

УДК 539.16.04+612.119+576.535

Д. І. Білько<sup>1</sup>✉, Р. В. Бойко<sup>1</sup>, І. З. Руссу<sup>1</sup>, І. С. Дягіль<sup>2</sup>, Н. М. Білько<sup>1</sup><sup>1</sup>Національний університет «Києво-Могилянська академія», вул. Григорія Сковороди, 2, м. Київ, 04070, Україна<sup>2</sup>Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Юрія Ілленка, 53, м. Київ, 04050, Україна

## АНАЛІЗ ВПЛИВУ ПРОЛОНГОВАНОГО ОПРОМІНЕННЯ НА ГЕМОПОЕТИЧНІ КЛІТИНИ-ПОПЕРЕДНИКИ У ГЕЛЕВИХ ДИФУЗІЙНИХ КАМЕРАХ ЗА ДОПОМОГОЮ МАТЕМАТИЧНОГО МОДЕЛЮВАННЯ

**Мета:** визначення функціональної активності гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку мишей, культивованих у гелевих дифузійних камерах, на етапах відновлення гемопоезу після їх пролонгованого опромінення у летальній дозі в порівняльному аспекті з методом колонієутворення у селезінці з використанням математичної моделі.

**Матеріали і методи.** Було використано метод культивування клітин у гелевих дифузійних камерах, цитологічні методи, математичне моделювання, статистичні методи досліджень. Зразки кісткового мозку, вилученого зі стегнової кістки мишей і опроміненого у сумарній дозі 8 Гр з потужністю 0,0028 Гр/хв, культивували у дифузійних камерах із напіврідким агаром у черевній порожнині мишей-реципієнтів лінії СВА.

**Результати.** Проведено порівняльний аналіз ефективності колонієутворення клітин-попередників (КУО) при культивуванні у гелевих дифузійних камерах у процесі відновлення гемопоезу протягом 30 діб, а також у селезінці летально опромінених тварин, у відповідності до математичної моделі. Аналіз кінетики колонієутворення у гелевих дифузійних камерах після пролонгованої дії іонізуючого опромінення свідчив про двофазний характер відновлення гемопоезу. Так, у перші кілька діб після опромінення спостерігається падіння кількості КУО порівняно з контролем, яке продовжується до 9-ї доби. Далі відбувається різке зростання кількості КУО в культурі клітин, яке продовжується до повного відновлення гемопоезу. Отримані дані, у перерахунку на стегнову кістку миші, відповідають результатам колонієутворення у селезінці опромінених тварин, описаним К. С. Чертковим (1973, 1977) та взятим за основу при побудові нами математичної моделі, а також її параметрам, які описують процес відновлення гемопоезу.

**Висновки.** Відповідність показників, отриманих при культивуванні методом гелевих дифузійних камер кісткового мозку мишей, опромінених пролонговано у сумарній дозі 8 Гр з потужністю 0,0028 Гр/хв, результатам колонієутворення у селезінці летально опромінених мишей, що були покладені в основу побудови математичної моделі, свідчить про доцільність використання математичної моделі для оцінки процесу відновлення гемопоезу клітинами-попередниками різних рівнів дозрівання, а експериментальний підхід вирощування КУО у гелевих дифузійних камерах може розглядатися як додатковий спосіб дослідження відновлення гемопоезу нарівні з методом селезінкових колоній.

**Ключові слова:** гемопоетичні клітини-попередники, зовнішнє пролонговане опромінення, культура клітин у гелевих дифузійних камерах, кінетика відновлення гемопоезу, математичне моделювання.

*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2022. Вип. 27. С. 203–215. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-203-215*

**D. I. Bilko<sup>1</sup>✉, R. V. Boiko<sup>1</sup>, I. Z. Russu<sup>1</sup>, I. S. Dyagil<sup>2</sup>, N. M. Bilko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>National University of Kyiv-Mohyla Academy, 2 Grygoriia Skovorody St., Kyiv, 04070, Ukraine

<sup>2</sup>State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Yurii Illienka St., Kyiv, 04050, Ukraine

## **ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF PROLONGED IRRADIATION ON HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS IN GEL DIFFUSION CHAMBERS USING MATHEMATICAL MODELLING**

**Objective:** determining of the functional activity of mice bone marrow hematopoietic progenitor cells, cultivated in gel diffusion chambers, on the stages of hematopoiesis recovery after their prolonged irradiation in the lethal dose in a comparative aspect with the method of colony forming in spleen using mathematical model.

**Materials and methods.** The method of cell cultivation in gel diffusion chambers, cytological methods, mathematical modeling, and statistical methods of research were used. Bone marrow samples extracted from the femur of mice irradiated with a total dose of 8 Gy with a power 0.0028 Gy/min were cultivated in diffusion chambers with semi-solid agar in the abdominal cavity of CBA recipient mice.

**Results.** Comparative analysis of the colony-forming efficiency of progenitor cells (CFU) was carried out during cultivation in gel diffusion chambers in the process of hematopoiesis recovery for 30 days, as well as in the spleen of lethally irradiated animals, in accordance with the mathematical model. Analysis of colony forming kinetics in gel diffusion chambers after prolonged exposure to ionizing radiation indicated the biphasic nature of hematopoiesis recovery. Thus, in the first few days after the irradiation a drop in the number of CFU is observed compared to the control, which continues until the 9<sup>th</sup> day. Subsequently there is a sharp increase in the number of CFU in cell culture, which continues until the complete recovery of hematopoiesis. The obtained data, recalculated per mouse femur, correspond to the results of colony forming in the spleen of irradiated animals, described by K. S. Chertkov and taken as a basis while developing our mathematical model, as well as to its parameters, which describe the process of hematopoiesis recovery.

**Conclusions.** Conformity of the indices obtained during the cultivation using the method of gel diffusion chambers of mice bone marrow prolongedly irradiated at a total dose of 8 Gy with a power 0.0028 Gy/min, to the results of colony forming in spleen of lethally irradiated mice, which were the basis for mathematical model development, is the evidence of the feasibility of using a mathematical model to assess the process of hematopoiesis recovery by progenitor cells of different maturation levels, and the experimental approach of CFU growing in gel diffusion chambers can be considered as an additional method of researching the hematopoiesis recovery along with the spleen colony method.

**Key words:** hematopoietic progenitor cells, external prolonged irradiation, cell culture in gel diffusion chambers, kinetics of hematopoiesis recovery, mathematical modelling.

*Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2022;27:203-215. doi: 10.33145/2304-8336-2022-27-203-215*

### **ВСТУП**

Кровотворна система функціонує за принципом фізіологічної регенерації. Гармонія процесів проліферації і диференціювання забезпечує стабільну підтримку гемопоезу за рахунок стовбурових клітин, які асиметричним шляхом діляться для того, щоб, з одного боку, залишитись у компартменті стовбурових клітин, а з іншого — дати початок таким самим дочірнім клітинам, які вступають на шлях ампліфікації і дозрівання у морфологічно ідентифіковані клітини і, у подальшому, поповнюють пул функціонально зрілих клітин [1–3].

### **INTRODUCTION**

Hematopoietic system is functioning by the principle of physiological regeneration. The harmony of proliferation and differentiation processes provides the consistent support of hematopoiesis basing on stem cells, which divide asymmetrically with the aim, on one side, to remain in stem cells compartment, and on the other side, to give rise to the same daughter cells, which enter the path of amplification and maturation into morphologically identified cells, and further refill the pool of functionally

✉ Denys I. Bilko, e-mail: comraduk@yahoo.co.uk

Згідно з теорією Й. Л. Черткова [4], потенціал гемопоетичних стовбурових клітин не є нескінченним; він виснажується, особливо в результаті стресів, таких як дія іонізуючої радіації. Стовбурові клітини закладаються в ембріогенезі, дозрівають і колонізують «ніші» в організмі новонародженої дитини, які будуть джерелами гемопоетичних стовбурових клітин протягом життя [4–6]. У першу чергу, це кістковий мозок, але в організмі мишей стовбурові клітини в незначній кількості знаходяться ще й у периферійній крові, печінці, селезінці, лімфатичних вузлах і навіть перитонеальному ексудаті [7].

Закономірності поведінки кровотворних стовбурових клітин у разі дії іонізуючої радіації в різних дозах були покладені нами в основу побудови математичної моделі, у якій мовою математичних символів зображені етапи відновлення системи кровотворення після збурюючого впливу іонізуючої радіації [8]. Математична модель створена на основі схеми кровотворення, запропонованої Й. Л. Чертковим [1, 4, 9]. Незважаючи на те, що ці дані отримані радіобіологами ще у 1970–1980-х роках, результати яскравих експериментальних досліджень тих років не втрачають своєї наукової значущості. Дія гострого і хронічного іонізуючого опромінення на організм ссавців, і, в першу чергу, на кровотворну систему, широко вивчається у всьому світі [10, 11]. Особливе місце поміж форм опромінення займає пролонговане. Відомо, що летальна доза іонізуючої радіації для миші (8 Гр) не залишає шансів на виживання. Проте пролонговане опромінення у сумарному обсязі тією ж дозою призводить до зовсім іншого ефекту [12, 13].

Вивчаючи різні аспекти відповіді гемопоезу мишей на пролонговане опромінення, автори звернули увагу на неочікуваний характер дії низьких доз іонізуючої радіації протягом первинної фази відповіді, коли клітини демонструють високу радіочутливість. Разом з тим, друга фаза представляє активний процес відновлення кровотворної функції. Двофазний процес відновлення гемопоезу під час пролонгованого опромінення, коли перші доби після опромінення супроводжуються значним пригніченням колонієутворення у селезінці летально опромінених мишей, дослідники пояснюють затримкою виходу стовбурових клітин із фази G<sub>0</sub>, у якій вони знаходяться в стабільному стані. У другій фазі відновлення гемопоезу включаються механізми, які шляхом ампліфікації клітин-попередників і скорочення клітинного циклу забезпечують активацію проліферації ранніх кровотворних клітин; це супроводжується дозозалежним

成熟 cells [1–3]. According to the theory of J. L. Chertkov [4], stem cell potential is not infinite; it is being depleted, especially as a result of stress, such as the action of ionizing radiation. Stem cells are deposited in embryogenesis, mature and colonize «niches» in the body of a newborn child, which will be the sources of hematopoietic stem cells during the life [4–6]. First of all, it is the bone marrow, but in the mice organism stem cells are also found in small quantities in the peripheral blood, liver, spleen, lymph nodes, and even in peritoneal exudate [7].

The regularities of hematopoietic stem cells behavior in case of ionizing radiation action in various doses we put as a basis of mathematical model development in which, with the aid of mathematical symbols, the stages of hematopoietic system recovery are represented after the disturbing influence of ionizing radiation [8]. The mathematical model is established on the basis of the hematopoiesis scheme proposed by J. L. Chertkov [1, 4, 9]. Despite the fact that these data were obtained by radiobiologists back in the 1970s and 1980s, the results of prominent experimental studies of those years do not lose their scientific significance. The action of acute and chronic ionizing radiation on the mammals' organism, and primarily on the hematopoietic system, is widely studied throughout the world [10, 11]. Prolonged irradiation occupies a special place among the forms of radiation. It is known that a lethal dose of ionizing radiation for a mouse (8 Gy) leaves no chance of survival. However, prolonged irradiation in the total amount with the same dose leads to a completely different effect [12, 13].

Studying the various aspects of mice hematopoiesis response to prolonged irradiation, the authors paid attention to the unexpected nature of low doses of ionizing radiation action during the initial phase of the response, when the cells demonstrate high radiosensitivity. At the same time, the second phase represents an active process of the recovery of hematopoietic function. The two-phase process of hematopoiesis recovery during prolonged irradiation, when the first days after irradiation are followed by a significant suppression of colony forming in the spleen of lethally irradiated mice, the researchers explain by the delay in the stem cells exit from G<sub>0</sub> phase, in which they reside in a steady state. In the second stage of hematopoiesis recovery, mechanisms are included which, by amplifying progenitor cells and shortening the cell cycle, provide the activation of proliferation of early hematopoietic cells; this is accompanied by a dose-dependent

ефектом, який не спостерігається на початкових етапах після пролонгованого опромінення [12].

Доказом реального існування гемопоетичних стовбурових клітин і їхніх найближчих нащадків — клітин-попередників — є клональні методи досліджень, завдяки яким з однієї клітини *ex vivo* утворюються клітинні агрегати, що представляють клітинні клони [14–16]. Перша ознака, яка відрізняє ранні стадії дозрівання стовбурової кровотворної клітини, полягає у поступовому зниженні проліферативного потенціалу. Під час подальшого дозрівання клітини залишають стадію стовбурових клітин і переходять у стадію комітованих попередників. Поступово комітовані клітини втрачають поліпотентність і переходять у відділ бі- та уніпотентних клітин. Існує думка, що до вибору того чи іншого напрямку диференціювання призводять внутрішні стохастичні зміни клітин-попередників, які індукують дозрівання і комітування. Останнє може бути визначено як рішення, що його приймає клітина для продукування нащадків певної лінії у майбутньому. Комітовані клітини набувають чутливості до гуморальних регуляторів кровотворення [11, 16]. Культивування їх у напіврідкому середовищі (агар, метилцелюлоза) у присутності цих факторів дозволяє отримувати колонії диференційованих клітин [15, 17].

Існує ієрархія кровотворних клітин-попередників, які замінюють одна одну на етапах дозрівання. Перші з них називаються колонієутворюючими одиницями у селезінці (КУОс), які з'являються у вигляді осередків кровотворення після введення кістково-мозкових клітин мишей-донорів у хвостову вену летально опроміненої тварини [14, 17]. Наступний етап розвитку представлений колонієутворюючими одиницями, які здатні утворювати колонії у напіврідкому агарі (КУОк) в результаті культивування кістково-мозкових клітин *in vitro*. КУОс тісно пов'язані з популяцією цих клітин — КУОк вважаються комітованими нащадками КУОс. Аналіз популяцій клітин у кістковому мозку за допомогою методів клітинного фракціонування показав, що КУОк походить безпосередньо з КУОс [9, 18, 17].

Місце клітини-попередника, яка формує клони у дифузійній камері з напіврідким агаром (КУОдк) в організмі тварини-реципієнта, вважається таким, що знаходиться поміж цими двома попередниками. Беручи до уваги, що колонієутворюючі одиниці у селезінці (КУОс) і колонії, які утворюються у результаті культивування в дифузійних камерах (КУОдк), відносяться до того самого відділу стовбурових клітин, ми поставили перед собою задачу перевірити

effect, which is not observed in the initial stages after prolonged exposure [12].

The evidence of the real existence of hematopoietic stem cells and their closest descendants — progenitor cells — are the clonal research methods, due to which cell aggregates which represent cell clones are formed from one cell *ex vivo* [14–16]. The first characteristic which distinguishes the early stages of hematopoietic stem cell maturation consists in a gradual decrease in the proliferative potential. During further maturation, cells leave the stage of stem cells and enter the stage of committed progenitors. Committed cells gradually lose their polypotency and move into the compartment of bi- and unipotent cells. There is an opinion that internal stochastic changes of progenitor cells, which induce maturation and commitment, lead to the choice of one or another lineage of differentiation. The latter can be defined as the decision made by a cell to produce descendants of a particular lineage in the future. Committed cells acquire the sensitivity to humoral regulators of hematopoiesis [11, 16]. Cultivating them in a semi-solid medium (agar, methylcellulose) in the presence of these factors allows obtaining colonies of differentiated cells [15, 17].

There is a hierarchy of hematopoietic progenitor cells, which replace each other at the maturation stages. The first of them are called colony-forming units in the spleen (CFU-S), which appear in the form of hematopoietic sites after the injection of bone marrow cells of donor mice into the tail vein of a lethally irradiated animal [14, 17]. The next stage of development is represented by the colony-forming units, which are able to form colonies in semi-solid agar (CFU-C) as a result of *in vitro* cultivation of bone marrow cells. CFU-S are closely related to the population of these cells — CFU-C are considered to be the committed descendants of CFU-S. Analysis of cell populations in the bone marrow using cell fractionation methods has shown that CFU-C originates directly from CFU-S [9, 18, 17].

The place of the progenitor cell, which forms clones in a diffusion chamber in semi-solid agar (CFU-d) in the body of the recipient animal, is considered to be between these two progenitors. Taking into account that colony-forming units in the spleen (CFU-S) and colonies formed as a result of cultivation in diffusion chambers (CFU-d) belong to the same compartment of stem cells, we set ourselves the task to verify the functioning of

функціонування математичної моделі на наступних після КУОс клітинах-попередниках. М'яка консистенція поліакриламідного каркасу забезпечує активну проліферацію гемопоетичних клітин-попередників у дифузійних камерах. Клональний характер КУОдк доводиться наявністю прямої залежності між кількістю експлантованих клітин і кількістю сформованих колоній [19].

## МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Визначення функціональної активності гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку мишей, культивованих у гелевих дифузійних камерах, на етапах відновлення гемопоезу після їх пролонгованого опромінення у летальній дозі у порівняльному аспекті з методом колонієутворення у селезінці з використанням математичної моделі.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

### Культивування клітин кісткового мозку в оригінальних гелевих дифузійних камерах у напіврідкому агарі *in vivo* (КУОдк)

Вивчався вплив пролонгованого іонізуючого опромінення у дозі (8 Гр) з потужністю 0,0028 Гр/хв на кровотворну систему мишей лінії СВА із застосуванням культури клітин у гелевих дифузійних камерах протягом 30 діб після закінчення дії радіації. Опромінення тварин проводилося на установці РУМ-17 з приставкою для ротації об'єкта, що опромінюється, зі швидкістю обертання 2 об./хв.

Всі маніпуляції з тваринами здійснювались відповідно до вимог біоетики та міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин і національного законодавства з гуманного поводження з тваринами, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей.

Виділені зі стегнової кістки клітини кісткового мозку підраховували у гемоцитометрі та в кількості  $1 \times 10^5$  клітин на культуру вносили в повне культуральне середовище, яке включало середовище DMEM (Gibco, Німеччина), антибіотики: 50 ОД/мл пеніциліну та 50 мг/мл стрептоміцину (Gibco, Німеччина), 10 % телячої ембріональної сироватки (Sigma-Aldrich, США) і 0,33 % агар (Difco, США). Дифузійні камери визначеної жорсткості виготовляли з поліакриламідного гелю [19]. Суспензія клітин у напіврідкому агарі вводилася шляхом проколу бокової стінки камери голкою з шприцом. Мишей-реципієнтів камер заздалегідь (за добу до експерименту) обробляли цитостатиком ендоксаном (Baxter, Німеччина) у дозі 200 мг/кг маси тварин з метою

математичної моделі на прогениторні клітини після КУОс. М'яка консистенція поліакриламідного каркасу забезпечує активну проліферацію гемопоетичних клітин-попередників у дифузійних камерах. Клональний характер КУОдк доводиться наявністю прямої залежності між кількістю експлантованих клітин і кількістю сформованих колоній [19].

## OBJECTIVE

Determining of the functional activity of mice bone marrow hematopoietic progenitor cells, cultivated in gel diffusion chambers, on the stages of hematopoiesis recovery after their prolonged irradiation in the lethal dose in a comparative aspect with the method of colony forming in spleen using mathematical model.

## MATERIALS AND METHODS

### Cultivation of bone marrow cells in original gel diffusion chambers in semi-solid agar *in vivo* (CFU-d)

The effect of prolonged ionizing radiation in a lethal dose (8 Gy) on the hematopoietic system of CBA mice was studied using cell culture in gel diffusion chambers within 30 days after the end of radiation action. The irradiation of animals was performed on the RUM-17 unit with an attachment for rotating the irradiated object at a rotation speed of 2 rpm.

All manipulations with the animals were carried out in accordance with the requirements of bioethics and international principles of the European convention on the animals' protection and national legislation on the humane treatment of animals used for experimental and other scientific purposes.

Bone marrow cells isolated from the femur were counted in hemocytometer and in the amount of  $1 \times 10^5$  cells per culture were placed in complete culture medium, which included DMEM medium (Gibco, Germany), antibiotics: 50 U/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin (Gibco, Germany), 10 % fetal calf serum (Sigma-Aldrich, USA), and 0.33 % agar (Difco, USA). Diffusion chambers of defined stiffness were made of the polyacrylamide gel [19]. Suspension of the cells in semi-solid agar was injected by puncturing the side wall of the chamber with a needle and syringe. Mice-recipients of the chambers were treated in advance (a day before the experiment) with the cytostatic endoxan (Baxter, Germany) at a dose of 200

вивільнення колонієстимулюючих факторів. Культивування проводилося протягом 7 діб, після чого мишей виводили з експерименту цервікальною дислокацією спинного мозку; камери виймали і вивчали під інвертованим мікроскопом (Zeiss, Німеччина) без демонтажу. Підраховували загальну кількість колоній (агрегати, що складаються більш, ніж із 40 клітин), які утворювались у процесі культивування [19].

На етапах відновлення чисельності КУО кісткового мозку мишей (на 2, 3, 4, 7, 9, 11, 13, 16, 19, 23-тю і 30-ту добу) визначали кількість колоній, використовуючи запропоновану нами раніше математичну модель для визначення параметрів колонієутворення, які підтверджували експериментально [2]. Експерименти проводилися у 3 повторах. У кожному експерименті використовували по 33 тварини, а саме, 3 тварини на кожний вказаний термін досліджень.

Визначали середнє значення отриманих показників і стандартне відхилення, а також порівнювали їх за допомогою *t*-критерію Стьюдента для незалежних вибірок; відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ . Отримані дані аналізували за допомогою інструментів Microsoft Excel.

### Принцип побудови оригінальної математичної моделі відновлення гемопоезу після опромінення

Математична модель для оцінки відновлення гемопоезу на прикладі пролонгованого опромінення описана групою авторів під керівництвом проф. Р. В. Бойка (2010–2022). Принцип її побудови полягає у тому, що закономірності процесу, які в експерименті спостерігали К. С. Чертков зі співавт., щодо зміни чисельності КУОс після опромінення, відображені за допомогою математичних символів. Рівняння, що описує зміни чисельності КУО після припинення опромінення, матиме такий вигляд:

$$\frac{dM(t)}{dt} = \frac{m_0}{\tau_0 C_K} + \frac{p}{\tau} M(t) - \frac{d}{\tau} M(t), \quad (1)$$

де  $M_1(t) = \frac{N(t)}{C_K}$  – відносна чисельність КУО через

проміжок часу  $t$  після припинення опромінення;  
 $N(t)$  – чисельність КУО через проміжок часу після припинення опромінення;

$C_K$  – чисельність КУО у контролі;

$\frac{m_0}{\tau_0 C_K}$  – відносна швидкість надходження КУО до кісткового мозку;

mg/kg of animal weight in order to release colony-stimulating factors. Cultivation was carried out for 7 days, after which the mice were removed from the experiment by cervical dislocation of the spinal cord; the cameras were removed and studied under an inverted microscope (Zeiss, Germany) without the dismantling. The total number of colonies was counted (aggregates consisting of more than 40 cells), which were formed during cultivation [19].

At the stages of recovery of CFU number in mice bone marrow (on the 2, 3, 4, 7, 9, 11, 13, 16, 19, 23<sup>rd</sup>, and 30<sup>th</sup> day) the number of colonies was determined, using mathematical model previously proposed by us for determining the parameters of colony forming, which were confirmed experimentally [2]. Experiments were performed in 3 repetitions. In each experiment, 33 animals were used, namely, 3 animals for each specified period of investigation.

The mean of obtained indices and standard deviation were determined and compared using Student's *t*-test for independent samples; differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . The obtained data were analyzed using Microsoft Excel tools.

### Principle of original model development of the hematopoiesis recovery after irradiation

A mathematical model for assessing the recovery of hematopoiesis based on the example of prolonged irradiation was described by a group of authors under the guidance of Prof. R. V. Boiko (2010–2022). The principle of its development consists in the fact that the regularities of the process, observed in the experiment by K. S. Chertkov et al., concerning the alterations in the number of CFU-S after irradiation, are displayed with the help of mathematical symbols. The equation, which describes alterations in relative number of CFU after the termination of irradiation, will be written as:

where  $M_1(t) = \frac{N(t)}{C_K}$  – relative number of CFU in

the interval of time  $t$  after the termination of irradiation;  
 $N(t)$  – number of CFU in the interval of time after the termination of irradiation;

$C_K$  – number of CFU in control;

$\frac{m_0}{\tau_0 C_K}$  – relative incoming rate of CFU to bone marrow;

$\tau_0$  – тривалість проміжку часу, через який клітини надходять до популяції КУО;

$m_0$  – кількість джерел, з яких надходять КУО до кісткового мозку;

$p$  – відсоток клітин, які після поділу поповнюють популяцію КУО;

$d$  – відсоток клітин, які після поділу поповнюють популяцію комітованих попередників кровотворення;

$\tau$  – середня тривалість клітинного циклу КУО.

Дослідниками доведено, що гемопоетичні стовбурові клітини знаходяться у стані постійної та інтенсивної репопуляції, тобто, вони мігрують з одних кровотворних органів, щоб прижитися в інших. Це не можна не враховувати, коли йдеться про вплив іонізуючої радіації, хоча основним кровотворним органом визнаний кістковий мозок [7].

Розв'язок рівняння (1) на проміжках часу, де параметри відновлення популяції КУО  $\frac{m_0}{\tau_0 C_K}$ ,  $p$ ,  $d$ ,  $\tau$  незмінні, матиме такий вигляд:

$$M(t) = \frac{m_0}{\tau_0 C_K (-\lambda)} + e^{\lambda t} \left( M(t_0) + \frac{m_0}{\tau_0 C_K \lambda} \right), \quad (2)$$

де  $\lambda = \frac{p-d}{\tau}$ ,  $M(t_0)$  – відносна чисельність КУО кісткового мозку на початку спостереження  $t_0$ .

За умови  $\lambda < 0$  величину  $S = \frac{m_0}{\tau_0 C_K (-\lambda)}$  називатимемо відносним рівнем стабілізації КУО кісткового мозку, коли  $t_0 \rightarrow \infty$  при незмінних параметрах функціонування популяції КУО кісткового мозку [2].

Результати зміни відносної чисельності КУОс стегнової кістки мишей після пролонгованого опромінення у дозі 8 Гр отримані з урахуванням того факту, що  $C_K$  – чисельність КУОс стегнової кістки у нормі становить 5616 (5382–5850) клітин [1], вміст КУОс у стегновій кістці дорослої миші дорівнює 44 400, а в одній стегновій кістці знаходиться 8,5 % загальної маси кісткового мозку [7].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У попередній публікації нами було продемонстровано, як результати розробок групи дослідників під керівництвом К. С. Черткова [1] були відображені за допомогою математичних символів та відповідних формул, які враховували закономірності відновлення кровотворення у заданих умовах. Для підтвердження адекватності запропонованої нами математичної моделі у даній роботі ми провели експерименти в таких

$\tau_0$  – duration of the time interval, in which cells come to CFU population;

$m_0$  – number of sources, from which CFU come to bone marrow;

$p$  – percent of the cells, which after the division refill the population of CFU;

$d$  – percent of the cells, which after the division refill the population of committed hematopoietic progenitors;

$\tau$  – the average duration of CFU cell cycle.

Researchers have proven that hematopoietic stem cells are in a state of constant and intensive repopulation, that is, they migrate from some hematopoietic organs to engraft in the others. This cannot be ignored when it comes to the influence of ionizing radiation, although bone marrow is recognized as the main hematopoietic organ [7].

Solution to equation (1) in the intervals of time, where parameters of CFU population recovery  $\frac{m_0}{\tau_0 C_K}$ ,  $p$ ,  $d$ ,  $\tau$  are constant, will be written as:

where  $\lambda = \frac{p-d}{\tau}$ ,  $M(t_0)$  – relative number of bone marrow CFU at the beginning of observation  $t_0$ .

Upon condition  $\lambda < 0$  the value  $S = \frac{m_0}{\tau_0 C_K (-\lambda)}$  we will call the relative level of bone marrow CFU stabilization, when  $t_0 \rightarrow \infty$  in case of constant parameters of bone marrow CFU population functioning [2].

Results of the alterations in relative number of mice femur CFU-S after prolonged irradiation in the dose of 8 Gy are obtained taking into account the fact that  $C_K$  – the number of femur CFU-S is equal to 5616 (5382–5850) cells in normal conditions [1], the CFU-S content in the femur of the adult mouse is equal to 44 400, and one femur contains 8.5 % of the total bone marrow mass [7].

## RESULTS AND DISCUSSION

In previous publication we have demonstrated how the results of elaborations of the researchers group led by K. S. Chertkov [1] were reflected using mathematical symbols and corresponding formulas, which took into account the regularities of hematopoiesis recovery under given conditions. In order to confirm the adequacy of the mathematical model proposed by us, in this work we conducted experiments under

же умовах опромінення, використовуючи інший метод оцінки процесів відновлення гемопоєзу при збудуючому впливі іонізуючої радіації – а саме, культуру клітин у гелевих дифузійних камерах, занурених у черевну порожнину лабораторних тварин.

Виходячи з того, що до відділу стовбурових клітин належать гемопоетичні клітини-попередники, серед яких попередники, що вирощуються у дифузійних камерах (КУОдк), займають в ієрархії найближче місце до стовбурової клітини, ми культивували гемопоетичні клітини у камерах, перераховуючи отримані показники на стегно миші так, як це робили автори статті [1]. Згідно з умовами, описаними у статті К. С. Чертковим, визначали ефективність колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників із кісткового мозку мишей, опромінених пролонговано у сумарній дозі 8 Гр, у гелевих дифузійних камерах, імплантованих мишам-реципієнтам лінії СВА. Матеріал, отриманий у різні терміни після опромінення, занурювався у напіврідкому агарі у гелеві дифузійні камери, які утримувалися у черевній порожнині мишей. На 7-му добу виводили з експерименту по 3 миші та вивчали камери під інвертованим мікроскопом; рахували кількість колоній з розрахунку  $1 \times 10^5$  експлантованих клітин і перераховували їхню кількість на стегову кістку, беручи до уваги, що в нормі кількість КУО у стеговій кістці мишей знаходиться у межах від 5382 до 5850 [1].

Аналіз отриманих у дифузійних камерах даних показав, що у перші кілька діб після опромінення у порівнянні з контролем (38,5 колоній на  $1 \times 10^5$  експлантованих клітин) спостерігається знижена кількість КУО, і це триває до 9-ї доби. Далі відбувається різке зростання кількості КУО у культурі дифузійних камер *in vivo*. При порівнянні кількості КУОдк у розрахунку на стегову кістку на 7-му та 11-ту добу після опромінення, виявляється різниця у показниках, яка сягає 8 разів. Водночас кількість КУО у дифузійних камерах на 19-ту добу після опромінення більша у порівнянні з 11-ю добою приблизно у 4 рази, а у порівнянні з 7-ю добою – у 30 разів (табл. 1).

За даними К. С. Черткова кількість КУО у селезінці різко зростає, починаючи з 7-ї доби після опромінення. Ефективність колонієутворення на 11-ту добу більша у приблизно 9 разів порівняно з показниками 7-ї доби. Дані, отримані на 19-ту добу відновлення гемопоєзу, свідчили, що колонієутворення у селезінці збільшилось порівняно з 11-ю добою майже у 4 рази, а у порівнянні з 7-ю добою – у 33 рази.

the same irradiation conditions, using another method of assessing the processes of hematopoiesis recovery under ionizing radiation disturbing influence – namely, cell culture in gel diffusion chambers, immersed in the abdominal cavity of laboratory animals.

Based on the fact that hematopoietic progenitor cells belong to the stem cell compartment, and among them progenitors grown in diffusion chambers (CFU-d) possess the closest place to stem cell in the hierarchy, we have cultivated hematopoietic cells in chambers, recalculating the obtained values per mice femur as the authors of the article did [1]. According to the conditions described in the article by K. S. Chertkov, the colony-forming efficiency of hematopoietic progenitor cells from the bone marrow of the mice prolongedly irradiated with a total dose of 8 Gy was determined in gel diffusion chambers implanted in recipient CBA mice. Material obtained at different periods after irradiation, immersed in semi-solid agar in gel diffusion chambers, which were placed in the abdominal cavity of mice. On the 7<sup>th</sup> day, 3 mice were removed from the experiment and the chambers were studied under the inverted microscope; the number of colonies was counted per  $1 \times 10^5$  explanted cells, and their number was recalculated per femur, taking into account that the normal number of CFU in mice femur is between 5382 and 5850 [1].

Analysis of the data obtained in diffusion chambers showed that in the first few days after irradiation, a reduced number of CFU was observed compared to the control (38.5 colonies per  $1 \times 10^5$  explanted cells), and this continues until the 9th day. Further there is a sharp increase in CFU number in the culture of diffusion chambers *in vivo*. When comparing the number of CFU-d per femur on the 7<sup>th</sup> and 11<sup>th</sup> day after the irradiation, a difference in indices is revealed, which reaches 8 times. At the same time, the CFU number in the diffusion chambers on the 19th day after irradiation is approximately 4 times higher than on the 11th day, and 30 times higher than on the 7<sup>th</sup> day (Table 1).

According to the data of K. S. Chertkov, the number of CFU in the spleen increases sharply starting from the 7<sup>th</sup> day after irradiation. The colony-forming efficiency on the 11<sup>th</sup> day is approximately 9 times higher compared to the indices of the 7<sup>th</sup> day. Data obtained on the 19<sup>th</sup> day of hematopoiesis recovery showed that colony forming in the spleen increased almost 4 times compared to the 11<sup>th</sup> day, and 33 times compared to the 7<sup>th</sup> day.



**Таблиця 1**

**Кінетика колонієутворення клітин-попередників кісткового мозку мишей після пролонгованого опромінення в сумарній дозі 8 Гр**

**Table 1**

**Kinetics of colony forming of mice bone marrow progenitor cells after prolonged irradiation at a total dose of 8 Gy**

Доба після опромінення	Кількість КУОдк у розрахунку на стегнову кістку	Кількість КУОс у розрахунку на стегнову кістку	Відносна чисельність КУО кісткового мозку у розрахунку на стегнову кістку Р. В. Бойко [2]
Day after irradiation	The number of CFU-d per femur	довірчий інтервал К. С. Чертков [1] The number of CFU-S per femur and confidence interval K. S. Chertkov [1]	The relative number of bone marrow CFU per femur R. V. Boiko [2]
2	1,5±0,2	5,2	0,001
3	4,3±0,4	20,1	0,004
4	6,5±0,5	30,9	0,006
<b>7</b>	<b>30,0±1,8</b>	<b>144,5</b>	<b>0,026</b>
9	53,3±2,8	267,0	0,048
<b>11</b>	<b>240,0±6,5</b>	<b>1254,0</b>	<b>0,223</b>
13	380,3±15,2	1889,0	0,336
16	400,0±21,4	2134,0	0,380
<b>19</b>	<b>910,5±20,5</b>	<b>4774,0</b>	<b>0,850</b>
23	920,6±21,8	4749,0	0,846
30	1055,0±25,5	5507,0	0,981

Аналізуючи кінетику відповіді гемопоетичних клітин на хронічне опромінення з низькою потужністю дози, W. Chu-Tse зі співавт. [12] дійшли висновку, що затримка вступу до клітинного циклу клітин у разі дії такого опромінення вказує на те, що знаходження їх у фазі G<sub>0</sub> може бути відповідальним за початкову фазу кривої доза-ефект, мабуть, незалежну від потужності дози іонізуючого опромінення. Тоді другий компонент кривої є результатом зниженої потреби у диференціюванні стовбурових клітин через підвищену ампліфікацію клітин-попередників, які здійснюють транзит комітованих клітин, що й враховує математична модель Р. В. Бойка та співавт. [2, 8].

Незважаючи на різницю в абсолютних показниках колонієутворення у селезінці й у дифузійних камерах (у селезінці кількість КУО більша приблизно у 5 разів), тенденції на етапах відновлення гемопоезу виявилися співставними. Вища ефективність колонієутворення у селезінці може пояснюватися тим, що це відкрита система, до якої при збуджуючому впливі іонізуючої радіації можуть мігрувати стовбурові клітин з інших джерел; однак система дифузійних камер закрита і в них розвиваються тільки клітини, які внесені у їхню внутрішню порожнину. Виявилось, що для аналізу кінетики відновлення кровотворення немає необхідності експериментально визначати ефективність колонієутворення у дифузійних камерах кожену добу, а можна скористатися математичними формулами, які були побудовані з урахуванням закономірнос-

Analyzing the kinetics of hematopoietic cells response to chronic irradiation with low dose rate, W. Chu-Tse et al. came to the conclusion that delay in cell entry into the cell cycle in case of such exposure indicates that their residing in the G<sub>0</sub> phase may be responsible for the initial phase of the dose-effect curve, apparently independent of the dose rate of ionizing radiation. Then the second component of the curve is the result of a reduced demand for differentiation of stem cells due to increased amplification of progenitor cells which carry out the transit of committed cells, which is taken into account by the mathematical model of R. V. Boiko et al. [2, 8].

Despite the difference in the absolute indices of colony forming in spleen and in diffusion chambers (in spleen, the CFU number is approximately 5 times higher), the trends in the stages of hematopoiesis recovery were comparable. Higher colony-forming efficiency in the spleen can be explained by the fact that it is an open system, to which stem cells can migrate from other sources under the disturbing influence of ionizing radiation; however, the system of diffusion chambers is closed and only the cells placed into their internal cavity develop in them. It turned out that for the analysis of the kinetics of hematopoiesis recovery it is not necessary to experimentally determine the colony forming efficiency in diffusion chambers every day, but it is possible to use mathematical formulas which were developed taking into account the regularities of this process. So, for example, the number of CFU-d for the 3<sup>rd</sup>–7<sup>th</sup> or

тей цього процесу. Так, наприклад, кількість КУОдк на 3–7-му чи 13–16-ту добу можна підрахувати за параметрами математичної моделі, не вдаючись до експерименту, в той же час приділити увагу основним датам, враховуючи двофазність процесу відновлення кровотворення (табл. 1).

У результаті нами отримані дані, які не тільки підтверджують правильність висновків дослідників, що на сьогодні вважаються класичними, але й свідчать про адекватність математичної моделі, а також доцільність використання оригінальних дифузійних камер для вивчення процесів ушкодження і відновлення гемопоєзу у відповідь на збурюючий вплив пролонгованого іонізуючого опромінення.

Враховуючи той факт, що параметри математичної моделі побудовані на даних селезінкового колонієутворення, виявлена тенденція свідчить про відповідність між результатами, отриманими різними методами. У зв'язку з цим можна прийти до висновку про доцільність використання математичної моделі для гемопоетичних клітин-попередників різних рівнів дозрівання, а експериментальний підхід вирощування КУО в гелевих дифузійних камерах може використовуватися як спосіб оцінки відновлення гемопоєзу нарівні з методом селезінкових колоній, тобто математична модель адекватна для аналізу не тільки кінетики КУОс, але й кінетики КУОдк.

Показники ефективності колонієутворення, отримані у культурі гелевих дифузійних камер, свідчили про те, що пролонговане опромінення у сумарній дозі 8 Гр з потужністю 0,0028 Гр/хв не викликає пошкодження гемопоетичних стовбурових клітин, які в момент опромінення знаходилися у фазі  $G_0$ . Їхня кількість після суттєвої затримки проліферації протягом кількох днів поступово відновлюється за рахунок гемопоетичних клітин-попередників і до 30-ї доби компенсує втрачений проліферативний потенціал. Саме пролонговане іонізуюче опромінення в низьких дозах забезпечило гемопоетичну систему часом для відновлення її функцій. Прослідковується двофазний характер відновлення кровотворення в разі дії такого типу іонізуючого опромінення, на який вказують ряд авторів [1, 12]. Дослідники, які аналізували показники колонієутворення кісткового мозку опромінених мишей, дійшли до висновку, що виграш у часі відіграє основну роль під час відновлення гемопоєзу в разі пролонгованого опромінення з низькою потужністю дози. Цей факт був доведений ними півстоліття тому на моделі J. E. Till, E. A. McCulloch [12, 14]. Як вказали автори, головна особливість, характерна для пролонго-

13<sup>th</sup>–16<sup>th</sup> day can be calculated according to the parameters of the mathematical model, without applying the experiment, while at the same time paying attention to the main dates, taking into account the two-phase process of hematopoiesis recovery (Table 1).

As a result, we have obtained data which not only confirm the accuracy of the researchers' conclusions, which today are considered classic, but also testify to the adequacy of the mathematical model, as well as the expediency of original diffusion chambers usage to study the processes of hematopoiesis damage and recovery in response to the disturbing effect of prolonged ionizing radiation.

Taking into account the fact that parameters of the mathematical model are developed on the data of colony forming in spleen, the revealed trend indicates the correspondence between the results obtained by different methods. In this regard one can come to the conclusion about the expediency of using the mathematical model for hematopoietic progenitor cells of different maturation levels, and the experimental approach of growing CFU in gel diffusion chambers can be used as the assessing method for hematopoiesis recovery along with the method of splenic colonies, i.e., the mathematical model is adequate for analyzing not only the kinetics of CFU-S, but also the kinetics of CFU-d.

Indices of colony-forming efficiency obtained in the culture of gel diffusion chambers have shown that prolonged irradiation at a total dose of 8 Gy with a power of 0.0028 Gy/min does not cause the damage of hematopoietic stem cells, which were in the  $G_0$  phase at the time of irradiation. Their number after the significant delay in proliferation for several days is gradually recovered at the expense of hematopoietic progenitor cells and compensates for the lost proliferative potential by the 30<sup>th</sup> day. It was the prolonged ionizing radiation in low doses that provided the hematopoietic system with the time to restore its functions. The biphasic nature of hematopoiesis recovery is observed in case of this type of ionizing radiation action, which is indicated by several authors [1, 12]. Researchers who analyzed colony-forming indices of the bone marrow of irradiated mice concluded that time gain plays a major role in the hematopoiesis recovery in the case of prolonged irradiation with a low dose rate. This fact was proved by them half a century ago on the model of J. E. Till, E. A. McCulloch [12, 14]. As the authors pointed out, the main fea-

ваного впливу іонізуючої радіації, полягає в тому, що у разі незначної потужності дози (нижче 0,01 Гр/хв.), частина клітин не втрачає здатності до проліферації. Виявилось, що кількість стовбурових клітин, яка при цьому залишилася недоторканою, є достатньою для відновлення кровотворення [20].

Експериментальний підхід вирощування КУО в оригінальних гелевих дифузійних камерах може розглядатися як додатковий спосіб дослідження відновлення гемопоєзу нарівні з методом селезінкових колоній.

## ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень нами було отримано дані, які свідчать про можливість використання оригінальних дифузійних камер для вивчення процесів ушкодження і відновлення гемопоєзу внаслідок дії іонізуючої радіації. Відповідність показників культивування методом гелевих дифузійних камер кісткового мозку мишей, опромінених пролонговано у сумарній дозі 8 Гр із потужністю 0,0028 Гр/хв., результатам колонієутворення у селезінці летально опромінених мишей, що були покладені у основу побудови математичної моделі, свідчить про адекватність та доцільність використання математичної моделі для оцінки процесу відновлення гемопоєзу клітинами-попередниками різних рівнів дозрівання. У кількісному значенні ефективність колонієутворення цих клітин-попередників неоднакова, але зіставна. Їх визначення необхідне для характеристики функціональної активності кісткового мозку, який потребує оцінки, наприклад, в разі опромінення чи як потенційний трансплантат.

Використання запропонованих експериментальної і математичної моделей сприятиме глибшому розумінню процесів проліферації та диференціювання у кровотворній тканині, а також програм, що забезпечують збалансовану проліферацію і диференціювання кровотворних клітин у стабільному стані та під час регенерації після впливу іонізуючої радіації.

## Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Чертков К. С. Влияние мощности дозы облучения на процессы поражения и восстановления колониеобразующих клеток костного мозга. *Радиобиология*. 1973. Т. 13, вып. 3. С. 368–372.

ture characteristic for prolonged influence of ionizing radiation is that in the case of a small dose rate (below 0.01 Gy/min.), some cells do not lose their ability to proliferate. It turned out that the amount of stem cells, which remained intact, is sufficient for hematopoiesis recovery [20].

The experimental approach of CFU growing in the original gel diffusion chambers can be considered as an additional method of investigation of hematopoiesis recovery along with the method of spleen colonies.

## CONCLUSIONS

As a result of the performed investigations we obtained the data which testify to the possibility of using original diffusion chambers to study the processes of hematopoiesis damage and recovery due to the action of ionizing radiation. Correspondence of the cultivation indices using the method of gel diffusion chambers of mice bone marrow prolongedly irradiated with a total dose of 8 Gy with a power of 0.0028 Gy/min, to the results of colony forming in the spleen of lethally irradiated mice, which were the basis for developing the mathematical model, testifies to the adequacy and feasibility of applying the mathematical model to assess the process of hematopoiesis recovery by progenitor cells of different maturation levels. In quantitative value the colony forming efficiency of these progenitor cells is not the same, but it is comparable. Their definition is necessary to characterize the functional activity of bone marrow, which needs to be evaluated, for example, in case of irradiation or as a potential transplant.

The usage of proposed experimental and mathematical models will contribute to a deeper understanding of the processes of proliferation and differentiation in hematopoietic tissue, as well as programs which ensure balanced proliferation and differentiation of hematopoietic cells in a steady state and during regeneration after exposure to ionizing radiation.

## Conflicts of interest statement

Authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Chertkov KS. [The influence of radiation intensity dose on the processes of damage and recovery of bone marrow colony-forming cells]. *Radiobiologiya*. 1973;13(3):368-372. Russian.

2. Порівняльний математичний аналіз колонієутворюючої здатності кісткового мозку мишей, опромінених з однаковою потужністю у летальній і нелетальній дозах / Р. В. Бойко, Д. І. Білько, І. З. Руссу, Н. М. Білько. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. 2020. Т. 25. С. 300–308. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-300-308
3. 3D scaffolds to model the hematopoietic stem cell niche: applications and perspectives / A. Congrains, J. Bianco, R. Rosa et al. *Materials (Basel)*. 2021. Vol. 14, no. 3. P. 569–585. doi: 10.3390/ma14030569.
4. Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я. Клеточные основы кроветворения. М. : Медицина, 1977. 274 с.
5. Kay H. E. How many cell generations? *Lancet*. 1965. Vol. 2. P. 418–419. doi: 10.1016/s0140-6736(65)90763-4.
6. Origin of hematopoietic progenitors during embryogenesis / M. Ogawa, S. Fraser, T. Fujimoto et al. *International Reviews of Immunology*. 2001. Vol. 20, no. 1. P. 21–44. doi: 10.3109/08830180109056721.
7. Metcalf D., Moore M. A. S. Haemopoietic cells. Amsterdam : North Holland Pub. Co, 1971. 530 p.
8. Порівняльний математичний аналіз колонієутворюючої здатності кісткового мозку мишей, опромінених у летальній дозі з високою і низькою потужностями / Р. В. Бойко, Д. І. Білько, І. З. Руссу, Н. М. Білько. *Ядерна фізика та енергетика*. 2018. Т. 19, № 3. С. 265–269. doi: 10.15407/jnpae2018.03.265.
9. Lord B., Testa N. The relative spatial distribution of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood*. 1975. Vol. 46, no. 1. P. 65–72.
10. 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.
11. Hematopoietic stem cell dynamics are regulated by progenitor demand: lessons from a quantitative modeling approach / M. Klose, M. C. Florian, A. Gerbaulet et al. *Stem Cells*. 2019. Vol. 37, no. 7. P. 948–957. doi: 10.1002/stem.3005.
12. Chu-Tse W., Lajtha L. G. Haemopoietic stem-cell kinetics during continuous irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1975. Vol. 27, no. 1. P. 41–50. doi: 10.1080/09553007514550041.
13. Kaitsuka T., Hakim F. Response of pluripotent stem cells to environmental stress and its application for directed differentiation. *Biology (Basel)*. 2021. Vol. 10, N 2. P. 84–134. doi: 10.3390/biology10020084.
14. Till J. E., McCulloch E. A., Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1964. Vol. 51, no. 1. P. 29–36. doi: 10.1073/pnas.51.1.29.
15. de Wynter E., Ploemacher R. E. Assays for the assessment of human hematopoietic stem cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2001. Vol. 15, no. 1. P. 23–27.
16. The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications / P. Zhang, C. Zhang, J. Li et al. *Stem Cell Res. Ther*. 2019. Vol. 10, no. 1. P. 327–340. doi: 10.1186/s13287-019-1422-7.
2. Boiko RV, Bilko DI, Russu IZ, Bilko NM. Comparative mathematical analysis of colony-forming ability of the bone marrow of mice lethally and non/lethally irradiated with equal dose rate intensity. *Problems of Radiation Medicine and Radiobiology*. 2020;25:300-308. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-300-308.
3. Congrains A, Bianco J, Rosa RG, Mancuso RI, Saad STO. 3D Scaffolds to Model the Hematopoietic Stem Cell Niche: Applications and Perspectives. *Materials (Basel)*. 2021 Jan 26;14(3):569. doi: 10.3390/ma14030569.
4. Chertkov JL, Fridenshtein AY. [Cell basis of hematopoiesis]. Moscow: Meditsyna; 1977. 274 p. Russian.
5. Kay HE. How many cell-generations? *Lancet*. 1965;2(7409):418-419. doi: 10.1016/s0140-6736(65)90763-4.
6. Ogawa M, Fraser S, Fujimoto T, Endoh M, Nishikawa S, Nishikawa SI. Origin of hematopoietic progenitors during embryogenesis. *Int Rev Immunol*. 2001;20(1):21-44. doi: 10.3109/08830180109056721.
7. Metcalf D, Moore MAS. Haemopoietic cells. Amsterdam: North Holland Pub.Co; 1971. 530 p.
8. Boiko RV, Bilko DI, Russu IZ, Bilko NM. [Comparative mathematical analysis of the colony-forming ability of bone marrow of mice irradiated in lethal dose with high and low dose rate]. *Nuclear Physics and Atomic Energy*. 2018;19(3):265-269. Ukrainian. doi: 10.15407/jnpae2018.03.265
9. Lord BI, Testa NG, Hendry JH. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood*. 1975;46(1):65-72.
10. Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(9):1447-62. doi: 10.1089/ars.2013.5635.
11. Klose M, Florian MC, Gerbaulet A, Geiger H, Glauche I. Hematopoietic stem cell dynamics are regulated by progenitor demand: Lessons from a quantitative modeling approach. *Stem Cells*. 2019; 37(7):948-957. doi: 10.1002/stem.3005.
12. Chu-Tse W, Lajtha LG. Haemopoietic stem-cell kinetics during continuous irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1975;27(1):41-50. doi: 10.1080/09553007514550041.
13. Kaitsuka T, Hakim F. Response of Pluripotent Stem Cells to Environmental Stress and Its Application for Directed Differentiation. *Biology (Basel)*. 2021;10(2):84. doi: 10.3390/biology10020084.
14. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1964;51(1):29-36. doi: 10.1073/pnas.51.1.29.
15. de Wynter E, Ploemacher RE. Assays for the assessment of human hematopoietic stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2001; 15(1):23-7.
16. Zhang P, Zhang C, Li J, Han J, Liu X, Yang H. The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):327. doi: 10.1186/s13287-019-1422-7.
17. Mahajan MM, Cheng B, Beyer AI, Mulvaney US, Wilkinson MB, Fomin ME, Muench MO. A quantitative assessment of the content

17. A quantitative assessment of the content of hematopoietic stem cells in mouse and human endosteal-bone marrow; a simple and rapid method for the isolation of mouse central bone marrow / M. Mahajan, B. Cheng, A. Beyer et al. *BMC Hematol.* 2015. Vol. 15. P. 9. doi: 10.1186/s12878-015-0031-7.
18. Roeder I., Kamminga L. M., Braesel K., Dontje B. et al. Competitive clonal hematopoiesis in mouse chimeras explained by a stochastic model of stem cell organization. *Blood.* 2005. Vol. 105, no. 2. P. 609–616. doi: 10.1182/blood-2004-01-0282.
19. Морфологічні характеристики гемопоетичних клітин-передників кісткового мозку у гуманізованій культуральній системі in vivo / Д. І. Білько, Ю. Б. Чайковський, І. З. Руссу та ін. *Фізіол. журн.* 2022. Т. 68, № 2. С. 14–22. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz68.02.014>
20. Effects of low-to-moderate doses of gamma radiation on mouse hematopoietic system / X. Li, W. Cui, L. Hull et al. *Radiat. Res.* 2018. Vol. 190(6). P. 612–622. doi: 10.1667/RR15087.1.
- of hematopoietic stem cells in mouse and human endosteal-bone marrow: a simple and rapid method for the isolation of mouse central bone marrow. *BMC Hematol.* 2015;15:9. doi: 10.1186/s12878-015-0031-7.
18. Roeder I, Kamminga LM, Braesel K, Dontje B, de Haan G, Loeffler M. Competitive clonal hematopoiesis in mouse chimeras explained by a stochastic model of stem cell organization. *Blood.* 2005;105(2):609-16. doi: 10.1182/blood-2004-01-0282.
19. Bilko DI, Tchaikovsky YB, Russu IZ, Pakharenko MV, Lahodniuk IY, Bilko NM. [Morphofunctional characteristics of hematopoietic bone marrow progenitor cells in a humanized cell culture system in vivo]. *Fiziologichnyi Zhurnal.* 2022;68(2):14-22. doi: <https://doi.org/10.15407/fz68.02.014>. Ukrainian.
20. Li X, Cui W, Hull L, Smith JT, Kiang JG, Xiao M. Effects of low-to-moderate doses of gamma radiation on mouse hematopoietic system. *Radiat Res.* 2018 Dec;190(6):612-622. doi: 10.1667/RR15087.1.

## ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

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

**Бойко Роман Володимирович** – доктор фізико-математичних наук, професор, професор кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія», м. Київ, Україна, ORCID: 0000-0001-6021-5642

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

**Дягіль Ірина Сергіївна** – доктор медичних наук, професор, завідувач відділення радіаційної онкогематології та трансплантації стовбурових клітин, Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», м. Київ, Україна, ORCID: 0000-0001-6643-4141

**Білько Надія Михайлівна** – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри лабораторної діагностики біологічних систем, керівник Центру молекулярних і клітинних досліджень, Національний університет «Києво-Могилянська академія», м. Київ, Україна, ORCID: 0000-0002-3213-0032

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

**Roman V. Boiko** – Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Professor, Professor of the Department of Laboratory Diagnostics of Biological Systems, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0001-6021-5642

**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: 0000-0001-9676-2859

**Iryna S. Dyagil** – Doctor of Medical Sciences, Senior Scientific Researcher, Head of Radiation Hematology and Stem Cell Transplantation Department, NRCRM, Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0001-6643-4141

**Nadiia M. Bilko** – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Laboratory Diagnostics of Biological Systems, Head of the Center for Molecular and Cellular Research, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0002-3213-0032

Стаття надійшла до редакції 19.08.2022

Received: 19.08.2022