

УДК 612.119:539.16.04+59.085

І. З. Руссу✉, Н. М. Білько

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

ВПЛИВ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН ЗА СУБЛЕТАЛЬНОГО ОПРОМІНЕННЯ

Мета: дослідження впливу мезенхімальних стромальних клітин на функціонування гемопоетичних клітин мишей лінії Balb/C після дії іонізуючої радіації у сублетальній дозі в культурі клітин *in vitro* та *in vivo*.

Методи. Для вивчення впливу стромального мікрооточення було використано модель співкультивування кровотворних клітин опромінених тварин та мезенхімальних клітин, що формують фідерні шари, у культурі *in vitro*. За допомогою барвника трипанового синього проведено оцінку кількості гемопоетичних клітин з ушкодженням цитоплазматичної мембрани та визначено рівень клітинної загибелі. Культивування клітин у культурі дифузійних камер *in vivo* дозволило оцінити проліферативний потенціал гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку опромінених тварин.

Результати. Дослідження взаємодії між стромальними та гемопоетичними клітинами кісткового мозку мишей Balb/C дозволило виявити модифікуючий вплив строми на рівень інтерфазної та репродуктивної загибелі клітин-попередників внаслідок дії іонізуючої радіації у сублетальній дозі. Зокрема, через 2 доби відсоток загинувих клітин у суспензії з безпосереднім контактом зі стромою *in vitro* був зниженим порівняно з гемопоетичними клітинами, де такий контакт був відсутнім: $(40,5 \pm 2,6) \%$ проти $(60,1 \pm 2,8) \%$. Спостерігалось також підвищення кількості клітинних агрегатів у культурах опромінених клітин-попередників, які заздалегідь взаємодіяли з мезенхімальними стромальними клітинами *in vitro* ($25,2 \pm 1,9$ КУО), у порівнянні з клітинами, які напряду не взаємодіяли зі стромою ($15,3 \pm 2,8$ КУО).

Висновки. Співкультивування зі стромальними клітинами суттєво знижувало рівень радіаційно-індукованої загибелі гемопоетичних клітин кісткового мозку та підвищувало їхню колонієутворюючу активність, проте для цього був потрібен безпосередній контакт із стромою у культурі *in vitro*.

Ключові слова: гемопоез; іонізуюча радіація; строма; кістковий мозок; миші Balb/C; стовбурові клітини; культура клітин *in vitro* та *in vivo*.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2025. Вип. 30. С. 273–283. doi: 10.33145/2304-8336-2025-30-273-283

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

I. Z. Russu✉, N. M. Bilko

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

INFLUENCE OF BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS ON THE FUNCTIONING OF HEMATOPOIETIC CELLS UNDER SUBLETHAL IRRADIATION

Objective: investigation of the influence of mesenchymal stromal cells on the functioning of hematopoietic cells of Balb/C mice after the exposure to ionizing radiation at a sublethal dose in cell culture *in vitro* and *in vivo*.

Methods. To study the influence of stromal microenvironment, a co-cultivation model of hematopoietic cells of irradiated animals and mesenchymal cells forming feeder layers was used in the *in vitro* culture. Using the trypan blue dye, the number of hematopoietic cells with cytoplasmic membrane damage was assessed and the level of cell death was determined. Cell cultivation in the diffusion chambers culture *in vivo* allowed assessing the proliferative potential of bone marrow hematopoietic stem cells of irradiated animals.

Results. Investigation of the interaction between bone marrow stromal and hematopoietic cells of Balb/C mice allowed determining the modifying influence of the stroma on the level of progenitor cells' interphase and reproductive death due to ionizing radiation action at a sublethal dose. In particular, after 2 days the percentage of dead cells in suspension with direct contact with the stroma *in vitro* was reduced compared to hematopoietic cells where such contact was absent: $(40.5 \pm 2.6) \%$ vs $(60.1 \pm 2.8) \%$. The increase in cell aggregates number was also observed in the cultures of irradiated progenitors, which had previously interacted with mesenchymal stromal cells *in vitro* (25.2 ± 1.9 CFU), compared to the cells, which did not directly interact with the stroma (15.3 ± 2.8 CFU).

Conclusions. Co-cultivation with stromal cells have significantly reduced the level of radiation-induced death of bone marrow hematopoietic cells and increased their colony-forming activity, however, this required the direct contact with stroma in the *in vitro* culture.

Key words: hematopoiesis; ionizing radiation; stroma; bone marrow; Balb/C mice; stem cells; cell culture *in vitro* and *in vivo*.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2025;30:273-283. doi: 10.33145/2304-8336-2025-30-273-283

ВСТУП

Іонізуюча радіація здатна зумовлювати суттєві ушкодження ДНК, найнебезпечнішими з яких є дволанцюгові розриви, а за відсутності репарації таких уражень у стовбурових кровотворних клітинах спостерігатимуться порушення в системі гемопоезу [1]. Зокрема, може відбуватися інтерфазна загибель клітин шляхом апоптозу, некрозу або аутофагії [2, 3], а також їхнє прискорене диференціювання або клітинне старіння [4]. Іонізуюче випромінювання може також спричиняти репродуктивну загибель клітин, тобто втрату їхньої здатності до поділу [5] – зазвичай через структурні ушкодження хромосом.

Гемопоетичні стовбурові клітини та ранні клітини-попередники загалом є більш радіочутливими, порівняно зі зрілишими клітинами системи гемопоезу. Зокрема, це проявляється у швидкій загибелі опромінених стовбурових клітин та клітин-попередників, у першу чергу шляхом апоптозу [6], зумовленого дволанцюговими розривами ДНК.

INTRODUCTION

Ionizing radiation can cause significant DNA damages, the most dangerous of which are double-strand breaks, and in the absence of repair of such injuries in hematopoietic stem cells disorders in the hematopoietic system will be observed [1]. In particular, interphase cell death may occur by means of apoptosis, necrosis or autophagy [2, 3], as well as their accelerated differentiation or cellular senescence [4]. Ionizing radiation can also cause reproductive cell death, i.e. the loss of their ability to divide [5] – usually due to the structural damages of chromosomes.

Hematopoietic stem cells and early progenitors are generally more radiosensitive, compared to more mature cells of the hematopoietic system. In particular, this is revealed in the rapid death of irradiated stem and progenitor cells, first of all through apoptosis [6], caused by DNA double-strand breaks.

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

Гемопоетичне мікрооточення відіграє вагомий роль у підтримці функціонування системи кровотворення у кістковому мозку. Мезенхімальні стромальні клітини синтезують значну кількість факторів, які регулюють проліферацію, диференціювання та міграцію гемопоетичних клітин [7, 8]. Крім того, мезенхімальні клітини кісткового мозку зазвичай є радіорезистентнішими за гемопоетичні, а ряд досліджень свідчить про те, що вони здатні модифікувати відповідь кровотворних клітин на дію іонізуючої радіації [9]. Фібробласти також можуть синтезувати білки, які запобігають апоптозу клітин пухлин та індують їхню резистентність до радіотерапії [10, 11]. Тому доцільним є дослідження впливу стромального мікрооточення на гемопоетичні стовбурові клітини та клітини-попередники за умов дії іонізуючого випромінювання.

МЕТА

Дослідження впливу мезенхімальних стромальних клітин на функціонування гемопоетичних клітин мишей лінії Balb/C після дії іонізуючої радіації у сублетальній дозі в культурі клітин *in vitro* та *in vivo*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження було проведене з використанням 24 мишей-самців лінії Balb/C, 12 з яких одноразово опромінювали у сублетальній дозі 5,95 Гр протягом 8,5 хв [12]. Контролем слугували інтактні миші Balb/C. Тварин утримували у стандартних умовах віварію Інституту проблем безпеки АЕС НАН України. Мишей опромінювали γ -квантами продуктів поділу ^{235}U у спеціальному каналі сховища ядерного палива ядерного реактора Інституту ядерних досліджень НАН України. Усі маніпуляції з тваринами виконували згідно з вимогами біоетики та міжнародними принципами Європейської конвенції про захист тварин, а також відповідно до законодавства щодо гуманного поводження з тваринами, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей [13]. Тварин піддавали евтаназії шляхом цервікальної дислокації та вилучали стегнові кістки, з яких у стерильних умовах за допомогою живильного середовища RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США) вимивали кістковий мозок. Суспензію клітин готували шляхом ресуспендування та змішування з повним живильним середовищем RPMI-1640 з L-глутаміном (Sigma-Aldrich, США), фетальною телячою сироваткою (Gibco, США) та антибіотиками (розчин пеніциліну-стрептоміцину, Gibco, США).

Hematopoietic microenvironment plays a significant role in the support of hematopoietic system functioning in bone marrow. Mesenchymal stromal cells synthesize a large number of factors, which regulate the proliferation, differentiation, and migration of hematopoietic cells [7, 8]. In addition, bone marrow mesenchymal cells are usually more radioresistant than hematopoietic cells, and several studies show that they can modify the response of hematopoietic cells to ionizing radiation action [9]. Fibroblasts also can synthesize proteins, which prevent tumor cells' apoptosis and induce their resistance to radiotherapy [10, 11]. Therefore, it is advisable to investigate the influence of stromal microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cells under the action of ionizing radiation.

OBJECTIVE

Investigation of the influence of mesenchymal stromal cells on the functioning of hematopoietic cells of Balb/C mice after the exposure to ionizing radiation at a sublethal dose in cell culture *in vitro* and *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

The investigation was performed using 24 male Balb/C mice, 12 of which were once irradiated at a sublethal dose of 5.95 Gy for 8.5 min [12]. Intact Balb/C mice served as controls. The animals were kept in standard conditions of the vivarium of the Institute for Safety Problems of Nuclear Power Plants NAS of Ukraine. Mice were irradiated with the γ -quants of ^{235}U fission products in a special channel of the nuclear fuel storage of the nuclear reactor of the Institute for Nuclear Research NAS of Ukraine. All the manipulations with animals were performed in accordance with the bioethics requirements and international principles of the European convention for the protection of animals, as well as in accordance with legislation on the humane treatment of animals used for experimental and other scientific purposes [13]. The animals were euthanized by means of cervical dislocation and the femurs were removed, from which under sterile conditions the bone marrow was washed out using RPMI-1640 nutrient medium (Sigma-Aldrich, USA). Cell suspension was prepared by resuspending and mixing with complete RPMI-1640 nutrient medium with L-glutamine (Sigma-Aldrich, USA), fetal calf serum (Gibco, USA) and antibiotics (penicillin-streptomycin solution, Gibco, USA).

Проводили оцінку життєздатності клітин за допомогою барвника трипанового синього; підрахунок кількості живих та забарвлених клітин здійснювали в камері Горяєва з використанням інвертованого мікроскопа (Olympus, Японія).

Заздалегідь готували стромальні фідерні шари з мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку інтактних мишей Balb/C [14]. Для цього суспензію кісткомозкових клітин змішували з культуральним середовищем DMEM (Invitrogen, США) з L-глутаміном та антибіотиками і переносили у пластикові культуральні планшети, які поміщали у CO₂-інкубатор (LEEC, Великобританія). Через одну добу проводили заміну половини обсягу живильного середовища, видаляючи неадгезовані клітини, а після цього кожні 3 доби половину обсягу середовища замінювали свіжим. На 7–10-ту добу, коли був сформований моношар стромальних клітин, їх знімали з поверхні пластику за допомогою розчину трипсин-EDTA (Gibco, США), відмивали центрифугуванням, додавали живильне середовище та переносили у 6-лункові і 24-лункові планшети. Після досягнення моношару в лунках клітини обробляли Мітоміцином С (Sigma-Aldrich, США) для зупинки процесу клітинного поділу, відмивали розчином PBS, додавали культуральне середовище DMEM і використовували як фідерний шар.

Гемопоетичні клітини опромінених і контрольних тварин культивували на стромальному фідерному шарі у суспензійній культурі *in vitro* протягом двох діб. Застосовували три варіанти культур – без стромального фідера, з фідером із безпосереднім контактом між гемопоетичними та стромальними клітинами, а також за відсутності прямого контакту між цими клітинами, із застосуванням гелевих дифузійних камер. Камери із суспензією переносили в 6-лункові пластикові планшети з фідерами (1 камера на 1 лунку). Лунки культуральних планшетів із гемопоетичними клітинами заповнювали повним живильним середовищем RPMI-1640 з L-глутаміном, антибіотиками та фетальною телячою сироваткою і поміщали у CO₂-інкубатор.

Готували препарати гемопоетичних клітин із суспензії за допомогою цитоцентрифуги Cytospin (Shandon, США) і забарвлювали їх за Паппенгеймом. Проводили морфологічний аналіз клітин на основі препаратів, виготовлених із суспензії кісткового мозку, з використанням світлового мікроскопа (Leica, ФРН).

Після цього визначали проліферативну активність гемопоетичних клітин за допомогою клонотипного аналізу в культурі дифузійних камер *in vivo* [15]. Культуральну суспензію готували на основі повного живильного середовища RPMI-1640 з додаванням

Cell viability was assessed using trypan blue dye; counting the number of live and stained cells was performed in Goryaev chamber with the usage of inverted microscope (Olympus, Japan).

Stromal feeder layers were prepared in advance from bone marrow mesenchymal stromal cells of intact Balb/C mice [14]. For this, the suspension of bone marrow cells was mixed with DMEM cultural medium (Invitrogen, USA) with L-glutamine and antibiotics and transferred into plastic cultural plates, which were placed in CO₂-incubator (LEEC, UK). After one day half of the volume of the nutrient medium was replaced, removing non-adherent cells, and after that every 3 days half of the volume of the medium was replaced with fresh one. On the 7th-10th day, when a monolayer of stromal cells was formed, they were removed from the plastic surface using trypsin-EDTA solution (Gibco, USA), washed by centrifugation, culture medium was added and cells were transferred into 6-well and 24-well plates. After reaching a monolayer in the wells, the cells were treated with Mitomycin C (Sigma-Aldrich, USA) to stop cell division process, washed with PBS solution, DMEM culture medium was added and cells were used as a feeder layer.

Hematopoietic cells of irradiated and control animals were cultivated on the stromal feeder layer in suspension culture *in vitro* for two days. Three variants of cultures were used – without a stromal feeder, with a feeder with direct contact between hematopoietic and stromal cells, and in the absence of direct contact between these cells, using gel diffusion chambers. The chambers with the suspension were transferred into 6-well plastic plates with feeders (1 chamber per 1 well). The wells of the cultural plates with hematopoietic cells were filled with complete RPMI-1640 nutrient medium with L-glutamine, antibiotics, and fetal calf serum and placed in CO₂-incubator.

The specimens of hematopoietic cells were prepared from suspension with the aid of cytocentrifuge Cytospin (Shandon, USA) and stained according to Pappenheim. Morphological analysis of the cells was performed based on the specimens, made from bone marrow suspension, using a light microscope (Leica, Germany).

After that proliferative activity of hematopoietic cells was determined using clonogenic assay in the diffusion chambers culture *in vivo* [15]. Cultural suspension was prepared on the basis of complete

L-глутаміну, антибіотиків та фетальної телячої сироватки, а також напіврідкого агару (Difco, США). Після застосування тіопенталової анестезії вносили гелеві дифузійні камери у черевну порожнину мишей-реципієнтів Balb/C, оброблених за добу до експерименту циклофосфамідом (Київмедпрепарат, Україна). Культивування тривало протягом 11 діб, після чого мишей піддавали евтаназії, камери вилучали та досліджували під інвертованим мікроскопом, підраховуючи кількість отриманих колоній-клонів. За колонії приймали агрегати, що склалися із 40 та більше клітин.

Статистичний аналіз результатів був проведений з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel. Достовірність відмінностей середніх значень двох сукупностей визначали за допомогою *t*-критерію Стюдента; дані представлено як середнє $\pm$ стандартне відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження взаємодії між стромальними і гемопоетичними клітинами кісткового мозку мишей Balb/C дозволило виявити модифікуючий вплив строми на рівень інтерфазної та репродуктивної загибелі клітин-попередників внаслідок дії іонізуючої радіації у сублетальній дозі. З цією метою проводили культивування клітин на фідерних шарах у суспензійній культурі *in vitro*, з безпосереднім контактом між клітинами (рис. 1А), за відсутності прямого контакту – з використанням гелевих дифузійних камер, а також у культурі без стромального фідерного

nutrient RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine, antibiotics, and fetal calf serum, as well as semi-solid agar (Difco, USA). After using thiopental anesthesia, gel diffusion chambers were inserted into the abdominal cavity of recipient Balb/C mice, treated with cyclophosphamide (Kyivmedpreparat, Ukraine) the day before the experiment. Cultivation continued for 11 days, after which the mice were euthanized, the chambers were removed and examined under an inverted microscope, counting the number of colonies-clones obtained. As colonies were considered aggregates, which consisted of 40 and more cells.

Statistical analysis of the results was performed using Microsoft Excel software. The significance of differences in mean values between two populations was determined using Student's *t*-test; data are presented as mean $\pm$ standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

The study of the interaction between bone marrow stromal and hematopoietic cells of Balb/C mice allowed revealing the modifying effect of the stroma on the level of interphase and reproductive death of progenitor cells due to the action of ionizing radiation at a sublethal dose. For this purpose, cell cultivation was performed on feeder layers in suspension culture *in vitro*, with direct contact between cells (Fig. 1A), in the absence of direct contact – using gel diffusion chambers, as well as in the culture without a stromal feeder layer. It should

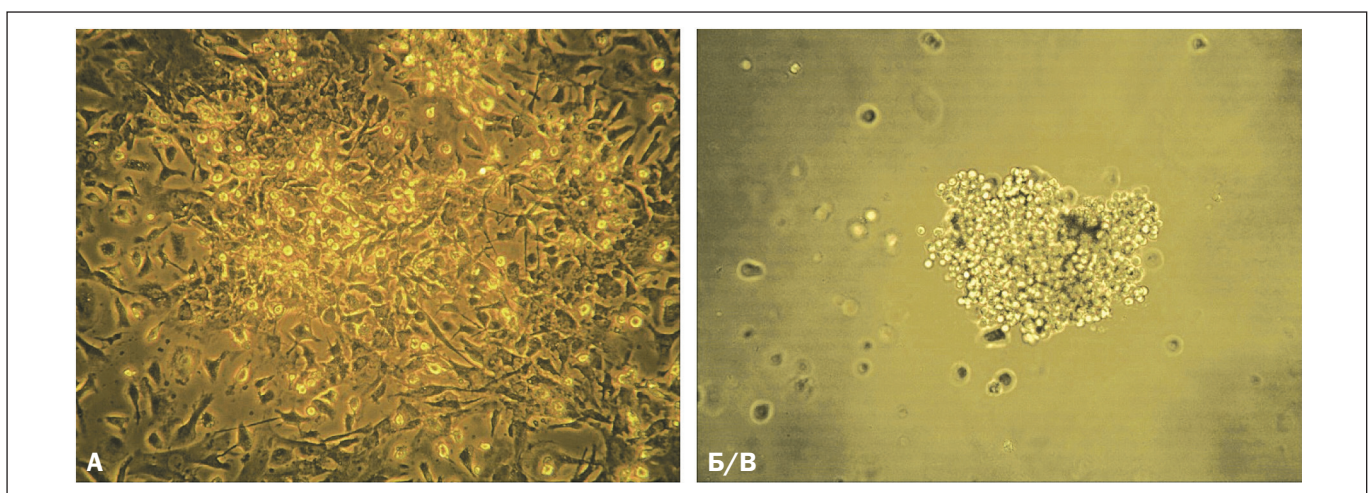


Рисунок 1. Клітини кісткового мозку мишей лінії Balb/C після опромінення у сублетальній дозі в культурі клітин на стромальному шарі *in vitro* (А), а також після формування колоній у культурі дифузійних камер *in vivo* (Б). Інвертований мікроскоп, зб. $\times 200$.

Figure 1. Bone marrow cells of Balb/C mice after irradiation at a sublethal dose in cell culture on stromal layer *in vitro* (A), as well as after forming the colonies in the diffusion chambers culture *in vivo* (B). Inverted microscope, $\times 200$.

шару. Слід зазначити, що дифузійні камери виготовлені з гелю, який дозволяє дифузію макромолекул ззовні [16], проте запобігає контакту між мезенхімальними і гемопоетичними клітинами.

Після двох діб співкультивування суспензію гемопоетичних клітин вилучали та готували препарати за допомогою цитоцентрифуги.

На даному етапі досліджень оцінювали відсоток живих та загинувших гемопоетичних клітин у суспензії за допомогою барвника трипанового синього, що здатен проникати в клітини з порушенням цілісності мембрани. Такі зміни характерні для клітин, що зазнали ушкоджень, зокрема, за дії іонізуючої радіації, внаслідок чого спостерігається загибель опромінених клітин — шляхом апоптозу, некрозу або аутофагії. Наслідком дії іонізуючої радіації окрім індукції апоптозу є також репродуктивна загибель клітин, що може бути оцінена методами клонотипного аналізу.

Одразу після опромінення гемопоетичні клітини, вилучені з кісткового мозку опромінених тварин, демонстрували доволі високу життєздатність (приблизно 95,0 %), проте в наступні години різко зростала кількість загинувших клітин (табл. 1). Так, через 24 год після опромінення вміст загинувших клітин у суспензії з фідером становив близько 24,0 %, у суспензії клітин, поміщених у дифузійні камери, — в середньому 32,3 %, а в суспензії без стромального фідера — 75,0 %. І нарешті, через 48 год співкультивування вміст загинувших клітин у суспензії з контактом зі строною складав 40,5 %, без прямого контакту зі строною — близько 61,3 %, а в суспензії без стромального фідера — 80,8 %.

be mentioned that the diffusion chambers are made of a gel, which allows the diffusion of macromolecules from the outside [16], but prevents contact between mesenchymal and hematopoietic cells.

After two days of co-cultivation the suspension of hematopoietic cells was removed and specimens were prepared using a cytocentrifuge.

At this phase of the investigation the percentage of live and dead hematopoietic cells in the suspension was estimated using the trypan blue dye, which can penetrate cells with impaired membrane integrity. Such changes are characteristic for the cells, which have been damaged, in particular, under ionizing radiation action, as a result of which the death of irradiated cells is observed — by means of apoptosis, necrosis or autophagy. The consequence of ionizing radiation action besides apoptosis induction is also reproductive cell death, which can be assessed by clonogenic analysis methods.

Immediately after irradiation, hematopoietic cells isolated from the bone marrow of irradiated animals showed rather high viability (approximately 95.0 %), but in the following hours the number of dead cells increased sharply (Table 1). Thus, 24 h after irradiation, the content of dead cells in the suspension with a feeder was about 24.0 %, in the suspension of cells placed in diffusion chambers — on average 32.3 %, and in the suspension without a stromal feeder — 75.0 %. Finally, after 48 h of co-cultivation the content of dead cells in the suspension with contact with the stroma was 40.5 %, without direct contact with the stroma — about 61.3 %, and in the suspension without a stromal feeder — 80.8 %.

Таблиця 1

Рівень клітинної загибелі в суспензії гемопоетичних клітин мишей Balb/C після опромінення у сублетальній дозі при культивуванні *in vitro* в присутності стромального фідерного шару

Table 1

Level of cell death in the suspension of hematopoietic cells of Balb/C mice after irradiation at a sublethal dose during cultivation *in vitro* in the presence of stromal feeder layer

Тип культур клітин <i>in vitro</i> Type of cell cultures <i>in vitro</i>	Група Group	Відсоток загинувших клітин у суспензії Percentage of dead cells in the suspension		
		0 год/г	24 год/г	48 год/г
Суспензійна зі стромальним фідерним шаром / Suspension with stromal feeder layer	Контроль / Control	2,0 ± 0,8	6,0 ± 0,8	11,3 ± 1,0
	Опромінення / Irradiation	5,8 ± 1,0	24,0 ± 1,8*	40,5 ± 2,6*
Суспензійна у дифузійних камерах зі стромальним фідерним шаром / Suspension in diffusion chambers with stromal feeder layer	Контроль / Control	1,8 ± 0,5	6,3 ± 1,0	11,5 ± 0,6
	Опромінення / Irradiation	5,5 ± 0,6	32,3 ± 3,5*	61,3 ± 2,8*
Суспензійна без стромального фідерного шару / Suspension without stromal feeder layer	Контроль / Control	2,5 ± 0,6	10,8 ± 1,5	19,8 ± 1,7
	Опромінення / Irradiation	4,5 ± 0,6	75,0 ± 2,2*	80,8 ± 1,5*

Примітка. *Різниця між групами достовірна, $p < 0,05$
Note. *Difference between the groups is reliable, $p < 0.05$

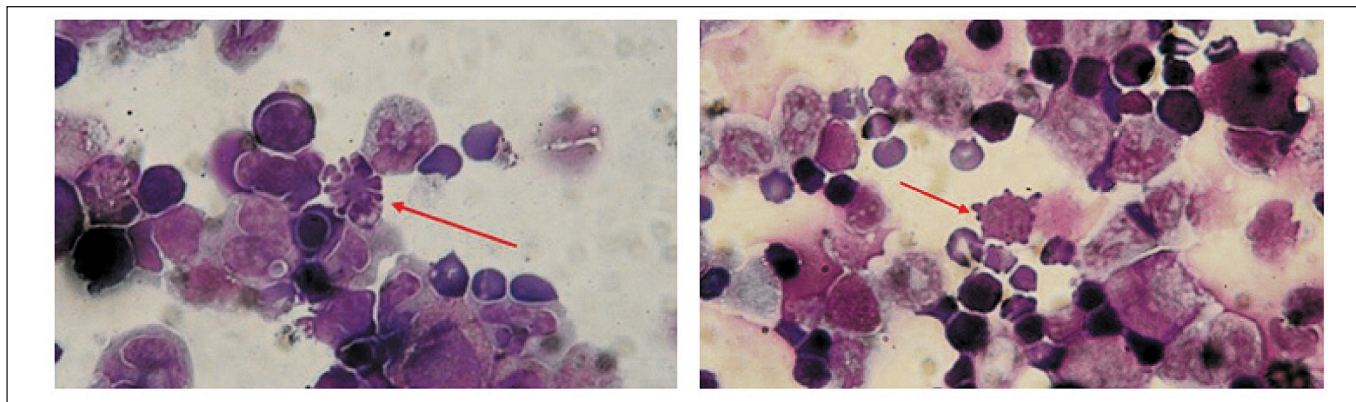


Рисунок 2. Препарати клітин кісткового мозку мишей лінії Balb/C після опромінення в сублетальній дозі. Апоптотичні клітини на стадії блебінгу. Забарвлення за Паппенгеймом, зб. $\times 900$.

Figure 2. Specimens of bone marrow cells of Balb/C mice after irradiation at a sublethal dose. Apoptotic cells at the phase of blebbing. Pappenheim staining, $\times 900$.

Дослідження препаратів гемопоетичних клітин дозволило виявити значну кількість клітин зі зміненою морфологією, а також клітин на стадії апоптозу (рис. 2). При дослідженні препаратів клітин визначали наявність апоптотичних змін за такими ознаками, як пікноз, фрагментація ядра і так званий блебінг (формування везикул на поверхні клітин). Крім того, виявляли такі зміни, як вакуолізація цитоплазми гемопоетичних клітин, патологічні мітози, двоядерні клітини, патологічна зернистість цитоплазми, наявність ворсинчастих відростків клітин та інші.

Наступним етапом був клоногенний аналіз гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників у культурі дифузійних камер *in vivo*. Це дозволило оцінити їхню здатність до утворення колоній (рис. 1B), кожна з яких походить з однієї клітини, що володіє високим проліферативним потенціалом.

У результаті проведених досліджень було виявлено суттєвий вплив строми на ефективність колонієутворення гемопоетичних клітин за її безпосереднього контакту з ними (табл. 2), а саме: спостерігалось підвищення кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) в культурах опромінених клітин, які заздалегідь взаємодіяли з мезенхімальними стромальними клітинами *in vitro* ($25,2 \pm 1,9$ КУО на 100 000 експлантованих клітин), у порівнянні з клітинами, які напряду не взаємодіяли зі стромою ($15,3 \pm 2,8$ КУО). У той же час, за відсутності стромального фідерного шару, проліферативний потенціал гемопоетичних клітин у культурі *in vivo* був значною мірою знижений ($9,5 \pm 1,6$ КУО).

Отже, мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку суттєво впливали на функціонування гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попе-

The study of hematopoietic cells' specimens allowed revealing a significant number of cells with altered morphology, as well as cells in the stage of apoptosis (Fig. 2). When studying cell specimens, the presence of apoptotic changes was determined by such features as pyknosis, nuclear fragmentation, and so-called blebbing (forming of vesicles on the cell surface). In addition, such changes were detected as vacuolization of hematopoietic cells' cytoplasm, pathological mitoses, binucleated cells, pathological granularity of the cytoplasm, the presence of villous cell spurs, and others.

The next phase was a clonogenic assay of hematopoietic stem and progenitor cells in the diffusion chambers culture *in vivo*. This allowed assessing their ability to form colonies (Fig. 1B), each of which is derived from a single cell that possesses high proliferative potential.

As a result of the performed studies, a significant influence of the stroma on hematopoietic cells' colony-forming efficiency was observed in case of its direct contact with them (Table 2). Namely, an increase in the number of colony-forming units (CFU) was observed in the cultures of irradiated cells, which had previously interacted with mesenchymal stromal cells *in vitro* (25.2 ± 1.9 CFU per 100 000 explanted cells), compared to the cells, which did not directly interact with the stroma (15.3 ± 2.8 CFU). At the same time, in the absence of a stromal feeder layer, the proliferative potential of hematopoietic cells in the *in vivo* culture was significantly reduced (9.5 ± 1.6 CFU).

Thus, bone marrow mesenchymal stromal cells significantly influenced the functioning of hematopoietic stem cells and progenitor cells

Таблиця 2
Ефективність колонієутворення гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку мишей Balb/C після опромінення в сублетальній дозі у культурі дифузійних камер *in vivo*

Table 2
Colony-forming efficiency of bone marrow hematopoietic stem cells of Balb/C mice after irradiation at a sub-lethal dose in the diffusion chambers culture *in vivo*

Тип культур клітин <i>in vitro</i> Type of cell cultures <i>in vitro</i>	Ефективність колонієутворення <i>in vivo</i> Efficiency of colony forming <i>in vivo</i>	
	Контроль / Control	Опромінення / Irradiation
Суспензійна зі стромальним фідерним шаром Suspension with stromal feeder layer	35,0 ± 2,6	25,2 ± 1,9*
Суспензійна у дифузійних камерах зі стромальним фідерним шаром Suspension in diffusion chambers with stromal feeder layer	34,2 ± 2,9	15,3 ± 2,8*
Суспензійна без стромального фідерного шару Suspension without stromal feeder layer	30,8 ± 1,5	9,5 ± 1,6*

Примітка. *Різниця між групами достовірна, $p < 0,05$
Note. *Difference between the groups is reliable, $p < 0.05$

редників, які зазнали впливу іонізуючої радіації, знижуючи рівень їх загибелі та зберігаючи їхній проліферативний потенціал. Проте для цього необхідна безпосередня взаємодія між стромою та опроміненими кровотворними клітинами, а механізм цього явища залишається не до кінця з'ясованим.

Пригнічення стромою радіаційно індукованої загибелі гемопоетичних клітин може свідчити про те, що виживання стовбурових клітин більшою мірою залежить від сигналів з гемопоетичного мікрооточення, ніж від внутрішньоклітинних шляхів регуляції апоптозу [9]. Слід також зазначити, що хоч гемопоетичне мікрооточення може зменшити цитотоксичний ефект, зумовлений радіаційним ушкодженням ДНК у стовбурових клітинах, проте набуті порушення в системі репарації подвійних розривів можуть у подальшому спричинити лейкемогенез [17, 18].

На основі здатності мезенхімальних стромальних клітин запобігати апоптозу та пришвидшеному диференціюванню гемопоетичних стовбурових клітин можна створювати культуральні системи, що дозволять підвищити їхній проліферативний потенціал і довше зберегти недиференційований стан клітин [19, 20].

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень було виявлено, що безпосередня взаємодія гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників опромінених мишей Balb/C зі стромальними клітинами в культурі *in vitro* знижує рівень радіаційно-індукованої загибелі в гемопоетичних клітинах. Крім того, ця взаємодія запобігає пригніченню клоногенного по-

exposed to ionizing radiation, reducing their death rate and preserving their proliferative potential. However, this requires a direct interaction between the stroma and the irradiated hematopoietic cells, and the mechanism of this phenomenon remains incompletely understood.

The suppression of radiation-induced hematopoietic cell death by stroma may indicate that stem cell survival depends more on the signals from hematopoietic microenvironment, than on intracellular pathways of apoptosis regulation [9]. It should be also mentioned that although the hematopoietic microenvironment can reduce the cytotoxic effect, caused by radiation-induced damage of DNA in stem cells, however, acquired defects in the reparation system of double-strand breaks may subsequently cause leukemogenesis [17, 18].

Based on the ability of mesenchymal stromal cells to prevent apoptosis and accelerated differentiation of hematopoietic stem cells, it is possible to create cultural systems, which will allow increasing their proliferative potential and maintaining the undifferentiated state of the cells for a longer period [19, 20].

CONCLUSIONS

As a result of performed investigations it was revealed that the direct interaction of hematopoietic stem and progenitor cells of irradiated Balb/C mice with stromal cells in the *in vitro* culture reduces the level of radiation-induced death in hematopoietic cells. Along with that, this interaction prevents the suppression of stem cells' clono-

тенціалу стовбурових клітин, яке зазвичай виникає при дії іонізуючого випромінювання. Отже, мезенхімальні стромальні клітини як компоненти гемопоетичного мікрооточення відіграють ключову роль у відновленні функціонування кровотворних клітин за умов дії іонізуючої радіації в сублетальній дозі. Ці дані можуть бути використані для розробки нових культуральних моделей для вивчення дії іонізуючої радіації та експансії гемопоетичних стовбурових клітин *ex vivo*.

Інформація про фінансування

Робота була підтримана грантом від Simons Foundation (SFI-PD-Ukraine-00014577, I.R.).

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

genic potential, which usually occurs under ionizing radiation action. Therefore, mesenchymal stromal cells as components of the hematopoietic microenvironment play a key role in the restoration of hematopoietic cells' functioning under the influence of ionizing radiation action at a sublethal dose. These data can be used to develop new cultural models for studying the effects of ionizing radiation and the expansion of hematopoietic stem cells *ex vivo*.

Funding information

Work was supported by a grant from the Simons Foundation (SFI-PD-Ukraine-00014577, I.R.).

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Medium-dose irradiation impairs long-term hematopoietic stem cell functionality and hematopoietic resilience to cytotoxic stress / Q. Zhang, A. Rydstrom, I. Hidalgo et al. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2025. Vol. 186. P. 106814. DOI: 10.1016/j.biocel.2025.106814.
2. Apoptosis, necrosis, and autophagy in mouse intestinal damage after 15-Gy whole body irradiation / Q. Chen, X. Xia, S. Wu et al. *Cell Biochem. Funct.* 2014. Vol. 32, no. 8. P. 647-656. DOI: 10.1002/cbf.3068.
3. Jiao Y, Cao F, Liu H. Radiation-induced cell death and its mechanisms. *Health Phys.* 2022. Vol. 123, no. 5. P. 376-386. DOI: 10.1097/HP.0000000000001601.
4. Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal.* 2014. Vol. 20, no. 9. P. 1447-1462. DOI: 10.1089/ars.2013.5635.
5. Transcriptional inhibition after irradiation occurs preferentially at highly expressed genes in a manner dependent on cell cycle progression / Z. Chen, X. Wang, X. Gao et al. *Elife.* 2024. Vol. 13. P. RP94001. DOI: 10.7554/eLife.94001.
6. Programmed cell death regulates hematopoietic cell homeostasis under radiation conditions / M. Shu, J. Zhang, Y. Peng et al. *Stem Cell Res. Ther.* 2025. Vol. 16, no. 1. P. 390. DOI: 10.1186/s13287-025-04502-3.
7. Yu V. W., Scadden D. T. Hematopoietic stem cell and its bone marrow niche. *Curr. Top Dev. Biol.* 2016. Vol. 118. P. 21-44. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2016.01.009.
8. Nakatani T., Nagasawa T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells in homeostasis and aging. *Exp. Hematol.* 2025. Vol. 144. P. 104749. DOI: 10.1016/j.exphem.2025.104749.
9. Attenuated DNA damage responses and increased apoptosis characterize human hematopoietic stem cells exposed to irradiation / S. Biechonski, L. Olender, A. Zipin-Roitman et al. *Sci Rep.* 2018. Vol. 8, no. 1. P. 6071. DOI: 10.1038/s41598-018-24440-w.

REFERENCES

1. Zhang Q, Rydstrom A, Hidalgo I, Cammenga J, Rundberg Nilsson A. Medium-dose irradiation impairs long-term hematopoietic stem cell functionality and hematopoietic resilience to cytotoxic stress. *Int J Biochem Cell Biol.* 2025 Sep;186:106814. doi: 10.1016/j.biocel.2025.106814.
2. Chen Q, Xia X, Wu S, Wu A, Qi D, Liu W, et al. Apoptosis, necrosis, and autophagy in mouse intestinal damage after 15-Gy whole body irradiation. *Cell Biochem Funct.* 2014 Dec;32(8):647-656. doi: 10.1002/cbf.3068.
3. Jiao Y, Cao F, Liu H. Radiation-induced cell death and its mechanisms. *Health Phys.* 2022 Nov 1;123(5):376-386. doi: 10.1097/HP.0000000000001601.
4. Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Mar 20;20(9):1447-1462. doi: 10.1089/ars.2013.5635.
5. Chen Z, Wang X, Gao X, Arslanovic N, Chen K, Tyler JK. Transcriptional inhibition after irradiation occurs preferentially at highly expressed genes in a manner dependent on cell cycle progression. *Elife.* 2024 Oct 11;13:RP94001. doi: 10.7554/eLife.94001.
6. Shu M, Zhang J, Peng Y, Li Z, Shu X, Wang J, et al. Programmed cell death regulates hematopoietic cell homeostasis under radiation conditions. *Stem Cell Res Ther.* 2025 Jul 21;16(1):390. doi: 10.1186/s13287-025-04502-3.
7. Yu VW, Scadden DT. Hematopoietic stem cell and its bone marrow niche. *Curr Top Dev Biol.* 2016;118:21-44. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.01.009.
8. Nakatani T, Nagasawa T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells in homeostasis and aging. *Exp Hematol.* 2025 Apr;144:104749. doi: 10.1016/j.exphem.2025.104749.
9. Biechonski S, Olender L, Zipin-Roitman A, Yassin M, Aqaq N, Marcu-Malina V, et al. Attenuated DNA damage responses and increased apoptosis characterize human hematopoietic stem cells

10. Stromal fibroblasts counteract the Caveolin-1-dependent radiation response of LNCaP prostate carcinoma cells / A. Wittka, J. Ketteler, L. Borgards et al. *Front. Oncol.* 2022. Vol. 12. P. 802482. DOI: 10.3389/fonc.2022.802482.
11. FAP positive cancer-associated fibroblasts promote tumor progression and radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma by transferring exosomal lncRNA AFAP1-AS1 / X. Zhou, Y. Tong, C. Yu et al. *Mol. Carcinog.* 2024. Vol. 63, no. 10. P. 1922-1937. DOI: 10.1002/mc.23782.
12. Радіозахисні ефекти меланін-глюканового комплексу з Fomes fomentarius та індраліну при опроміненні мишей Balb/c дозою 5,95 Гр/8,5 хв / О. Ф. Сеньок, О. В. Ковальов, Л. А. Паламар та ін. *Nucl. Phys. At. Energy.* 2014. Т. 15, № 2. С. 178-188. <https://doi.org/10.15407/jnpae2014.02.178>.
13. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137#Text (дата звернення: 15.07.2025).
14. Руссу І. З. Експериментальні підходи у вивченні біологічної дії іонізуючого випромінювання : навчально-методичний посібник. Київ, 2020. 82 с. URL: <https://ekmair.ukma.edu.ua/items/0f3d7d02-b3f1-44d5-af41-966d4865bbaa> (дата звернення: 12.06.2025).
15. Гуманізована модель культивування ізольованої суспензії гемопоетичних клітин-попередників для вивчення впливу іонізуючої радіації *in vivo* / Д. Білько, І. Руссу, Р. Бойко та ін. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2021. Вип. 26. С. 235-247. DOI: 10.33145/2304-8336-2021-26-235-247.
16. Characterization of the interactions between stromal and haematopoietic progenitor cells in expansion cell culture models / N. M. Bilko, I. A. Votyakova, S. V. Vasylovskaya et al. *Cell Biol. Int.* 2005. Vol. 29, no. 1. P. 83-86. DOI: 10.1016/j.cellbi.2004.11.016.
17. Oxidative stress and X-ray exposure levels-dependent survival and metabolic changes in murine HSPCs / M. Karabulutoglu, R. Finnnon, L. Cruz-Garcia et al. *Antioxidants (Basel)*. 2021. Vol. 11, no. 1. P. 11. DOI: 10.3390/antiox11010011.
18. DNA damage response of haematopoietic stem and progenitor cells to high-LET neutron irradiation. / M. Engelbrecht, R. Ndimba, M. de Kock et al. *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11, no. 1. P. 20854. DOI: 10.1038/s41598-021-00229-2.
19. Expansion on stromal cells preserves the undifferentiated state of human hematopoietic stem cells despite compromised reconstitution ability. / M. Magnusson, M.I. Sierra, R. Sasidharan et al. *PLoS One*. 2013. Vol. 8, no. 1. P. e53912. DOI: 10.1371/journal.pone.0053912.
20. Multipotent/pluripotent stem cell populations in stromal tissues and peripheral blood: exploring diversity, potential, and therapeutic applications / D. Aprile, D. Patrone, G. Peluso et al. *Stem Cell Res. Ther.* 2024. Vol. 15 no. 1. P. 139. DOI: 10.1186/s13287-024-03752-x.
- exposed to irradiation. *Sci Rep.* 2018 Apr 17;8(1):6071. doi: 10.1038/s41598-018-24440-w.
10. Wittka A, Ketteler J, Borgards L, Maier P, Herskind C, Jendrossek V, et al. Stromal fibroblasts counteract the Caveolin-1-dependent radiation response of LNCaP prostate carcinoma cells. *Front Oncol.* 2022 Jan 26;12:802482. doi: 10.3389/fonc.2022.802482.
11. Zhou X, Tong Y, Yu C, Pu J, Zhu W, Zhou Y, et al. FAP positive cancer-associated fibroblasts promote tumor progression and radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma by transferring exosomal lncRNA AFAP1-AS1. *Mol Carcinog.* 2024 Oct;63(10):1922-1937. doi: 10.1002/mc.23782.
12. Seniuk OF, Kovalev VO, Palamar LA, Krul NI, Gorovoj LF, Shevel VM. [Radioprotective effects of melanin-glucan complex from Fomes Fomentarius and indralin at irradiation of mice BALB/C by dose of 5.95 Gy/8.5 min]. *Nucl Phys At Energy.* 2014 15(2):178-188. <https://doi.org/10.15407/jnpae2014.02.178>. Ukrainian.
13. 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: 15.07.2025).
14. Russu IZ. [Experimental approaches in the study of biological action of ionizing radiation]. Kyiv; 2020. 82 p. Available from: <https://ekmair.ukma.edu.ua/items/0f3d7d02-b3f1-44d5-af41-966d4865bbaa> (accessed: 12.06.2025). Ukrainian.
15. 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.
16. Bilko NM, Votyakova IA, Vasylovskaya SV, Bilko DI. Characterization of the interactions between stromal and haematopoietic progenitor cells in expansion cell culture models. *Cell Biol Int.* 2005 Jan;29(1):83-6. doi: 10.1016/j.cellbi.2004.11.016.
17. Karabulutoglu M, Finnnon R, Cruz-Garcia L, Hill MA, Badie C. Oxidative stress and X-ray exposure levels-dependent survival and metabolic changes in murine HSPCs. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Dec 22;11(1):11. doi: 10.3390/antiox11010011.
18. Engelbrecht M, Ndimba R, de Kock M, Miles X, Nair S, Fisher R, et al. DNA damage response of haematopoietic stem and progenitor cells to high-LET neutron irradiation. *Sci Rep.* 2021 Oct 21;11(1):20854. doi: 10.1038/s41598-021-00229-2.
19. Magnusson M, Sierra MI, Sasidharan R, Prashad SL, Romero M, Saarikoski P, et al. Expansion on stromal cells preserves the undifferentiated state of human hematopoietic stem cells despite compromised reconstitution ability. *PLoS One*. 2013;8(1):e53912. doi: 10.1371/journal.pone.0053912.
20. Aprile D, Patrone D, Peluso G, Galderisi U. Multipotent/pluripotent stem cell populations in stromal tissues and peripheral blood: exploring diversity, potential, and therapeutic applications. *Stem Cell Res Ther.* 2024 May 12;15(1):139. doi: 10.1186/s13287-024-03752-x.

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: <https://orcid.org/0000-0001-9676-2859>

Білько Надія Михайлівна, доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри лабораторної діагностики біологічних систем, Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ, Україна

ORCID ID: <https://orcid.org/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: <https://orcid.org/0000-0001-9676-2859>

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

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3213-0032>

Стаття надійшла до редакції 14.08.2025

Received: 14.08.2025