DOI: 10.12737/article_5d11009f713799.54342353

А.А. Цишнатти[1,2], М.В. Пустовалова[1], А.К. Грехова[1], Ю.А. Бушманов[1], Т.А. Астрелина[1], И.В. Кобзева[1], В.А. Никитина[1], В.А. Брунчуков[1], Д.Ю. Усупжанова[1], И.М. Барабаш[1], Т.М. Блохина[1], Ю.А. Федотов[1], Н.Ю. Воробьева[1], А.С. Самойлов[1], А.Н. Осипов[1]

ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ В СВЕРХВЫСОКИХ ДОЗАХ НА КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ДВУНИТЕВЫЕ РАЗРЫВЫ ДНК И ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ

1. Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва. E-mail: nuv.rad@mail.ru;
2. Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

А.А. Цишнатти – техник; М.В. Пустовалова – н.с., к.б.н.; А.К. Грехова – м.н.с., к.б.н.; Ю.А. Бушманов – зам. зав. отделом; Т.А. Астрелина – рук. центра биомедицинских технологий, д.м.н.; И.В. Кобзева – зав. криобанка, к.м.н.; В.А. Никитина – в.н.с., к.м.н.; В.А. Брунчуков – м.н.с.; Д.Ю. Усупжанова – м.н.с.; И.М. Барабаш – зав. отделением; Т.М. Блохина – н.с.; Ю.А. Федотов – н.с.; Н.Ю. Воробьева – зав. лаб., к.б.н.; А.С. Самойлов – генеральный директор, д.м.н., проф. РАН; А.Н. Осипов – зав. отделом, д.б.н., проф. РАН

Реферат

Цель: Провести сравнительную оценку влияния облучения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека в сверхвысоких дозах при температуре жидкого азота (–196 °С) и комнатной температуре (22 °С) на выход остаточных двунитевых разрывов (ДР) ДНК и на пролиферативную активность размороженных МСК.

Материал и методы: Выделение и культивирование МСК человека проводили по стандартной методике. Для криоконсервации клеток использовали диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрации 10 %. Для облучения клеток тормозным фотонным излучением с номинальной энергией фотонов 5 МэВ использовали ускоритель УЭЛР-10-100-Т-100 (Россия). Клетки облучали в дозах 50 и 500 Гр при температуре +22 °С и –196 °С. Выход остаточных ДР ДНК оценивали с помощью иммуноцитохимического анализа фокусов белка-маркера ДР – γH2AX. Для оценки пролиферативной активности анализировали долю Ki67 (белок-маркер клеточной пролиферации) позитивных клеток.

Результаты: Результаты оценки фокусов γH2AX в МСК через 48 ч после облучения в дозе 50 Гр показали, что количество остаточных фокусов γH2AX в ядрах МСК, облученных при температуре +22 °С, примерно в 3,2 раза (p = 0,0002) выше, чем в ядрах МСК, облученных при температуре –196 °С. Анализ пролиферативной активности клеток с использованием молекулярного маркера клеточной пролиферации белка Ki67 показал, что клетки, облученные в дозе 50 Гр при температуре +22 °С, полностью теряют способность к пролиферации. Пролиферативная активность клеток, облученных в той же дозе, но при температуре –196 °С, существенно снижается, но часть клеток (3,5±1,1 %) все же сохраняет способность к пролиферации. После облучения в дозе 500 Гр при –196 °С клетки полностью теряют способность к пролиферации, но частично сохраняют способность к адгезии. Интегральная флуоресценция конъюгированных с флуорохромом антител к γH2AX ядер МСК человека, облученных в дозе 500 Гр при температуре –196 °С, в 1,8 раза ниже, чем у ядер, облученных при температуре +22 °С.

Заключение: Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что криоконсервированные МСК, облученные при температуре жидкого азота (–196 °С) в среде для консервации, содержащей 10 % ДМСО, могут переносить воздействие ИИ в больших дозах (до 50 Гр). Однако при этом наблюдается довольно высокий выход остаточных ДР ДНК и очень низкая пролиферативная активность, что делает их непригодными в клинической практике. Представляется перспективным использование количественного анализа фокусов γH2AX для оценки поврежденности генома и функционального состояния клеток, облученных при температуре жидкого азота.

Ключевые слова: *мезенхимальные стволовые клетки, криоконсервация, двунитевые разрывы ДНК, клеточная пролиферация, тормозное излучение, сверхвысокие дозы*

Поступила: 23.11.2018. Принята к публикации: 21.05.2019

Введение

Изучение эффектов воздействия ионизирующего излучения (ИИ) в криоконсервированных клетках, облученных при температуре жидкого азота (–196 °С), представляет интерес для понимания механизмов действия ИИ. При столь низкой температуре резко снижаются процессы диффузии молекул, что приводит к существенному увеличению времени жизни свободных радикалов [1, 2]. Свободные радикалы, образующиеся при радиолизе воды, оказываются пространственно «заперты» и не могут взаимодействовать с находящимися на расстоянии биологическими макромолекулами. Это дает уникальные возможности для детальных исследований механизмов прямого (поглощение энергии биологическими молекулами-мишенями) действия ИИ. С другой стороны, современные технологии криоконсервации позволяют хранить соматические и половые клетки в течение десятилетий. Футурологи обсуждают возможность хранения криоконсервированных клеток в течение сотен лет и даже тысячелетий для полетов к другим звездным системам. При этом возникают вопросы: какие максимальные дозы ИИ выдерживают криоконсервированные клетки, и к каким эффектам приводит

их облучение в больших дозах? Особый интерес для понимания механизмов повреждаемости криоконсервированных облученных клеток вызывают особенности образования критических радиационно-индуцированных повреждений ДНК – двунитевых разрывов (ДР). К сожалению, в открытой литературе отсутствуют данные как о количественном выходе ДР ДНК в клетках, облученных при температуре жидкого азота, так и об эффективности репарации этих повреждений после разморозки клеток.

Цель настоящей работы состояла в сравнительной оценке влияния облучения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека в сверхвысоких дозах при температуре жидкого азота (–196 °С) и комнатной температуре (+22 °С) на выход остаточных ДР ДНК и на пролиферативную активность размороженных МСК.

Выбор МСК в качестве объекта исследований был обусловлен их широким использованием для клеточной терапии [3, 4]. При этом используются как свежевыделенные, так и криоконсервированные клетки.

Материал и методы

Выделение и культивирование клеток

Забор слизистой ткани у пациента проводили после подписания информированного согласия в стоматологическом отделении (протокол этического комитета ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России № 6А/08.02.2018). Для получения первичной культуры МСК проводили выделение клеток ферментативным методом с помощью коллагеназы 1 типа по описанному раннее методу [5]. Культивирование МСК проводили в CO_2-инкубаторе при стандартных условиях (37 °С, 5 % CO_2). Клетки культивировали до 6-го пассажа. При достижении 75–80 %-ного монослоя, клеточную культуру снимали с пластика ферментативным путем с помощью трипсин-ЭДТА. Осадок ресуспендировали в фосфатном буфере (PBS, Life Technologies, Gibco®, США), после чего производили подсчет количества жизнеспособных клеток. Проводили оценку уровня экспрессии поверхностных клеточных маркеров МСК на проточном цитофлюориметре BD FACS Canto II (Becton Dickinson Bioscience, США). Окрашивание клеток проводили моноклональными антителами, конъюгированными с флюорохромами CD45-FITC, CD73-PE, CD90-PE, CD105-APC, CD34-FITC, HLA-DR (BD Biosciences и Becman Coulter, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Жизнеспособность оценивали с помощью красителя 7-ADD, проникающего через цитоплазматическую мембрану клетки и связывающегося с ДНК. Определяли количество CD45+ негативных 7-ADD позитивных клеток на проточном цитофлюориметре FACSCanto II (Becton Dickinson CA, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Клетки пассировали на покровных стеклах в чашках Петри (d = 35 мм, Corning®, США) в 500 мкл клеточной суспензии из расчета 5×10^3 кл/см^2. Для адгезии клеток на стеклах культуральную среду (1,5 мл) добавляли через 15 мин после пассирования. Инкубация перед экспериментами проводилась в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO_2) в течение 24 ч.

Для эксперимента пробирки с МСК делились на 2 группы:

1) криоконсервированные МСК – 5 пробирок по 1 млн клеток в каждой;
2) нативные МСК – 5 пробирок по 1 млн клеток в каждой.

Криоконсервация

Пять пробирок, содержащих МСК по 1 млн клеток в каждой, криоконсервировали с криопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО) в концентрации 10 % в криопробирках объемом по 2 мл согласно общепринятой технологии криоконсервации [6].

Подготовленные образцы МСК помещали в промаркированные транспортные контейнеры: 1-й контейнер при температуре +22 °С и 2-й контейнер с жидким азотом при температуре –196 °С и облучали в дозах 50 и 500 Гр.

Облучение клеток

Для облучения клеток при температуре +22 °С и –196 °С использовали ускоритель УЭЛР-10-100-Т-100 (Россия). Ускоритель построен на базе ИЛУ 14 (импульсный линейный ускоритель) с энергией электронов до 10 МэВ и мощностью пучка до 100 кВт. Система конвертации пучка способна создать мощное поле тормозного фотонного излучения с максимальной энергией фотонов до 5 МэВ.

Для дозиметрии использовали пленочный детектор СО ПД(Ф)Р-5/50 – стандартный образец для измерения поглощенной дозы фотонного и электронного излучений (сополимер с феназинованным красителем). Стандартный образец представляет собой полимерную пленку однократного использования, изготовленного по ТУ 2379-006-13271746-00 «Пленка, окрашенная радиационно-чувствительная, типа ПОР». Относительная погрешность определения поглощенной дозы с помощью СО ПД(Ф)Р-5/50 не превышала 12 % (p = 0,05).

Разморозка и пассирование клеток

После облучения криоконсервированные клетки быстро размораживали в водяной бане при температуре +37 °С, помещали в культуральную среду для культивирования и пассировали на покровных стеклах в чашках Петри, как описано выше.

Иммуноцитохимические исследования

Клетки на покровных стеклах фиксировали параформальдегидом (4 % в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4) в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего дважды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4). Пермеабилизировали 0,3 % тритон-X100 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 2 % бычьего сывороточного альбумина для блокирования неспецифического связывания. Слайды инкубировали с первичными антителами (кроличьи моноклональные антитела к белку γH2AX (клон EP854(2)Y, Merck-Millipore, США) в разведении 1/200 и мышиные моноклональные антитела к белку Ki67 (клон Ki-S5, Merck-Millipore, США) в разведении 1/400 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина, в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем слайды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с вторичными антителами IgG (H+L), конъюгированными с флуорохромами в виде антител козы к белкам мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США), в разведении 1/600 и антител козы к белкам кролика, конъюгированными с родамином (Merck-Millipore, США) в разведении 1/400 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина. Для окраски ДНК и предотвращения фотовыцветания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold (Life Technologies, США).

Визуализацию, документирование и обработку иммунноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенным видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия) с использованием наборов светофильтров UV-2E/C (возбуждение 340–380 нм, эмиссия 435–485 нм), B-2E/C (возбуждение 465–495 нм, эмиссия 515–555 нм) и Y-2E/C (возбуждение 540–580 нм и эмиссия 600–660 нм). Анализировали не менее 200 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов использовали программу DARFI [7].

Статистический анализ

Статистический и математический анализ полученных данных проводился с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft). Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов трех независимых экспериментов ± стандартная ошибка среднего. Для оценки значимости различий использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При анализе иммунофенотипа МСК с помощью проточной цитометрии во всех культурах клеток была выявлена высокая экспрессия маркеров МСК (CD73, CD90, CD105), маркеры гемопоэтического и лимфоцитарного происхождения отсутствовали (CD34, CD45, HLA-DR). Иммунофенотип соответствовал требованиям Международной организации клеточной терапии, предъявляемым к МСК человека [8]. При дальнейших пассажах клетки в течение нескольких часов прикреплялись к пластику и сохраняли высокую пролиферативную активность и жизнеспособность (98±1,2 % 7-ADD) на протяжении всего периода культивирования.

Воздействие ИИ на живые клетки приводит к образованию целого спектра разнообразных повреждений ДНК, включая повреждения азотистых оснований, внутри- и межмолекулярные сшивки, одно- и двунитевые разрывы сахаро-фосфатного остова [9–11]. Считается, что именно ДР ДНК являются наиболее критическими для дальнейшей судьбы клетки [12]. ДР ДНК, отрепарированные некорректно, приводят к гибели клеток, клеточному старению или онкотрансформации [13, 14]. При этом репарация до 70–80 % радиационно-индуцированных ДР ДНК происходит с помощью относительно быстрого (до 4–6 ч), но некорректного механизма негомологичного воссоединения концов с частым образованием микроделеций и хромосомных перестроек. Оставшаяся часть ДР репарируется во время медленной фазы (от 4 до 24 ч) с участием корректного механизма гомологичной рекомбинации [15, 16]. Но даже через 24–72 ч остается от 5 до 10 % неотрепарированных ДР ДНК. Считается, что такие остаточные повреждения являются сложными и потенциально летальными [17].

В настоящей работе был сделан акцент на оценку именно таких остаточных ДР ДНК. Через 48 ч после облучения проводили количественный анализ остаточных ДР ДНК с помощью маркера – фокусов фосфорилированного гистона γH2AX. Фосфорилирование H2AX осуществляется киназами ATM, ATR и DNA-PK в ответ на образование ДР, что свидетельствует о его распознавании [18].

На рис. 1 представлены результаты оценки фокусов γH2AX в МСК через 48 ч после облучения в дозе 50 Гр при температуре –196 °C и +22 °C. Было показано, что количество остаточных фокусов γH2AX в ядрах МСК, облученных при температуре +22 °C, примерно в 3,2 раза (p = 0,0002) выше, чем в ядрах МСК, облученных при температуре –196 °C. При этом количество остаточных фокусов γH2AX в ядрах МСК, облученных при температуре –196 °C, статистически

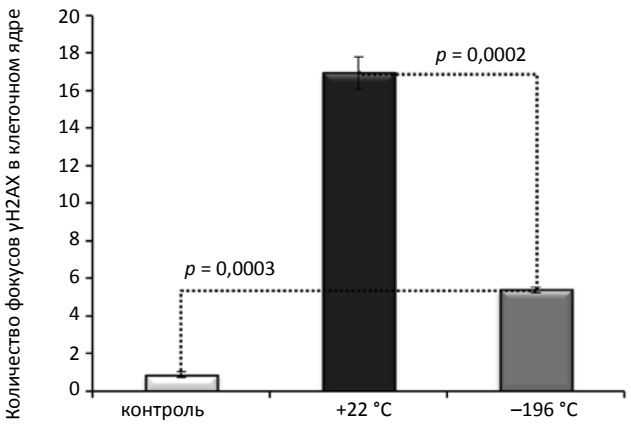

Рис. 1. Количество остаточных фокусов γH2AX в ядрах МСК человека через 48 ч после облучения в дозе 50 Гр при температурах +22 °C и –196 °C

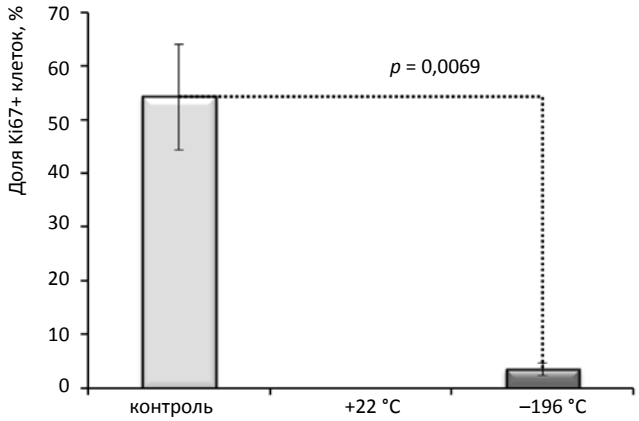

Рис. 2. Доля пролиферирующих (Ki67+) МСК человека через 48 ч после облучения в дозе 50 Гр при комнатной температуре (+22 °C) и температуре жидкого азота (–196 °C)

значимо выше контрольных значений (0,85±0,16 и 5,37±0,15 соответственно).

Анализ пролиферативной активности клеток с использованием молекулярного маркера клеточной пролиферации белка Ki67 показал, что клетки, облученные в дозе 50 Гр при температуре +22 °C, полностью теряют способность к пролиферации (рис. 2). Пролиферативная активность клеток, облученных в этой же дозе, но при температуре –196 °C, существенно снижается, но часть клеток (3,5±1,1 %) все же сохраняет способность к пролиферации. Обращает на себя внимание тот факт, что результаты оценки остаточных фокусов γH2AX полностью соотносятся с результатами оценки доли пролиферирующих клеток. Это свидетельствует о том, что остаточные фокусы γH2AX могут служить маркером клеточной сенесценции (потери способности клеток к делению).

Был проведен анализ остаточных фокусов γH2AX в ядрах криоконсервированных МСК через 48 ч после облучения в экстремальной дозе (500 Гр). На рис. 3 представлены микрофотографии иммуноцитохимически окрашенных ядер МСК после облучения в дозе 500 Гр при температурах +22 °C и –196 °C. Видно, что плотность посадки клеток, облученных при температуре +22 °C, очень низкая, а фокусы γH2AX сливаются, что делает невозможным подсчет их количества. В случае облучения при –196 °C клетки, хотя и полностью теряют способность к пролиферации, но сохраняют способность к адгезии, что отражается на плотности их посадки. Количество остаточных фокусов γH2AX велико, но они расположены отдельно, и практически не наблюдается их слияния, то есть их количество значительно меньше, чем в клетках, облученных при температуре +22 °C.

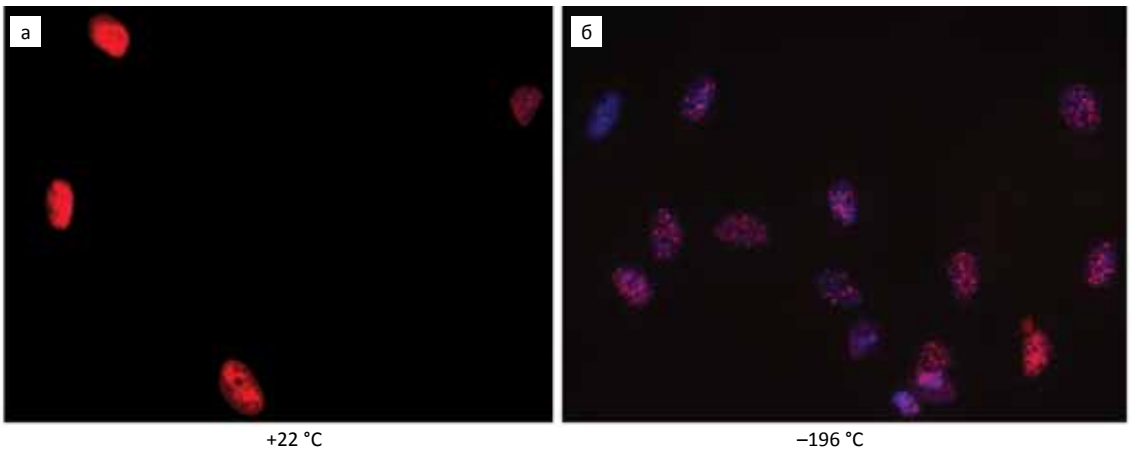

Рис. 3. Микрофотографии иммуноцитохимически окрашенных ядер МСК человека через 48 ч после облучения в дозе 500 Гр при комнатной температуре (+22 °C) и температуре жидкого азота (–196 °C). Синий – ДНК клеточного ядра, окрашенные DAPI. Красный – фокусы γH2AX

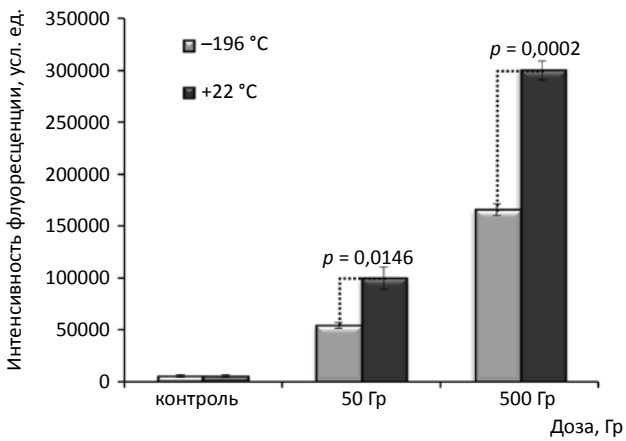

Рис. 4. Интегральная флуоресценция конъюгированных с флуорохромом антител к γH2AX в ядрах МСК человека через 48 ч после облучения в дозе 50 Гр при температуре +22 °C и –196 °C

Для количественной оценки γH2AX в клетках, облученных в дозе 500 Гр, была проведена оценка интегральной флуоресценции конъюгированных с флуорохромом антител к γH2AX в клеточном ядре. Этот подход позволяет оценивать ДР ДНК в случае их большого количества и слияния фокусов γH2AX. Дополнительно был произведен подсчет интегральной флуоресценции конъюгированных с флуорохромом антител к γH2AX в клетках, облученных в дозе 500 Гр. Результаты, представленные на рис. 4, свидетельствуют о том, что интегральная флуоресценция конъюгированных с флуорохромом антител к γH2AX ядер МСК, облученных при температуре –196 °C, в 1,8 раза ниже, чем у ядер, облученных при температуре +22 °C. Различия в коэффициентах, полученных при анализе количества фокусов γH2AX, и их интегральной флуоресценции, объясняются тем, что при оценке интегральной флуоресценции большого количества фокусов происходит недооценка их количества, вследствие наложения сигналов от близлежащих фокусов.

При интерпретации результатов важно понимать, что образование радиационно-индуцированных ДР ДНК происходит как при прямом поглощении энергии молекулой ДНК, так и в случае образования двух однонитевых разрывов на антипараллельных нитях. При этом, однонитевой разрыв может быть образован как при прямом поглощении энергии одной нитью ДНК, так и в результате «атак» сахарофосфатного остова гидроксил-радикалом. Последний механизм образования однонитевых разрывов является доминирующим. Облучение МСК происходило в среде для криоконсервации, содержащей 10 % диметилсульфоксида (ДМСО). ДМСО является одновременно как криопротектором [19], так и перехватчиком гидроксил-радикала [20]. Показано, что ДМСО снижает выход однонитевых разрывов ДНК примерно в 3 раза [21]. В нашем исследовании основные различия были в температуре, при которой облучались клетки. При –196 °C существенно снижается скорость радиационно-химических реакций, а основные процессы перехвата гидроксил-радикала ДМСО начинаются при разморозке клеток. По всей видимости, это сказывается на общем количестве образующихся в облученных клетках ДР ДНК.

Нами не изучалась гибель клеток, однако следует отметить, что в работе, выполненной еще в 1970-х гг. на фибробластах китайского хомячка, было показано, что гибель клеток, облученных рентгеновским излучением при –196 °C, примерно в 3,5 раза ниже, чем после облучения при комнатной температуре [2]. В обоих случаях клетки облучались в среде с 10 % ДМСО. При анализе остаточных фокусов γH2AX МСК человека при температурах –196 °C и +22 °C был получен сходный коэффициент 3,2. По всей видимости, различия в процессах образования ДР ДНК являются ключевыми для понимания особенностей формирования радиобиологических эффектов в криоконсервированных клетках.

Заключен

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что криоконсервированные МСК, облученные при температуре жидкого азота (–196 °C) в среде, содержащей 10 % ДМСО, могут переносить воздействие ИИ в больших дозах. Небольшая часть криоконсервированных МСК, облученных в дозе 50 Гр, даже сохраняет способность к пролиферации (3,5±1,1 %). В размороженных после облучения в дозе 50 Гр и культивированных в течение 48 ч клетках выход остаточных, предположительно летальных, ДР ДНК был примерно в 3,2 раза ниже, чем в клетках, облученных в той же дозе и среде для консервации, но при температуре +22 °C. Представляется перспективным использование количественного анализа фокусов γH2AX для оценки степени поврежденности генома и функционального состояния облученных криоконсервированных клеток.

Для цитирования: Цишнатти А.А., Пустовалова М.В., Грехова А.К., Бушманов Ю.А., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Никитина В.А., Брунчуков В.А., Усупжанова Д.Ю., И.М. Барабаш, Блохина Т.М., Федотов Ю.А., Воробьева Н.Ю., Самойлов А.С., Осипов А.Н. Влияние облучения в сверхвысоких дозах на криоконсервированные мезенхимальные стволовые клетки: двунитевые разрывы ДНК и пролиферативная активность // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 4. С. 18–24.

DOI: 10.12737/article_5d11009f713799.54342353

DOI: 10.12737/article_5d11009f713799.54342353

Influence of Ultra-High Dose Radiation on Cryopreserved Mesenchymal Stem Cells: DNA Double-Strand Breaks and Proliferative Activity

A.A. Tsishnatti[1,2], M.V. Pustovalova[1], A.K. Grekhova[1], Yu.A. Bushmanov[1], T.A. Astrelina[1], I.V. Kobzeva[1], V.A. Nikitina[1], V.A. Brunchukov[1], D.Yu. Usupzhanova[1], I.M. Barabash[1], T.M. Blokhina[1], Yu.A. Fedotov[1], N.Yu. Vorobyova[1], A.S. Samoylov[1], A.N. Osipov[1]

1. A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia. E-mail: nuv.rad@mail.ru;
2. National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia

A.A. Tsishnatti – Technician; M.V. Pustovalova – Researcher, PhD Biol.; A.K. Grekhova – Junior Researcher, PhD Biol.;
Yu.A. Bushmanov – Deputy Head of Dep.; T.A. Astrelina – Head of the Center for Biomedical Technologies, Dr. Sci. Med.;
I.V. Kobzeva – Head of the Center for Biomedical Technologies Cryobank, PhD Med.;
V.A. Nikitina – Leading Researcher, PhD Med., ISCT member; V.A. Brunchukov – Junior Researcher;
D.Yu. Usupzhanova – Junior Researcher; I.M. Barabash – Head of Dep.; T.M. Blokhina – Researcher;
Yu.A. Fedotov – Researcher; N.Yu. Vorobyova – Head of Lab., PhD Biol.;
A.S. Samoylov – Director General, Dr. Sci. Med., Prof. RAS; A.N. Osipov – Head of Dep., Dr. Sci. Biol., Prof. RAS

Abstract

Purpose: To conduct a comparative assessment of human mesenchymal stem cells (MSCs) exposed to ultrahigh doses of bremsstrahlung photon radiation at liquid nitrogen temperature (–196 °C) and room temperature (+22 °C) on the yield of residual DNA double-strand breaks (DSBs) and proliferative activity of thawed MSCs.

Material and methods: Isolation and cultivation of MSCs was carried out according to standard methods. Dimethyl sulfoxide (DMSO) at a final concentration of 10 % was used for cells cryopreservation. The cells were irradiated with bremsstrahlung photon radiation with photon nominal energy 5 MeV, using the UELR-10-100-T-100 accelerator (Russia). Cells were irradiated at the doses of 50 and 500 Gy at a temperature of +22 °C and –196 °C. The immunocytochemical analysis of γH2AX foci (marker of DNA DSBs) was used for the assessment of the yield of residual DNA DSBs. The number of Ki67-positive cells (protein marker of cell proliferation) was analyzed for assessment of the cell proliferative activity.

Results: The results showed that 48 hours after irradiation of MSCs at a dose of 50 Gy the number of residual γH2AX foci in the nuclei of MSCs irradiated at +22 °C was about 3.2 times ($p = 0.0002$) higher than in those irradiated at –196 °C. The analysis of the cell proliferative activity using Ki67 protein showed that cells irradiated at a dose of 50 Gy at a temperature of +22 °C completely lost their ability to proliferate. The proliferative activity of cells irradiated at the same dose, but at a temperature of –196 °C, was significantly reduced, but some of the cells (3.5 ± 1.1 %) still retained the ability to proliferate. After irradiation with a dose of 500 Gy at –196 °C, the cells completely lost their ability to proliferate, but partially retained the ability to adhere. The integral fluorescence of conjugated with the flurochrome γH2AX foci in MSCs irradiated at a dose of 500 Gy at a temperature of –196 °C was 1.8 times lower than that in MSCs irradiated at a temperature of +22 °C.

Conclusion: The results of the study indicate that MSCs cryopreserved in a medium containing 10 % DMSO irradiated at liquid nitrogen temperature (–196 °C) can tolerate the effects of exposure to high doses (up to 50 Gy) of ionizing radiation. However, there is a rather high yield of residual DNA DSBs and a very low proliferative activity, which makes cells unsuitable for use in clinical practice. It seems promising to use a quantitative analysis of γH2AX foci to assess genome damage and the functional state of cells irradiated in a cryopreserved state.

Key words: *mesenchymal stem cells, cryopreservation, DNA double-strand breaks, cell proliferation, bremstrahlung, ultrahigh doses*

Article received: 23.11.2018. Accepted for publication: 21.05.2019

REFERENCES

1. Pezeshk A. The effects of ionizing radiation on DNA: the role of thiols as radioprotectors. Life sciences. 2004 Mar 26;74(19):2423-9. PubMed PMID: 14998719.
2. Ashwood-Smith MJ, Friedmann GB. Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time, and x-irradiation on mammalian cells preserved at –196 degrees in dimethyl sulfoxide. Cryobiology. 1979 Apr;16(2):132-40. PubMed PMID: 573193.
3. Pustovalova M, Astrelina T, Grekhova A, Vorobyeva N, Tsvetkova A, Blokhina T, et al. Residual gammaH2AX foci induced by low dose x-ray radiation in bone marrow mesenchymal stem cells do not cause accelerated senescence in the progeny of irradiated cells. Aging. 2017 Nov 21;9(11):2397-410. PubMed PMID: 29165316. Pubmed Central PMCID: 5723693.
4. Pustovalova M, Grekhova A, Astrelina T, Nikitina V, Dobrovolskaya E, Suchkova Y, et al. Accumulation of spontaneous gammaH2AX foci in long-term cultured mesenchymal stromal cells. Aging. 2016 Dec 11; 8(12):3498-506. PubMed PMID: 27959319. Pubmed Central PMCID: 5270682.
5. Wang F, Yu M, Yan X, Wen Y, Zeng Q, Yue W, et al. Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach for bone tissue regeneration. Stem Cells and Development. 2011 Dec; 20(12):2093-102. PubMed PMID: 21361847.
6. Haack-Sorensen M, Kastrup J. Cryopreservation and revival of mesenchymal stromal cells. Meth. Mol. Biol. 2011;698:161-74. PubMed PMID: 21431518.
7. Ozerov IV. Mathematical modeling of the double-strand DNA breaks induction and repair processes in mammalian cells under the rarely ionizing radiation action with different dose rates: PhD thesis of physics. Moscow. SRC – FMBC. 2015. (Russian).
8. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cel-

lular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7. PubMed PMID: 16923606.
9. Kotenko KV, Bushmanov AY, Ozerov IV, Guryev DV, Anchishkina NA, Smetanina NM, et al. Changes in the number of double-strand DNA breaks in Chinese hamster V79 cells exposed to gamma-radiation with different dose rates. Int J Mol Sci. 2013. Jul 01; 14 (7):13719-26. PubMed PMID: 23880845. Pubmed Central PMCID: 3742213.
10. Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. Molecular Cell. 2007. Dec 14; 28 (5):739-45. PubMed PMID: 18082599. Epub 2007/12/18. eng.
11. Osipov AN, Lizunova EY, Gur'ev DV, Vorob'eva NY. Genome damage and reactive oxygen species production in the progenies of irradiated CHO-K1 cells. Biophysics. 2011; 56 (5):931-5.
12. Wang W, Li C, Qiu R, Chen Y, Wu Z, Zhang H, et al. Modelling of Cellular Survival Following Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks. Sci Rep. 2018 Nov 1;8(1):16202. PubMed PMID: 30385845. Pubmed Central PMCID: 6212584.
13. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. Trends Cell Biol. 2016 Jan; 26(1):52-64. PubMed PMID: 26437586. Pubmed Central PMCID: 4862604.
14. Mladenov E, Magin S, Soni A, Iliakis G. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. Semin Cancer Biol. 2016 Jun; 37-38:51-64. PubMed PMID: 27016036.
15. Shibata A. Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks. Mutation Res. 2017 Oct; 803-805:51-5. PubMed PMID: 28781144.
16. Shibata A, Jeggo PA. DNA double-strand break repair in a cellular context. Clin Oncol. 2014 May; 26(5):243-9. PubMed PMID: 24630811.
17. Banath JP, Klokov D, MacPhail SH, Banuelos CA, Olive PL. Residual gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. BMC Cancer. 2010 Jan 5; 10: 4. PubMed PMID: 20051134. Pubmed Central PMCID: 2819996.
18. Osipov AN, Grekhova A, Pustovalova M, Ozerov IV, Eremin P, Vorobyeva N, et al. Activation of homologous recombination DNA repair in human skin fibroblasts continuously exposed to X-ray radiation. Oncotarget. 2015 Sep 29; 6 (29):26876-85. PubMed PMID: 26337087. Pubmed Central PMCID: 4694959.
19. Lucas CC, Melo LR, de Sousa M, de Morais GB, Martins MF, Xavier FAF, et al. Cryoprotectant agents and cooling effect on embryos of Macrobrachium amazonicum. Zygote. 2018 Apr; 26(2):111-8. PubMed PMID: 29655380.
20. Smetanina NM, Pustovalova MV, Osipov AN. Effect of dimethyl sulfoxide on the extent of DNA single-strand breaks and alkali-labile sites induced by 365 nm UV-radiation in human blood lymphocyte nucleoids. Radiation Biology. Radioecology. 2014 Mar-Apr; 54(2):169-73. PubMed PMID: 25764818. (Russian).
21. Osipov AN, Smetanina NM, Pustovalova MV, Arkhangelskaya E, Klokov D. The formation of DNA single-strand breaks and alkali-labile sites in human blood lymphocytes exposed to 365-nm UVA radiation. Free Radical Biology & Medicine. 2014 Aug; 73:34-40. PubMed PMID: 24816295.

For citation: Tsishnatti AA, Pustovalova MV, Grekhova AK, Bushmanov YuA, Astrelina TA, Kobzeva IV, Nikitina VA, Brunchukov VA, Usupzhanova DYu, Barabash IM, Blokhina TM, Fedotov YuA, Vorobyova NYu, Samoylov AS, Osipov AN. Influence of Ultra-High Dose Radiation on Cryopreserved Mesenchymal Stem Cells: DNA Double-Strand Breaks and Proliferative Activity. Medical Radiology and Radiation Safety. 2019;64(4):18-24. (Russian).

DOI: 10.12737/article_5d11009f713799.54342353