of the European convention on the protection of animals, as well as in accordance with national legislation on the humane treatment of animals used for experimental and other scientific purposes [11].

Extraction of hematopoietic cells for further investigation was performed in 3 hours after irradiation, as well as on the 5th and 30th day after ionizing radiation action. For the preparation of peripheral blood smears blood was sampled from the tail vein of mice. Smears were prepared according to the standard method, dried and stained according to Pappenheim, whereupon they were examined under a microscope to determine the leukocyte formula.

Collecting of peripheral blood from mice for further isolation of mononuclears was performed after euthanasia by decapitation. The total volume of peripheral blood in mice is usually about 2 ml; the maximum amount of blood, which can be obtained by this method, is about 1 ml. Isolation of peripheral blood mononuclears was carried out by cell separation on a density gradient (Histopaque, 1.077 g/ml).

For the investigation of clonogenic potential of hematopoietic progenitor cells they were cultivated in cell culture in vivo using gel diffusion chambers [12]. Cultural suspension was prepared on the basis of complete nutrient medium with the addition of fetal calf serum, L-glutamine and antibiotics, after which it was mixed with semi-solid agar. The chambers were filled and inserted into the abdominal cavity of Balb/C recipient mice (using anesthesia), treated the day before the experiment with cyclophosphamide, which promotes colony forming of hematopoietic cells.

Cultivation in vivo lasted for 11 days; after that the recipient mice were euthanized by cervical dislocation. The chambers were removed and examined under the inverted microscope in order to count the number of obtained cell aggregates per 100,000 explanted cells.

RESULTS AND DISCUSSION

One of the indicators of hematopoiesis state in bone marrow is the number and ratio of mature cells in the peripheral blood. Investigation of blood smears allowed revealing that in the early stages after irradiation a sharp drop in the number of lymphocytes was observed, which was subsequently accompanied by a significant decrease in the number of neutrophil granulocytes (see table 1). Along with that, on the 5th

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2023. Вип. 28.

Таблиця 1

Динаміка клітинного складу периферичної крові мишей Balb/C, опромінених у сублетальній дозі 5,85 Гр, порівняно з контрольною групою

Table 1

Dynamics of peripheral blood cellular composition of Balb/C mice irradiated in sublethal dose 5.85 Gy, compared to the control group

Показники Indices	Група Group	Доба після опромінення / Days after irradiation 0	 5	 30
Мієлоцити нейтрофільні / Myelocytes neutrophilic, %	Контроль / Control Опромінення / Irradiation	0,7 ± 0,5 5,6 ± 0,9*	0,6 ± 0,5 1,6 ± 0,5	0,8 ± 0,4 3,3 ± 0,7*
Метамієлоцити нейтрофільні / Metamyelocytes neutrophilic, %	Контроль / Control Опромінення / Irradiation	0,8 ± 0,4 4,2 ± 0,4*	0,7 ± 0,5 1,7 ± 0,5	0,9 ± 0,3 3,4 ± 0,7*
Нейтрофіли паличкоядерні / Neutrophils band, %	Контроль / Control Опромінення / Irradiation	4,6 ± 1,1 5,1 ± 0,8	4,4 ± 0,9 6,9 ± 0,8*	4,3 ± 1,0 4,0 ± 0,9
Нейтрофіли сегментоядерні / Neutrophils segmented, %	Контроль / Control Опромінення / Irradiation	21,6 ± 1,4 17,8 ± 1,1*	22,2 ± 1,5 16,9 ± 1,1*	21,7 ± 1,2 14,7 ± 1,1*
Еозинофіли / Eosinophils, %	Контроль / Control Опромінення / Irradiation	2,0 ± 0,7 4,8 ± 0,7*	1,7 ± 0,7 6,3 ± 0,9*	1,9 ± 0,6 4,6 ± 0,9*
Базофіли / Basophils, %	Контроль / Control Опромінення / Irradiation	0 2,0 ± 0,7*	0 3,0 ± 0,7*	0 1,1 ± 0,6
Лімфоцити / Lymphocytes, %	Контроль / Control Опромінення / Irradiation	66,7 ± 2,0 55,9 ± 1,5*	66,9 ± 1,9 55,7 ± 2,1*	66,6 ± 1,4 65,7 ± 1,5
Моноцити / Monocytes, %	Контроль / Control Опромінення / Irradiation	3,8 ± 0,7 4,7 ± 0,7	3,6 ± 0,7 8,0 ± 0,7*	3,9 ± 0,6 3,2 ± 0,4

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

спостерігалось відносне зростання кількості еозинофільних клітин, а також поява незначної кількості базофільних гранулоцитів, що може відбуватися внаслідок дії іонізуючої радіації.

Незрілі гемопоетичні клітини, такі як мієлоцити та метамієлоцити, в нормі зазвичай відсутні у препаратах периферичної крові або знаходяться там у дуже незначній кількості. Слід зазначити, що здатність мієлоцитів до поділу ще порівняно висока, на відміну від метамієлоцитів. У ранні терміни після опромінення вміст мієлоцитів та метамієлоцитів серед ядровмісних клітин крові був суттєво підвищеним порівняно з контролем, що може пояснюватися збільшенням виходу незрілих клітин у кров у цей період. У подальшому, разом із падінням кількості зрілих гранулоцитів у периферичній крові, зменшувалась і кількість незрілих клітин, адже вони володіють доволі високою радіочутливістю.

До 30-ї доби спостерігалося поступове відновлення нормальних показників вмісту клітин у периферичній крові – ці значення наближалися до контрольних. Проте дещо підвищеною залишалася кількість мієлоцитів та метамієлоцитів, а також кількість еозинофільних клітин.

day a relative increase in the number of eosinophilic cells was observed, as well as the appearance of a small number of basophilic granulocytes, which may appear due to the action of ionizing radiation.

Immature hematopoietic cells such as myelocytes and metamyelocytes in normal conditions are usually absent in peripheral blood samples or present in very small amount. It should be mentioned that the ability of myelocytes to divide is still relatively high, in contrast to metamyelocytes. In the early stages after irradiation the content of myelocytes and metamyelocytes among nucleated blood cells was significantly increased compared to the control, which can be explained by the elevated release of immature cells into the blood during this period. Further, along with the drop in the number of mature granulocytes in the peripheral blood, the number of immature cells also decreased, because they have rather high radiosensitivity.

By the 30th day, a gradual recovery of normal indices of cell content in the peripheral blood was observed – these values approached the control ones. However, the number of myelocytes and metamyelocytes remained somewhat elevated, as well as the number of eosinophilic cells.

Отже, аналіз препаратів периферичної крові опромінених мишей свідчив, зокрема, про присутність незрілих гемопоетичних клітин різних ступенів диференціювання після дії іонізуючої радіації. Для визначення наявності серед них клітин з високим проліферативним потенціалом (тобто тих, що здатні давати початок колоніям) було проведено культуральні дослідження у системі дифузійних камер *in vivo*.

Зазвичай у культурі клітин присутні клітинні агрегати двох типів – колонії, що містять 40 чи більше клітин, та кластери, що містять до 40 клітин (рис. 1).

Підрахунок кількості отриманих колонієутворюючих одиниць (КУО) проводили на 11-ту добу культивування (рис. 2).

Therefore, the analysis of peripheral blood smears of irradiated mice revealed, in particular, the presence of immature hematopoietic cells of different stages of differentiation after ionizing radiation action. In order to determine the presence of cells with a high proliferative potential among them (that is, those capable of giving rise to colonies), cultural investigations were performed in diffusion chamber system *in vivo*.

Usually, two types of cell aggregates are present in cell culture – colonies containing 40 or more cells, and clusters containing up to 40 cells (Fig. 1).

Estimation of the number of obtained colony-forming units (CFU) was performed on the 11th day of cultivation (Fig. 2).

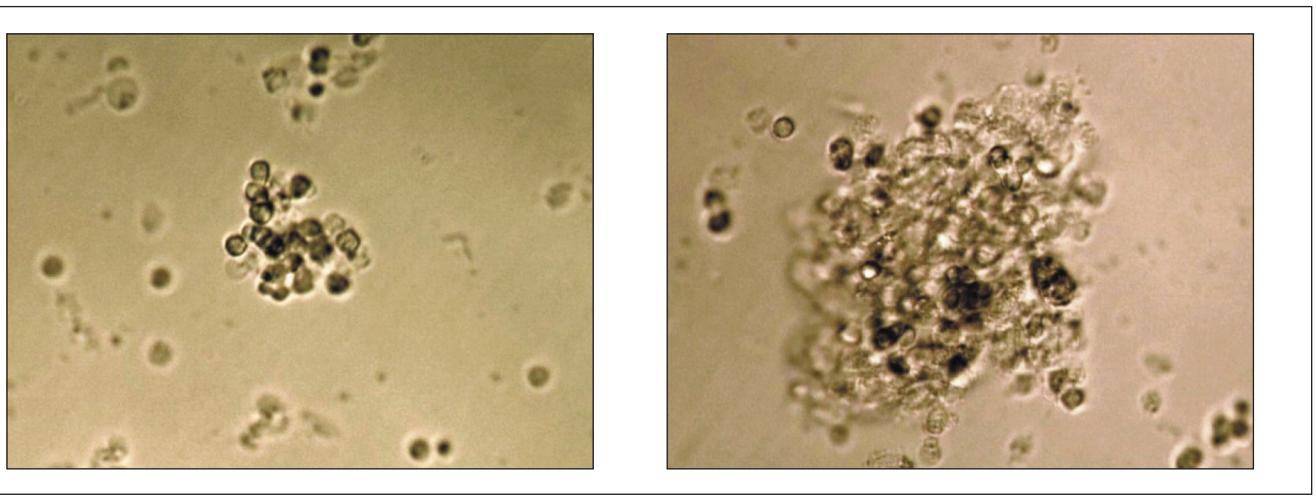

Рисунок 1. Гранулоцитарно-макрофагальний кластер (А) та гранулоцитарно-макрофагальна колонія (Б) у культурі гемопоетичних клітин-попередників опромінених мишей Balb/C у дифузійних камерах *in vivo*. Інвертований мікроскоп, зб. × 400.

Figure 1. Granulocyte-macrophage cluster (A) and granulocyte-macrophage colony (B) in the culture of hematopoietic progenitor cells of irradiated Balb/C mice in diffusion chambers *in vivo*. Inverted microscope, × 400

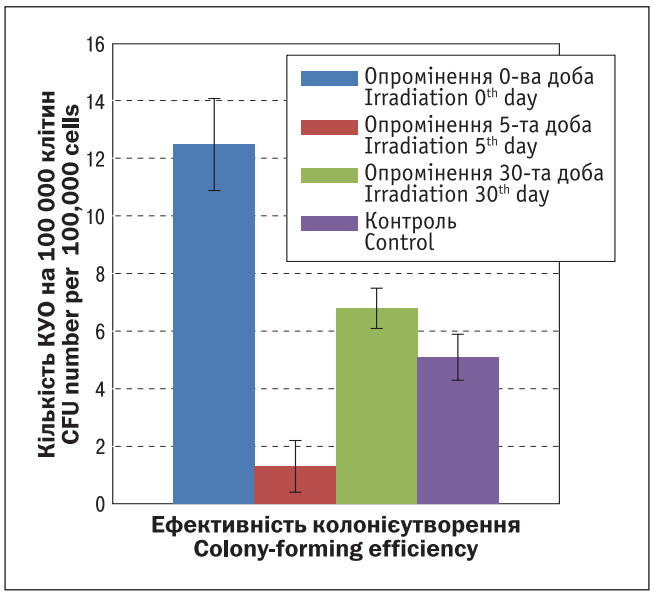

Рисунок 2. Ефективність колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників периферичної крові мишей Balb/C у різні терміни після гострого опромінення у сублетальній дозі 5,85 Гр ($p < 0,05$)

Figure 2. Colony-forming efficiency of hematopoietic progenitor cells of Balb/C mice peripheral blood at different periods after acute irradiation in sublethal dose 5.85 Gy ($p < 0.05$)

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2023. Вип. 28.

У контрольній групі ефективність колонієутворення мононуклеарів периферичної крові складала 5,1 ± 0,8 КУО на 100 тис. експлантованих клітин. Дія іонізуючої радіації на кровотворну систему зумовлювала підвищений вихід гемопоетичних клітин-попередників у кровоносне русло одразу після опромінення, у порівнянні із контролем. Ефективність колонієутворення мононуклеарів периферичної крові становила 12,5 ± 1,6 КУО на 100 тис. експлантованих клітин. Проте на 5-ту добу спостерігалося суттєве пригнічення кровотворення у кістковому мозку, що відображалося і у показниках кількості клітин-попередників у периферичній крові – їхня здатність до колонієутворення у культурі була зниженою – 1,3 ± 0,9 КУО на 100 тис. експлантованих клітин.

Однак до 30-ї доби відбувалося поступове відновлення нормального функціонування гемопоетичної системи; кількість циркулюючих у периферичній крові клітин була дещо підвищеною, у порівнянні з контролем, проте ця різниця була несуттєвою (6,8 ± 0,7 КУО на 100 тис. експлантованих клітин). Це узгоджується з даними, отриманими при дослідженні гемопоезу у осіб, що були опромінені внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС – у віддалені терміни після дії іонізуючої радіації відбувалось відновлення нормальних показників кількості гемопоетичних клітин-попередників у периферичній крові [7]. Можливо, вихід гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників у периферичну кров та їхня міграція між різними сайтами гемопоезу лежать в основі відновлення кровотворення після опромінення [1].

Отже, результати культивування мононуклеарів периферичної крові у дифузійних камерах in vivo свідчили про наявність серед них гемопоетичних клітин-попередників, які внаслідок опромінення виходять із кісткового мозку у кровоносне русло. Вони володіють високим проліферативним потенціалом та здатні у культурі клітин давати початок клітинним агрегатам – колоніям і кластерам. Підвищений рівень клітин-попередників у периферичній крові у ранні терміни після опромінення свідчить про суттєві порушення у функціонуванні гемопоетичної системи, ушкодження процесів нормального дозрівання та виходу у кровоносне русло клітин крові, а також зміни в регуляції кровотворення мікрооточенням.

ВИСНОВКИ

Аналіз отриманих результатів свідчив про підвищений рівень незрілих форм клітин у периферичній крові опромінених тварин, у порівнянні з контро-

In the control group the colony-forming efficiency of peripheral blood mononuclears was 5.1 ± 0.8 CFU per 100,000 explanted cells. The action of ionizing radiation on the hematopoietic system caused an increased release of hematopoietic progenitor cells into the bloodstream immediately after the exposure, compared to control. Colony-forming efficiency of peripheral blood mononuclears was 12.5 ± 1.6 CFU per 100,000 explanted cells. However, on the 5th day a significant suppression of hematopoiesis was observed in the bone marrow, which was also reflected in the number of progenitor cells in the peripheral blood – their ability to colony forming in culture was reduced (1,3 ± 0,9 CFU per 100,000 explanted cells).

However, by the 30th day the normal functioning of hematopoietic system was gradually restored; the number of cells circulating in the peripheral blood was slightly increased compared to control, but this difference was not significant (6.8 ± 0.7 CFU). This is consistent with the data obtained during the study of hematopoiesis of individuals irradiated as a result of Chornobyl NPP accident – in the long term after the action of ionizing radiation, the number of hematopoietic progenitor cells in the peripheral blood was restored to normal values [7]. Perhaps, the release of hematopoietic stem cells and progenitor cells into the peripheral blood and their migration between different sites of hematopoiesis underlies the recovery of hematopoiesis after irradiation [1].

Therefore, the results of cultivation of peripheral blood mononuclears in diffusion chambers in vivo indicated the presence of hematopoietic progenitor cells among them, which, due to irradiation, leave the bone marrow and enter the bloodstream. They possess a high proliferative potential and are able to give rise to cell aggregates in cell culture – colonies and clusters. An increased level of progenitor cells in peripheral blood in the early stages after irradiation indicates significant disorders in the functioning of hematopoietic system, damage to the processes of normal maturation and release of blood cells into the bloodstream, as well as the changes in hematopoiesis regulation by the microenvironment.

CONCLUSIONS

The analysis of the obtained results revealed an increased level of immature forms of cells in the peripheral blood of irradiated animals, compared

лем, у ранні терміни після опромінення, у тому числі гемопоетичних клітин-попередників, що здатні до колонієутворення у культурі клітин. Отже, дія іонізуючої радіації у сублетальній дозі критично впливала на проліферацію гемопоетичних клітин у кістковому мозку та провокувала їхню підвищену міграцію у кровоносне русло. Визначення вмісту незрілих форм гемопоетичних клітин у периферичній крові дозволило оцінити ступінь ураження гемопоезу внаслідок дії іонізуючого опромінення.

to control, in the early stages after irradiation, including hematopoietic progenitor cells, which are able to colony forming in cell culture. Therefore, the action of ionizing radiation in sublethal dose had a critical effect on the proliferation of hematopoietic cells in bone marrow and provoked their increased migration into the bloodstream. Determination of the content of hematopoietic cells' immature forms in peripheral blood allowed assessing the degree of hematopoietic damage due to the action of ionizing radiation.

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. / T. M. Fliedner, D. Graessle, C. Paulsen et al. *Cancer Biother Radiopharm.* 2002. Vol. 17, no. 4. P. 405-426. doi: 10.1089/108497802760363204.
2. Massberg S., von Andrian U. H. Novel trafficking routes for hematopoietic stem and progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009. Vol. 1176. P. 87-93. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04609.x.
3. McKinney-Freeman S., Goodell M. A. Circulating hematopoietic stem cells do not efficiently home to bone marrow during homeostasis. *Exp Hematol*. 2004. Vol. 32, no. 9. P. 868-876. doi: 10.1016/ j.exphem.2004.06.010.
4. Rosenbeck L. L., Srivastava S., Kiel P. J. Peripheral blood stem cell mobilization tactics. *Ann Pharmacother.* 2010. Vol. 44, no. 1. P. 107-116. doi: 10.1345/aph.1M289.
5. To stay or to leave: Stem cells and progenitor cells navigating the S1P gradient. / J. Liu, A. Hsu, J. Lee et al. *World J Biol Chem*. 2011. Vol. 2, no. 1. P. 1-13. doi: 10.4331/wjbc.v2.i1.1.
6. Peripheral blood progenitor cell mobilization with intermediate-dose cyclophosphamide, sequential granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and granulocyte-colony-stimulating factor, and scheduled commencement of leukapheresis in 225 patients undergoing autologous transplantation. / A. Bashey, M. Donohue, L. Liu et al. *Transfusion*. 2007. Vol. 47, no. 11. P. 2153-2160. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01440.x.
7. Bilko N., Dyagil I., Russu I., Bilko D. Circulating hematopoietic progenitor cells in patients affected by Chornobyl accident. E*xp. Oncol.* 2016. Vol. 38, no. 4. P. 242-244. doi: 10.31768/2312-8852. 2016.38(4):242-244.
8. Low-dose radiation (LDR) induces hematopoietic hormesis: LDR-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood circulation. / W. Li, G. Wang, J. Cui et al. *Exp Hematol.* 2004. Vol. 32, no. 11. P. 1088-1096. doi: 10.1016/j.exphem.2004.07.015.
9. Гематологічні ефекти в ранньому та віддаленому періодах після аварії на Чорнобильській АЕС. / В. Бебешко, І. Дягіль, С. Кли-

REFERENCES

1. Fliedner TM, Graessle D, Paulsen C, Reimers K. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer Biother Radiopharm.* 2002;17(4): 405-426. doi: 10.1089/108497802760363204.
2. Massberg S, von Andrian UH. Novel trafficking routes for hematopoietic stem and progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1176:87-93. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04609.x.
3. McKinney-Freeman S, Goodell MA. Circulating hematopoietic stem cells do not efficiently home to bone marrow during homeostasis. *Exp Hematol.* 2004;32(9):868-876. doi: 10.1016/j.exphem.2004.06.010.
4. Rosenbeck LL, Srivastava S, Kiel PJ. Peripheral blood stem cell mobilization tactics. *Ann Pharmacother*. 2010;44(1):107-116. doi: 10.1345/aph.1M289.
5. Liu J, Hsu A, Lee JF, Cramer DE, Lee MJ. To stay or to leave: Stem cells and progenitor cells navigating the S1P gradient. *World J Biol Chem*. 2011;2(1):1-13. doi: 10.4331/wjbc.v2.i1.1.
6. Bashey A, Donohue M, Liu L, Medina B, Corringham S, Ihasz A, et al. Peripheral blood progenitor cell mobilization with intermediate-dose cyclophosphamide, sequential granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and granulocyte-colony-stimulating factor, and scheduled commencement of leukapheresis in 225 patients undergoing autologous transplantation. *Transfusion*. 2007;47(11): 2153-2160. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01440.x.
7. Bilko NM, Dyagil IS, Russu IZ, Bilko DI. Circulating hematopoietic progenitor cells in patients affected by Chornobyl accident. *Exp Oncol*. 2016;38(4):242-244. doi: 10.31768/2312-8852.2016.38(4): 242-244.
8. Li W, Wang G, Cui J, Xue L, Cai L. Low-dose radiation (LDR) induces hematopoietic hormesis: LDR-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood circulation. *Exp Hematol.* 2004;32(11):1088-1096. doi: 10.1016/j.exphem.2004.07.015.
9. Bebeshko VG, Dyagil IS, Klymenko VS, Minchenko ZM, Bilyy DO, Kriachok IA, Bilko NM. [Hematological effects in early and late periods after the accident on Chornobyl NPP]. In: [*Medical conse-*

ISSN 2304-8336. Проблеми радіаційної медицини та радіобіології = Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2023. Вип. 28.

менко та ін. В кн.: *Медичні наслідки аварії на Чорнобильській атомній електростанції*. Київ : ДІА, 2007. С. 327-355.

10. Radiobiological characterization environment around object «Shelter». / N. Rashydov, O. Kliuchnikov, O. Seniuk et al. In: *Nuclear Power Plants*. 2012. P. 231-278. doi:10.13140/2.1.2519.1360
11. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Режим доступу: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137#Text (дата звернення: 01.08.2023).
12. Білько Д., Руссу І., Бойко Р., Білько Н. Гуманізована модель культивування ізольованої суспензії гемопоетичних клітин-попередників для вивчення впливу іонізуючої радіації *in vivo*. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології.* 2021. Вип. 26. С. 235-247. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-235-247

quences of the accident on Chornobyl Nuclear Power Plant]. Kyiv: DIA; 2007. p. 327-355.

10. Rashydov N, Kliuchnikov O, Seniuk O, Gorovyy L, Zhidkov A, Ribalka V, et al. Radiobiological characterization environment around object «Shelter». In: *Nuclear Power Plants*. InTech; 2012. p. 231-278. doi:10.13140/2.1.2519.1360
11. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Available from: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137#Text (accessed: 01.08.2023).
12. Bilko D, Russu I, Boiko R, Bilko N. Humanized model of isolated suspension cultivation of hematopoietic progenitor cells for the investigation of ionizing radiation influence *in vivo*. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2021;26:235-347. doi: 10.33145/2304-8336-2021-26-235-247

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Руссу Ірина Зіновіївна – кандидат біологічних наук, доцент, доцент кафедри лабораторної діагностики біологічних систем, Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ, Україна, ORCID ID: 0000-0001-9676-2859

Білько Денис Іванович – кандидат біологічних наук, доцент, доцент кафедри лабораторної діагностики біологічних систем, Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ, Україна, ORCID ID: 0000-0001-6801-401X

Білько Надія Михайлівна – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри лабораторної діагностики біологічних систем, Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ, Україна, ORCID ID: 0000-0002-3213-0032

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Iryna Z. Russu – 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, ORCID ID: 0000-0001-9676-2859

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, ORCID ID: 0000-0001-6801-401X

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, ORCID ID: 0000-0002-3213-0032

Стаття надійшла до редакції 01.04.2023 *Received: 01.04.2023*