ЦИТОЛОГИЯ, 2023, том 65, № 4, с. 354–366

УДК 576.5:575.176

РЕАКЦИЯ ГЕНОМА ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПРОЦЕДУРУ ДЛИТЕЛЬНОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

© 2023 г. Т. М. Гринчук[1], М. А. Шорохова[1,] *, Н. А. Пуговкина[1]

[1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

**E-mail: shili-mariya@yandex.ru*

Поступила в редакцию 07.03.2023 г.
После доработки 28.03.2023 г.
Принята к публикации 13.04.2023 г.

Сведения о влиянии криоконсервации на клеточные функции и генетический аппарат клеток разного генеза неоднозначны и находятся в стадии накопления. Настоящая работа направлена на изучение влияния длительного пребывания (7 лет) в замороженном состоянии эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека (эМСК) на стабильность их генома *in vitro*. Результаты показали дестабилизацию структуры кариотипа у потомков клеток после их размораживания, а именно анеуполиплоидизацию хромосомного набора, повышенную ломкость хромосом, влекущую за собой огромный пул аберрантных хромосом, и нарушение конденсации в гомологах. Хромосомные поломки, затрагивающие прицентромерные области, в ряде случаев сопровождались сохранением генетического материала в виде самостоятельных хромосом. В процесс дестабилизации клеточного генома эМСК были вовлечены почти все хромосомы набора. Показано, что процедура многолетней криоконсервации может стать индуктором преждевременного клеточного старения эМСК после их размораживания. Сравнение полученных данных с результатами кариотипирования трансформированных клеток китайского хомячка, претерпевших аналогичную процедуру, позволило заключить, что криоконсервация для биологических систем может являться стрессом, индуцирующим разнотипные генетические дефекты на уровне кариотипа. Реакция генома клеток различного происхождения на одни и те же условия криоконсервации может различаться.

Ключевые слова: эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека, кариотип, хромосомы, криоконсервация, нестабильность генома

DOI: 10.31857/S0041377123040065, **EDN:** ZGVVAN

Использование различного по происхождению биологического материала в научных и прикладных целях требует сохранения физиологических и генетических свойств клеток. В настоящее время в качестве широко используемых в этих целях методов рассматривается процедура криоконсервации, в основе которой лежит замораживание живых биологических объектов в жидком азоте при температуре −196°С. Постоянное совершенствование протокола криоконсервации в настоящее время позволяет сохранять биологические объекты в течение многих лет. Однако как реагирует геном разных по чувствительности клеток на погружение в глубокий холод, на используемые реагенты, на длительность криоконсервации и другие факторы далеко не ясно. Сведения о возможном влиянии криопроцедуры на клеточные функции и геном неоднозначны и находятся в стадии накопления. Одни авторы указывают на то, что замораживание, в частности краткосрочное (от нескольких суток до нескольких недель), не влияет на фенотипическую и генотипическую стабильность клеток (de-Lima et al., 2012; Polchow et al., 2012; Астрелина и др., 2013; Imaizumi et al., 2014). Согласно другим работам, в клеточном геноме в связи с замораживанием могут возникать изменения, затрагивающие как важнейшие клеточные элементы, так и генетический аппарат, влияя на выживание клеток, их пролиферацию и дифференцировку (Семенова, 1988; Полянская и др., 1990; Duarte et al., 2012). Таким образом, вопрос о влиянии криоконсервации на физиологическую и генетическую стабильность клеток остается открытым.

Известно, что в основе сохранения генетической информации в неизменном виде в клетках-потомках лежит точность осуществления митотического деления родительской клеткой. Нарушения в программе клеточного деления ведут к генетическим дефектам. Основные типы кариотипической нестабильности, опосредованные сбоем в программе клеточного де-

Принятые сокращения: эМСК – эндометриальные мезенхимные стволовые клетки; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; SA-β-Gal – β-галактозидаза, ассоциированная со старением.

ления, связаны как с изменением числа хромосом в клетках, так и с изменением их структуры и функциональной активности (Diaferia et al., 2008; Tan et al., 2019). Возникновение геномной нестабильности, меняющей архитектонику генома и функции отдельных генов, может инициировать клеточную иммортализацию и трансформацию (Heng et al., 2005; Tang et al., 2012; Heng et al., 2013; Passerini et al., 2016).

Актуальность проблемы влияния процедуры криоконсервации биологических систем на генетический аппарат с каждым годом все более очевидна, однако данные по системному кариотипическому анализу клеточных линий различного генетического статуса и после криоконсервации, в литературе практически отсутствуют. В связи с интересом к данной проблеме ранее нами была охарактеризована стабильность культуры трансформированных фибробластов легкого китайского хомячка (линия V-79 RJK), претерпевших криоконсервацию (−196°C) (Гринчук, Шилина, 2021).

В процессе этой работы было установлено, что при длительном пребывании клеток линии V-79 RJK в жидком азоте (10 лет), в отличие от краткосрочных заморозок (3 или 6 мес.), клетки характеризовались дестабилизацией клеточного генома (Гринчук, Шилина, 2021). Выявленные изменения были связаны, как с усилением вариабельности числа хромосом в клетках, в результате нарушения копийности тех или иных хромосом набора, так и с появлением структурно перестроенных хромосом, возникающих в результате поломок хромосомного материала. Как правило, образование структурных перестроек носило случайный характер. На этом фоне одна из хромосом набора (хромосома Z3) была подвержена разнотипным поломкам. Повторившаяся неоднократно (в 30% кариотипированных клеток) ломкость этой хромосомы позволила рассматривать ее как неслучайную, хотя локусы, в которых выявлялись поломки, были разными. Был сделан вывод, что данная хромосома имеет предрасположенность к поломкам в условиях многолетней криоконсервации (Гринчук, Шилина, 2021).

В связи с перспективами клинического применения мезенхимных стволовых клеток человека (МСК) особую актуальность приобретает вопрос о влияния криоконсервации на кариотип этих клеток. На данном этапе существует ряд работ по изучению влияния криоконсервации на МСК различного происхождения. Так, в работе Астрелиной с коллегами (2013) при изучении качества и безопасности криоконсервированных МСК плаценты, подготовленных для клинического применения, показано, что аллогенные МСК плаценты после криоконсервации безопасны для клинического применения и имеют высокий индекс пролиферации, позволяющий получить необходимое количество клеток для достижения максимального терапевтического эффекта (Астрелина и др., 2013). С другой стороны, исследования доктора Антеби на МСК костного мозга (Antebi et al., 2019) показали, что криоконсервация оказывает пагубное влияние на различные клеточные характеристики и функции. А именно, в клетках после криоконсервации было обнаружено снижение поверхностных маркеров CD44 и CD105, в клеточной популяции наблюдали увеличение апоптоза с одновременным снижением уровня клеточной пролиферации, клоногенной способности и экспрессии ключевых регенеративных генов. При этом особенно важное значение имели первые 24 ч после возврата размороженных клеток к нормальным условиям культивирования. Этот период нивелировал негативные последствия криоконсервации и позволял клеткам восстановить их функциональную активность (Antebi et al., 2019). В этой связи стоит отметить работу, в которой был проведен аналитический обзор 41 исследования, выполненных на МСК костного мозга (Bahsoun et al., 2019). Было сделано заключение, что криоконсервация не влияет на морфологию МСК, экспрессию поверхностных маркеров, дифференцировочный потенциал и пролиферацию. Однако влияние криоконсервации на способность к образованию колоний, жизнеспособность, адгезию, миграцию, стабильность генома и паракринную функцию неоднозначны, и очень варьируют в различных исследованиях (Bahsoun et al., 2019). Таким образом, вопрос о влиянии криконсервации на МСК остается открытым и требует дополнительного исследования, особенно с точки зрения генетической стабильности клеток.

Цель настоящей работы заключалась в цитогенетическом анализе мезенхимных стволовых клеток человека в культуре после их многолетнего пребывания в жидком азоте при температуре −196°C. В качестве объекта исследования была использована клеточная линия эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека (эМСК), полученная из десквамированного эндометрия менструальной крови. Стоит отметить, что полученные данные, в сравнении с результатами кариотипирования трансформированных клеток китайского хомячка, претерпевших аналогичную процедуру, полученными нами ранее, (Гринчук, Шилина, 2021) расширит представление о влиянии длительной криоконсервации на геном клеток различного происхождения и статуса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточная линия и культивирование. В работе использованы эМСК человека линии 2304 из десквамированного эндометрия менструальной крови, полученной и охарактеризованной ранее в ИНЦ РАН (Санкт-Петербург; Земелько и др. 2011). Клетки данной линии в процессе культивирования характеризовались относительной кариотипической стабильностью. Клетки культивировали во флаконах Карреля площадью 25 см^2 (Corning, США), в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной бы-

чьей сыворотки (HyClone, США), 1% пенициллина-стрептомицина и 1% GlutaMAX (Gibco, США) в стандартных условиях (при 5% CO_2 и 37°C), пересевали 2 раза в неделю в соотношении 1 : 3–1 : 4, используя 0.05%-ный раствор трипсина–ЭДТА (Invitrogen, США).

Криоконсервация. Клетки открепляли от поверхности пластика 0.05%-ным раствором трипсина–EDTA (Gibco, США), помещали в пробирку, добавляли культуральную среду и центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспензировали в растворе 90%-ной бычьей сыворотки (HyClone, США), содержащей 10% DMSO (Sigma, США). Ресуспензированные клетки переносили в криовиалы (Nunc, США) и замораживали со скоростью 1°C/мин с последующим хранением в жидком азоте при −196°C. При размораживании ампулу с клетками быстро нагревали в водяной бане при 37°C. Клетки переносили в центрифужную пробирку, добавляли ростовую среду и центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 мин. Отмытые от DMSO клетки помещали в культуральные флаконы для дальнейшего культивирования в соответствии со стандартным протоколом.

Приготовление препаратов метафазных хромосом. Клетки высевали с плотностью (14–15) × 10^3 кл./$см^2$. Через 24–25 ч в культуральную среду с клетками добавляли колцемид в концентрации 0.02 мг/мл (Sigma, США). Через 1 ч среду удаляли, клетки промывали раствором PBS (Sigma, США) и ферментативно открепляли от пластика 0.05%-ным раствором трипсина. Клеточную суспензию центрифугировали, супернатант удаляли, осадок ресуспензировали и подвергали гипотонической обработке 0.56%-ным раствором KCl (Реахим, Россия). После гипотонической обработки клеточную суспензию центрифугировали (1500 об./мин), супернатант удаляли, клетки фиксировали в течение 1.5 ч холодной смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1), трижды меняя за это время фиксатор на свежий. Фиксированный материал раскапывали на холодные и влажные предметные стекла. Препараты в течение 1 нед. высушивали при комнатной температуре. Цитологические препараты метафазных хромосом окрашивали красителем Гимза (BDH, Англия) в PBS после предварительной трипсинизации. Кариотипический анализ проводили с использованием светового микроскопа Axio Scop (Carl Zeiss, Германия) при увеличениях объектива 20, 40 и 100×. Хромосомы идентифицировали в соответствии с международной номенклатурой (Mitelman, 1995) и атласом хромосом человека (Мамаева, 2000).

Кариотипический анализ клеточной культуры, после размораживания, осуществляли на 4-ом пассаже культивирования в стандартных условиях.

Определение активности β-галактозидазы (SA-β-Gal) ассоциированной со старением. Активность фермента является маркером клеточного старения. Клетки (10^5) высевали в чашки Петри диаметром 3 см и культивировали в течение 3 сут. Затем среду удаляли, клетки промывали PBS, фиксировали 4%-ным формальдегидом и окрашивали набором на SA-β-Gal (Cell Signaling, США) согласно инструкции производителя. Активность SA-β-Gal определяли по окрашиванию клеток в синий цвет под микроскопом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кариотипическая характеристика эМСК линии 2304 до заморозки. Неоднократное кариотипирование эМСК линии 2304 на разных этапах культивирования (Шорохова, Гринчук, 2021) позволило рассматривать ее как генетически стабильную. На первых пассажах после получения линии (пассаж 6) на фоне относительной кариотипической стабильности клеток (рис. 1*а*, табл. 1) в некоторых из них выявлялись дефекты – нарушение копийности хромосом, различия в конденсации между гомологами, межхромосомные ассоциации, в некоторых случаях приводящие к образованию атипичных двуплечих хромосом. На пассаже 15 культура характеризовалась как кариотипически стабильная. Отклонения от нормы были единичными (табл. 1, рис. 1*б*).

Кариотипирование эМСК 2304 после длительной (7 лет) криоконсервации. Две дочерние клеточные популяции были заморожены в жидком азоте с использованием ДМСО при температуре −196°C на 4- и 5-ом пассажах соответственно. В условиях глубокого холода они находились в течение 7 лет. Затем клетки размораживали и культивировали их в течение 3-х пассажей. С 4-ого пассажа после разморозки клетки анализировали кариотипически (рис. 2).

Анализ клеток на пассаже 4 после разморозки показал следующее. В обоих случаях стабильность генома в большей части кариотипированных клеток была нарушена в связи с возникновением анеуплоидии и структурных хромосомных перестроек (рис 3*а*, табл. 2). Анеуплоидия была обусловлена нестабильностью числа хромосомных копий в пределах кариотипа (моносомия, трисомия). Образование аберрантных хромосом было опосредовано ломкостью хромосомного материала. В поломки вовлекались разные хромосомы набора, при этом только один из гомологов. Поломки могли быть как прицентромерные, так и терминальные, либо с сохранением, либо с делетированием генетического материала. Некоторые хромосомы (чаще хромосомы 12 и X) характеризовались повышенной генетической нестабильностью – неоднократными аберрациями и нарушением числа копий. Общее число хромосом в клетках варьировало. Преимущество имели околодиплоидные клеточные варианты, однако единичные клетки типировались как околотри- и околотетраплоидные.

Повторный анализ после непродолжительного культивирования (пассаж 7 после размораживания) выявил усиление кариотипической гетерогенности клеток и увеличение числа аберрантных хромосом

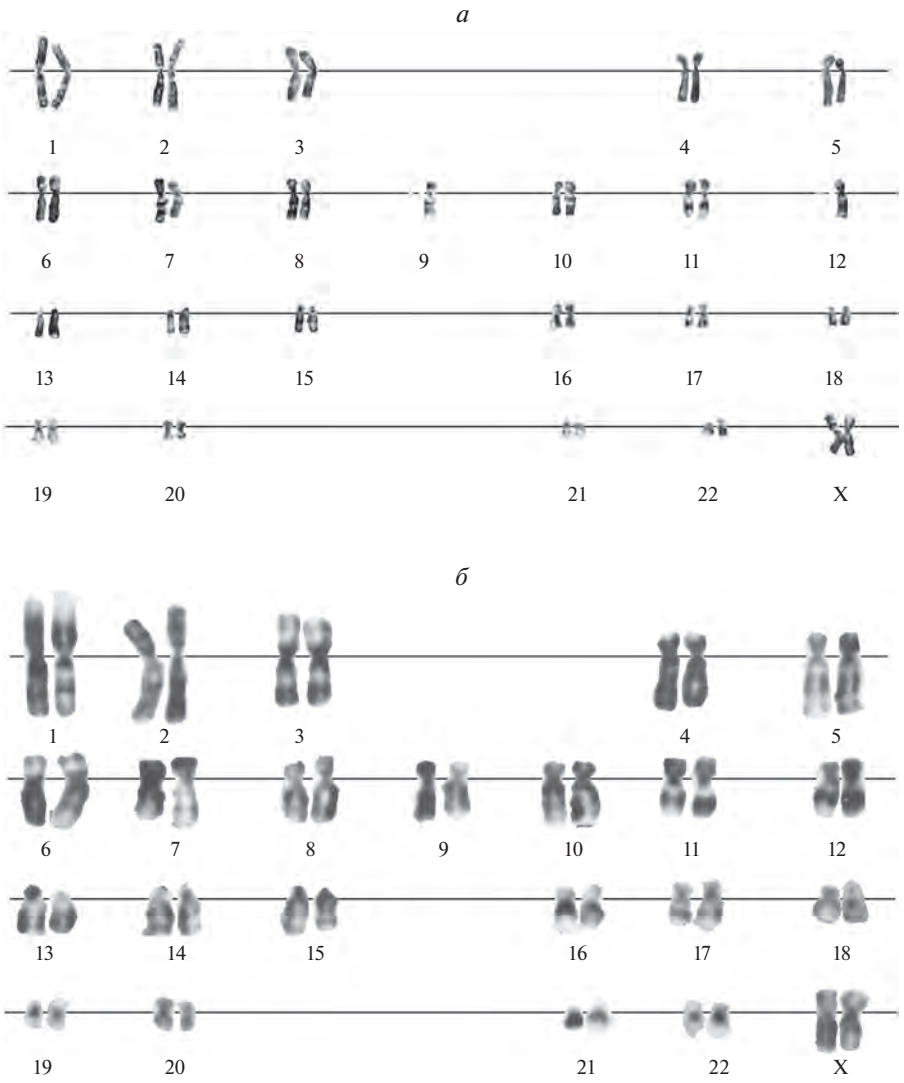

Рис. 1. Кариотип клеток эМСК человека линии 2304. *а* – На пассаже 6: моносомия по хромосомам 9 и 12; *б* – на пассаже 15, нормальный кариотип.

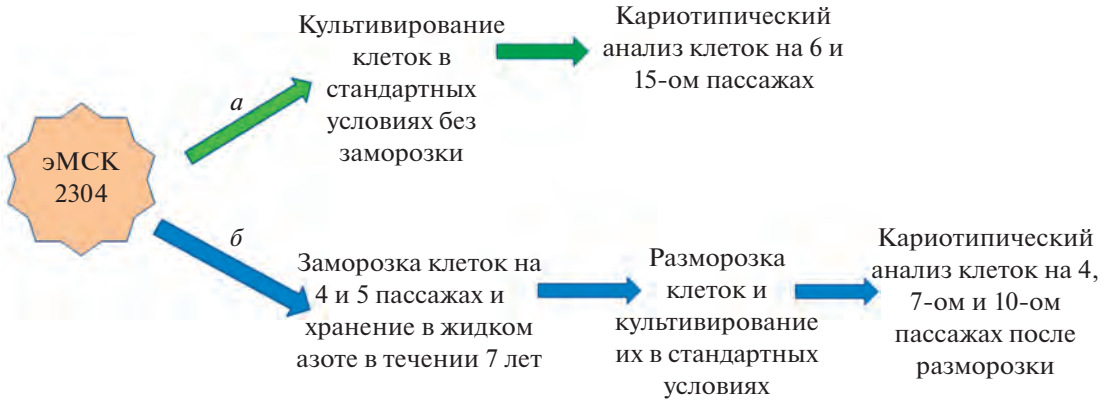

Рис. 2. Схема проведения эксперимента по кариотипированию эМСК человека линии 2304 при культивировании клеток до криоконсервации и после криоконсервации. *а* – Кариотипирование на пассажах 6 и 15 при культивировании клеток в стандартных условиях, *б* – длительная (7 лет) криоконсервация клеток с последующим размораживанием и переводом в стандартные условия культивирования. Кариотипический анализ проводили на пассажах 4, 7, 10.

Таблица 1. Кариотипические отклонения в эМСК линии 2304 при культивировании в стандартных условиях, пассажи 6 и 15

Ядро, № п.п.	Хромосома																						
Пассаж 6																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
1	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	3*n*	2*n*	2*n*	3*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
2	3*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + (*p* + *q*)	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
3	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
4	2*n*	2*n*	*n* + (*p* + *q*)	2*n*	2*n*	*n*(*p*+*q*)	2*n*	2*n*	2*n*	3*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
5	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
6	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*
7	2*n*	2*n*	2*n*	-	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
8	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
9	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
10	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n* + (*p* + *q*)	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*
Пассаж 15																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
1	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*
2	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*
3	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*
4	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
5	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
6	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
7	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
8	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
9	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
10	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
11	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
12	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
13	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
14	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	*n*
15	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*

Примечание. 2*n* – 2 нормальных гомолога хромосомы; *n* – моносомия; *n* + (*p* + *q*) – прицентромерная поломка с сохранением *p*- и *q*-плеча в одном гомологе; *n*(*p* + *q*) – моносомия и прицентромерная поломка с сохранением *p*- и *q*-плеча.

(рис. 3*б*, табл. 2). Генетическое разнообразие дефектных хромосом было усилено вовлечением в поломки второго гомолога и наличием (редко) аберраций нового типа (транслокаций, инверсий, дупликаций), не свойственных ни клеткам исходной линии до замораживания, ни клеткам на 4-ом пассаже после размораживания. Дестабилизированы были практически все метафазные пластинки. При наличии в кариотипе трех копий в перестройки могли быть вовлечены 2 из них или все 3.

Еще через 3 пассажа (пассаж 10 после размораживания) митотические пластинки были единичными и не удовлетворяли требованиям для их детального цитогенетического анализа. Клеточная популяция через 7 пассажей после размораживания проявляла все признаки клеточного старения: клетки значительно увеличивались в размере и меняли свою форму, снижали пролиферативную активность, окрашивались на SA-β-Gal (рис. 4). Стоит отметить, что контрольные клетки, не подвергнутые криоконсервации, активно пролиферировали до 25–27-ого пассажа, тогда как клетки, подвергнутые длительной криоконсервации, останавливали свою пролиферацию и подвергались старению уже на 15–16 пассажах.

По результатам настоящей работы было сделано заключение, что пребывание эМСК линии 2304 в

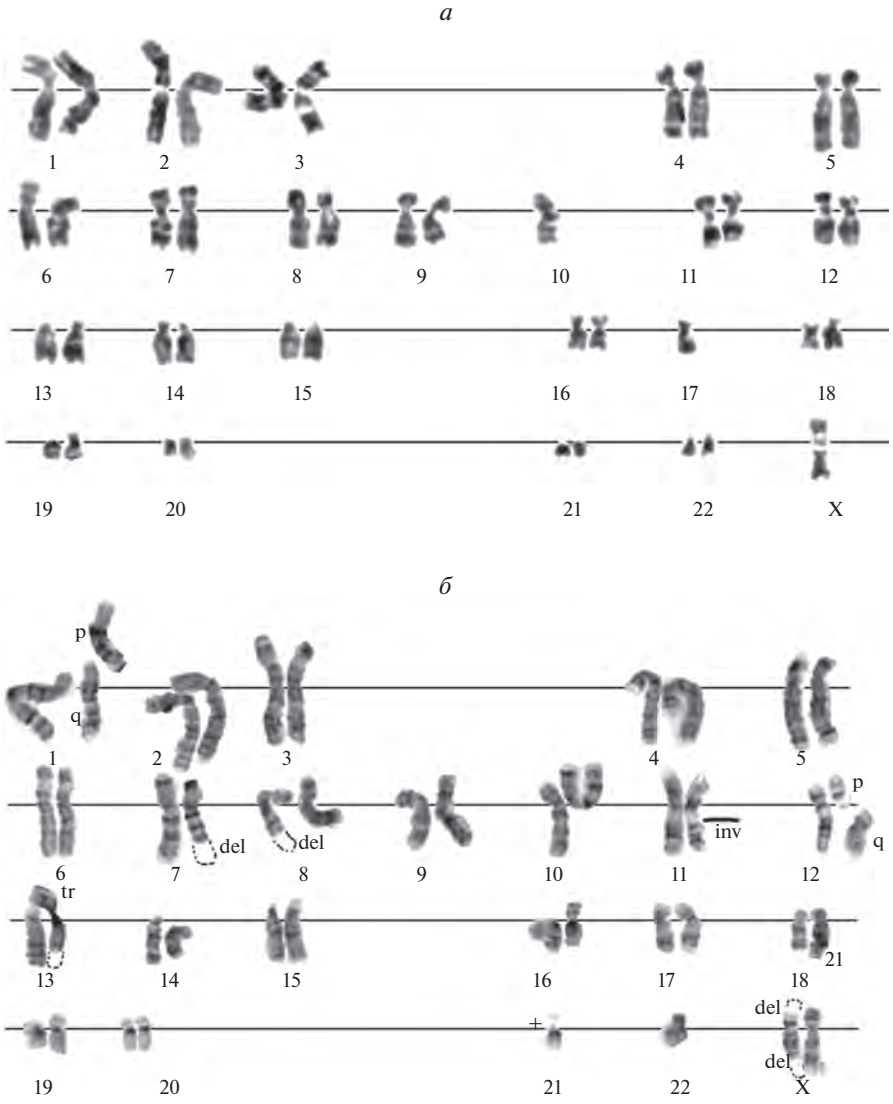

Рис. 3. Кариотипы эМСК человека линии 2304 при культивировании в стандартных условиях после 7 лет криоконсервации. *а* – Пассаж 4 после размораживания: терминальная делеция в хромосоме 1, прицентромерная поломка в Х-хромосоме с сохранением генетического материала, моносомия по хромосомам 10, 17 и Х; нарушение конденсации в гомологах хромосомы 11. *б* – Пассаж 7 после размораживания: прицентромерные поломки в хромосомах 1 и 12 с сохранением генетического материала; терминальные делеции в хромосомах 7, 8, Х; моносомия по хромосомам 22; инверсия в *q*-плече хромосомы 11, транслокация в хромосоме 13.

условиях многолетней криоконсервации приводит к дестабилизации генетического аппарата и преждевременному клеточному старению.

ОБСУЖДЕНИЕ

Широкое использование процедуры замораживания, дальнейшей криоконсервации и последующей разморозки различных биологических объектов предполагает сохранность их в неизменном виде. Тем не менее, вопрос о влиянии этой многоступенчатой процедуры на клеточный геном остается открытым.

Известно, что большинство процессов в клетках, поддерживающих стабильность генома, находятся под контролем гена *TP53*. Нарушение функций белка p53 ведет к возникновению и сохранению в популяции генетически дефектных клеток. Существуют данные, что наличие в кариотипе нарушения даже по одной хромосоме может спровоцировать дальнейшее развитие нестабильности генома (McGranahan et al., 2012).

В основе структурных хромосомных перестроек (делеций, транслокаций инверсий) лежат двуцепочечные разрывы ДНК. К механизмам поломок относят неспецифические слипания между негомологичными хромосомами, нарушение конденсации в митозе (Ran-

Таблица 2. Кариотипические особенности эМСК линии 2304 в процессе культивирования после криконсервации в жидком азоте в течение 7 лет

Ядро, № п.п.	Хромосома																						
	Клетки заморожены на пассаже 4 после получения линии, кариотипированы на пассаже 4 после размораживания																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
1	*n* + + del*q*ter	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	*n* + + del*p*	2*n*	2*n*	2*n*	*p* + *q*
2	*n* + + (*p* + *q*)	2*n*	3*n*	4*n*	5*n*	6*n*	7*n*	*n* + + del*q*ter	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + br*q*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n* + + del*q*ter	–	2*n*	2*n*	–	2*n*
3	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + + del*q*ter	3*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + br*q*	2*n*	*n* + + del*q*ter	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + + del*q*ter
4	*n* + + del*q*ter	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + + del*q*ter	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	*n*	2*n*
5	2*n*	4*n*	2*n*	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	2*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	2*n* + + del*p*	2*n*	2*n*	3*n*	3*n*	3*n*	3*n*	3*n*	2*n* + + del*p*	3*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	3*n*
6	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	*n* + + del*q*ter	2*n*	2*n*	*n* + br*q*	2*n*	2*n*	–	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	3*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	3*n*	2*n*	*n* + + ddel*q*ter
7	*n* + + (*p* + *q*)	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	3*n*	3*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
8	2*n*	2*n*	*n* + + del*q*ter	*n* + + br*q*ter	*n* + + del*q*ter	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + br*q*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	–
9	2*n*	*n* + del*p*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
10	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
11	2*n*	*n*	*n* + + del*p*ter	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	*n*	–	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*
12	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
13	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n* + + del*q*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + del*p*	*n* + + del*q*ter	*n* + br*q*	3*n*	2*n*	2*n*	–	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*
7	2*n* + + del*q*	*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n*	*n* + (*p* + *q*)
8	2*n*	2*n*	*n* + + ddel*q*ter	2*n*	*n* + + dedel*q*ter	del*p*ter	2br*q*	2*n*	2*n*	*n* + + dedel*p*ter	*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n*	*n*	2*n*	2*n*	–	–	–	*n* + (*p* + *q*)
9	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)	*n* + + 2br*p*ter	*n* + br*q*	*n* + (*p* + *q*)	2*n*	2*n*	3*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	*n* + + del*p*	*n* + + del*q*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + (*p* + *q*)

Таблица 2. Продолжение

Ядро, № п.п.	Хромосома																					
	Клетки заморожены на пассаже 5 после получения линии, кариотипированы на пассаже 4 после размораживания																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
1	*n*	*n*	*n*	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)	*n* + + del*q*ter	2*n*	*n* + + del*q*ter	*n* + + del*q*ter	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	–	–	2*n*	*n*	*n*	*n*	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)
2	*n*	*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n*	2*n*	*n*	*n* + del*p*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*
3	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	*n* + + del*q*ter	–	del*q*ter	*n*	tr/21br*q*ter	2*n*	*n* + + br*q*ter	*n*	2*n*	*n*	2*n*	–	*n*	–	*n*	*n*	–	*n*
4	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	3*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n*	*n*	*n*	2*n*	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)
5	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	2*n*	3*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + + del*q*ter
6	2*n*	*n* + + del*q* + + (*p* + *q*)	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + + del*q*ter	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n*	2*n*	–	del*q*ter	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + + del*p*
7	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + + del*q*ter	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n*	2*n*	*n*	–	2*n*	3*n*	2*n*
8	4*n*	4*n*	(*p* + *q*)	2*n* + + del*q*ter	*n* + + del*q*ter	2*n* + + del*q*ter	3*n*	2*n* + + 2del*q*ter	4*n*	3*n*	2*n* + + in*v*q*t*er	3*n*	4*n*	*n*	2*n*	3*n*	3*n*	3*n*	4*n*	4*n*	3*n*	3*n*	3*n*
9	4*n*	4*n*	3*n*	br*q*	3*n*	2*n* + + del*q*ter	3*n* + + del*q*ter	2*n* + + del*q*ter + + (*p* + *q*)	*n*	*n*	*n* + del*p*	2*n* + + 2del*q*ter	3*n*	2*n* + + tr/22	2*n*	3*n*	2*n*	3*n*	2*n*	2*n* + + 2del*p*	2*n*	2*n*	2*n* + + 2del*q*

Таблица 2. Окончание

Ядро, № п.п.	Хромосома																					
	Клетки заморожены на пассаже 5 после получения линии, кариотипированы на пассаже 7 после размораживания																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
1	*n* + + (*p* + *q*)	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + + del*q*ter	*n* + del*q*ter	2*n*	2*n*	*n* + + inv*q*ter	*n* + (*p* + + *q*)	*n* + + tr*q*ter	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n* + + del*q*ter
2	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + + del*q*ter	*n* + + br*q*med	3*n*	*n* + + del*q*ter	*n* + del*q*ter	2*n*	–	2*n* + *q*	2*n* + + del*q*ter	*n*	*n*	3*n*	2*n*	*n*	2*n*	*n*	*n*	*n*	3*n*	*n* + br*q*
3	*n* + + del*q*ter	3*n*	*n* + + del*p*ter	2*n*	*n* + + del*q*ter	2*n*	2*n*	del*q*ter	2*n*	2*n*	2*n*	–	*n*	–	*n*	2*n*	*n*	2*n*	*n*	*n*	*n*	–	–
4	3*n*	*n* + + del*p*ter	2*n*	*n*	2*n*	*n*	2*n*	–	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	*n*	*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	*n*	*n* + + del*q*ter
5	2*n*	*n* + + 2br*q*ter	3*n*	*n* + br*p*	*n* + br*p*	3*n*	3*n*	2*n*	*n* + + del*p*	2*n*	*q* + + 2del*p*	*n* + del*p*	2*n*	2*n*	2*n*	–	2*n*	2*n*	–	2*n*	–	2*n*	*n*
6	2*n*	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)	*n* + del*q*	*n* + del*q*	2*n*	2*n*	2*n*	–	*n* + del*q*	2*n*	2*n* + + br*q*	2*n*	*n* + + del*q*ter	*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	2*n*	*n*	del*p*
7	2*n* + + del*q*	*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n*	*n* + (*p* + + *q*)
8	2*n*	2*n*	*n* + + ddel*q*ter	2*n*	*n* + + dedel*q*ter	del*p*ter	2br*q*	2*n*	2*n*	*n* + + dedel*p*ter	*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	2*n*	2*n*	*n*	*n*	*n*	2*n*	2*n*	–	–	–	*n* + (*p* + + *q*)
9	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)	*n* + + 2br*p*ter	*n* + br*q*	*n* + (*p* + *q*)	2*n*	2*n*	3*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)	2*n*	*n* + + del*p*	*n* + + del*q*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	2*n*	*n* + (*p* + + *q*)

Примечание: 2*n* – два нормальных гомолога хромосомы; *n* – моносомия; 3*n* – трисомия; 4*n* – тетрасомия; *p* – короткое плечо хромосомы, *q* – длинное плечо; *p* + *q* – прицентромерная поломка хромосомы с сохранением материала; del*q*ter – один гомолог хромосомы с терминальной делецией *q*-плеча; del*p*ter – один гомолог хромосомы с терминальной делецией *p*-плеча; *n* + (*p* + *q*) – один гомолог хромосомы нормальный и второй – с прицентромерной поломкой; *n* + del*q* + (*p* +*q*) – трисомия: один гомолог нормальный, второй – с утратой *q*-плеча, третий – с прицентромерной поломкой с сохранением материала; *n* + del*p* – один гомолог нормальный, другой – с утратой *p*-плеча; 2*n* + del*q*ter + (*p* + *q*) – тетрасомия: два гомолога нормальные, третий – с делецией терминальной части *q*-плеча, четвертый – с прицентромерной поломкой с сохранением материала; 2*n* + (*p* + *q*) – трисомия: два гомолога нормальные, третий – с прицентромерной поломкой с сохранением материала; *2n* + del*p* – трисомия: два гомолога нормальные, третий – с прицентромерной поломкой с утратой *p*-плеча; 2*n* + del*q* – трисомия: два гомолога нормальные, третий – с прицентромерной поломкой с утратой *q*-плеча; *n* + del*q*ter – один гомолог нормальный, второй – с делецией в терминальной части *q*-плеча; *n* + inv*q*ter – один гомолог нормальный, второй – с инверсией в терминальной части *q*-плеча; *n* + br*q*ter + br*q*ter – трисомия: один гомолог нормальный, второй и третий – с поломкой в терминальной части *q*-плеча с сохранением хромосомного материала; 2*n* + br*q*ter – трисомия: два гомолога нормальные, гомолог с поломкой в терменальной части *q*-плеча с сохранением хромосомного материала; tr – транслокация.

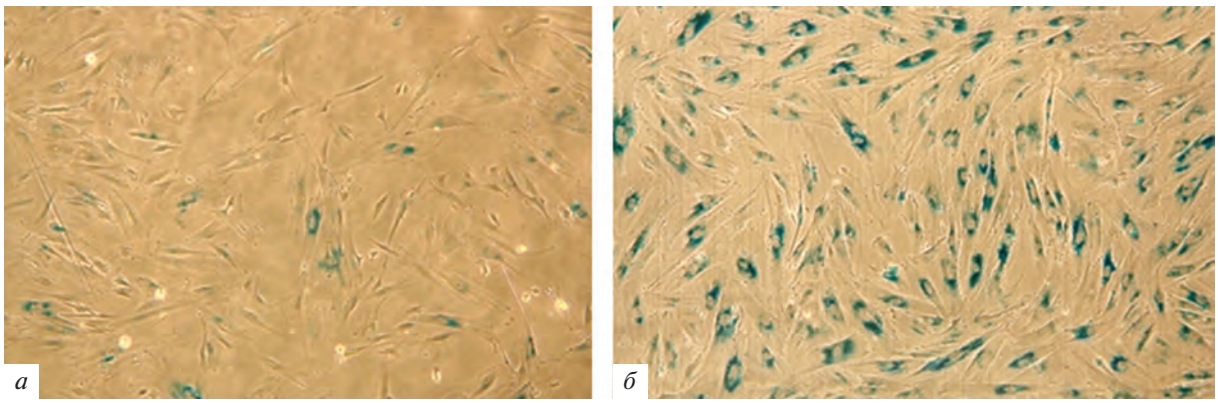

Рис. 4. Окраска эМСК линии 2304 на маркер старения SA-β-Gal. *а* – эМСК до длительного криохранения, пассаж 13; *б* – эМСК после 7 лет пребывания в условиях криохранения, пассаж 14.

gel et al., 2017). Индукторами двуцепочечных разрывов могут выступать экзогенные стрессы, в частности радиация, окислительный стресс, изменение температурного режима. Использование процедуры криоконсервации для стволовых клеток, мужских и женских половых клеток, эмбрионов, элементов крови и другого биоматериала, используемого в медицинских целях, по ряду причин входит в зону повышенного риска, так как, по имеющимся данным, криоконсервация не всегда обеспечивает полную сохранность его свойств (Pera et al., 2000; Reubinoff at al., 2000; Matidi, Bhonde, 2011; Одинцова и др., 2021).

Результаты настоящей работы, изучающей влияние процедуры криоконсервации и длительного (7 лет) хранения эМСК в жидком азоте на стабильность клеточного генома, показали дестабилизацию генетического аппарата у потомков клеток после их размораживания, а именно анеуполиплоидизацию хромосомного набора, повышенную ломкость хромосом, влекущую за собой огромный пул аберрантных хромосом, и нарушение конденсации в гомологах. Наличие таких изменений в геноме потомков эМСК, родительские клетки которых были подвергнуты криоконсервации, говорит том, что эта процедура для клеток данного типа является стрессовой, способствующей развитию кариотипической нестабильности.

Известно, что причины развития кариотипической нестабильности могут быть разными, но, тем не менее, связанными с нарушениями механизмов клеточного деления. Это могут быть повреждения веретена деления, сбой при расхождении центриолей, нарушение процессов репарации и репликации. Любая из причин может нарушить зеркальное деление родительской клетки на две дочерние. Кариотип, являясь индикатором генетической стабильности, равно как и нестабильности, отражает генетическое состояние клетки.

Анализируя полученные в настоящей работе данные в сравнении с данными, полученными нами при анализе трансформированных клеток китайского хомячка в культуре (Гринчук, Шилина, 2021), можно сделать вывод, что как сама процедура криконсервации, так и длительное хранение материала в жидком азоте оказывает дестабилизирующее действие на клеточный геном клеток. Характер кариотипических изменений в трансформированных клетках китайского хомячка и эМСК имел как сходные черты, так и отличия. В обоих случаях выявленные изменения были связаны с анеуплоидизацией размороженных клеток и повышенной ломкостью хромосомного материала. К отличиям относилось то, что в трансформированных клетках повышенной ломкостью характеризовалась только одна хромосома кариотипического набора.

В процесс дестабилизации клеточного генома эМСК были вовлечены почти все хромосомы набора. В поломки вовлекались с равной вероятностью разные хромосомы кариотипического набора, чаще других – хромосомы 12 и X. Хромосомные поломки, затрагивающие прицентромерные области, в ряде случаев сопровождались сохранением генетического материала в виде самостоятельных хромосом. Бесцентромерный материал, возникший в результате терминальных поломок хромосом, в ряде случаев был элиминирован. На раннем этапе культивирования эМСК после разморозки в процесс дестабилизации, как правило, вовлекалась только одна из гомологичных хромосом. После непродолжительного культивирования число разнотипных хромосомных дефектов увеличивалось т.к. в процесс дестабилизации вовлекались оба гомолога. Стоит отметить, что, в отличие от экспериментов с трансформированнными клетками китайского хомячка, в настоящей работе отсутствовала работа с краткосрочным хранением в жидком азоте, в связи с чем мы не можем рассматривать возникшую кариотипическую нестабильность только как ответ на длительность хранения в жидком азоте.

Криоконсервация – процесс многогранный и многоэтапный. Каждый этап (замораживание, хра-

нение, размораживание) в той или иной степени является стрессом для клеток. Таким образом, возникшая хромосомная нестабильность расценивается нами как клеточный ответ на стресс, вызванный как процедурой криоконсервации, так и ее длительным воздействием. Существует представление о том, что укорочение хромосом в терминальной части ведет к клеточному старению. Терминальная часть хромосом (теломеры) представляет собой богатые гуанином тандемные повторы ДНК и обеспечивает хромосоме структурную стабильность в процессе клеточного деления. В каждом цикле клеточного деления длина теломер уменьшается, что в результате приводит к клеточному старению (Hiyama, Hiyama, 2007). В этой связи, интерпретируя полученные нами данные, можно предположить, что возникновение в кариотипе эМСК, претерпевших длительную криоконсервацию, разнотипных по величине терминальных поломок и ускоренной прогрессии их разнообразия, это путь к ускоренному клеточному старению и последующей гибели клеток.

Необходимо подчеркнуть, что при длительной работе с эМСК эффекта преждевременного клеточного старения после краткосрочного (от нескольких недель до полугода) пребывания в жидком азоте не наблюдали (Земелько и др., 2011; Шорохова, Гринчук, 2021), тогда как мы обнаружили его в настоящей работе после длительной криоконсервации клеток. В этой связи, анализируя полученные в настоящей работе данные, возникшую кариотипическую нестабильность мы рассматриваем как следствие и самой процедуры криоконсервации, и ее длительного воздействия, однако длительность криохранения оказывает более выраженное стрессовое воздействие на пролиферацию клеток после разморозки, чем непосредственно сама процедура криоконсервации. В пользу этого заключения говорит и работа Астрелиной с соавторами (2013), в которой показано, что краткосрочная криоконсервация МСК (в их случае – плаценты) не снижала пролиферативной активности клеток после разморозки и не вызывала кариотипических отклонений.

Подводя итог проделанной работе можно сделать следующие выводы:

1) Процедура криоконсервации и длительное хранение в жидком азоте для клеточных культур млекопитающих является стрессом, индуцирующим изменения в структуре кариотипа.

2) Реакция генома клеток различного происхождения на одни и те же условия криоконсервации может различаться.

3) Криоконсервация эМСК может стать индуктором преждевременного клеточного старения.

4) Для того чтобы избежать рисков, связанных с криоконсервацией эМСК, необходим анализ их генетических характеристик после процедуры размораживания, в первую очередь – детальный кариотипический анализ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда и Санкт-Петербургского научного фонда (проект № 22-24-20122).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Астрелина Т.А., Гомзяков А.Е., Кобзева И.В., Карпова Е.Э., Круглова Я.А., Скоробогатова Е.В., Балашов Д.Н., Князев О.В., Яковлева М.В. 2013. Оценка качества и безопасности применения криоконсервированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток плаценты в клинической практике. Гены и клетки. № 4. С. 82 (*Astrelina T.A., Gomzyakov A. E., Kobzeva I.V., Karpova E.E., Kruglova Ya.A., Skorobogatova E.V., Balashov D.N., Knyazev O.V., Yakovleva M.V.* 2013. Evaluation of the quality and safety of cryopreserved multipotent placental mesenchymal stromal cells in clinical practice. Genes and Cells. № 4. P. 82.)

Гринчук Т.М., Шилина М.А. 2021. Влияние криоконсервации на стабильность кариотипа трансформированных фибробластов легкого китайского хомячка *in vitro.* Цитология. Т. 63. № 1. С. 63. (*Grinchuk T.M., Shilina M.A.* 2021. Effect of cryopreservation on the stability of the karyotype of transformed Chinese hamster lung fibroblasts *in vitro*. Tsitologiya V. 63. № 1. P. 63.)

Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичевая Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. № 12. С. 919. (*Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artsybasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Beachevaya N.K., Korsak V.S., Nikolskiy N.N.* 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium. Identification, characterization and use as a feeder layer for the cultivation of human embryonic stem lines. Tsitologiya. V. 53. № 12. P. 919.)

Мамаева С.Е. 2002. Атлас хромосом – постоянные клеточные линии человека и животных. М.: Науч. мир. 231 с. (*Mamaeva S.E.* 2002. Atlas chromosomes permanent cell lines of human and animals. M.: Nauchniy mir. 231 p.)

Одинцова И.А., Русакова С.Э., Шмидт А.А., Тимошкова Ю.Л. 2021.Криоконсервация половых клеток: история и современное состояние вопроса. Гены и клетки. № 3. С. 44 (*Odintsova I.A., Rusakova S.E., Schmidt A.A., Timoshkova Yu.L.* 2021. Cryopreservation of germ cells: history and current state of the issue. Genes and cells. № 3. P. 44.)

Полянская Г.Г., Семенова Е.Г., Шубин Н.А. 1990. Влияние криоконсервации на цитогенетические характеристики клеточной сублинии фибробластов кожи ин-

дийского мунджука. Цитология. Т. 32. № 3. С. 256. (*Polyanskaya G.G., Semenova E.G., Shubin N.A.* 1990. Cytological variations in the Indian muntjac skin fibroblast cell line as a result of cryoconservation. Tsytologya. V. 32. № 3. P. 256.)

Семенова Е.Г. 1988. Внеплановый синтез ДНК в культивируемых клетках после криоконсервации. Криобиология. № 1. С. 17. (*Semenova E.G.* 1988. Unscheduled DNA synthesis in cultured cells after cryoconservation. Cryobiology. № 1. P. 17.)

Шорохова М.А., Гринчук Т.М. 2021. Стабильность кариотипа мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека *in vitro*. Цитология. Т. 63. № 5. С. 491. (*Shorokhova M.A., Grinchuk T.M.* Stability of the human endometrial mesenchymal stem cells karyotype *in vitro*. Tsitologiya. V. 63. № 5. P. 491.)

Antebi B., Asher A.M., Rodriguez L.A. 2nd, Moore R.K., Mohammadipoor A., Cancio L.C. 2019. Cryopreserved mesenchymal stem cells regain functional potency following a 24-h acclimation period. J. Transl. Med. V. 17. P. 297. https://doi.org/10.1186/s12967-019-2038-5

Bahsoun S., Coopman K., Akam E.C. 2019. The impact of cryopreservation on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a systematic review. J. Transl. Med. V. 17. P. 397. https://doi.org/10.1186/s12967-019-02136-7

de-Lima Prata K., de Santis G.C., Orellana M.D., Palma P.V., Brassesco M.S., Covas D.T. 2012. Cryopreservation of umbilical cord mesenchymal cells in xenofree conditions. Cytotherapy. V. 14. P. 694.

Diaferia G.R., Dessi S.S., Deblasio P., Biunno I. 2008. Is stem cell chromosomes stability affected by cryopreservation conditions? Cytotechnology. V. 58. P. 11.

Duarte D.M., Cornélio D.A., Corado C., Medeiros V.K., de Araujo L.A., Cavalvanti G.B.J., de Medeiros S.R. 2012. Chromosomal characterization of cryopreserved mesenchymal stem cells from the human subendothelium umbilical cord vein. Regen. Med. V. 7. P. 147.

Heng B.C., Kuleshova L.L., Bested S.M., Liu H., Cao T. 2005. The cryopreservation of human embryonic stem cells. Biotechnol. Appl. Biochem. V. 41. P. 97.

Heng H.H., Liu G., Stevens J.B., Abdallah B.Y., Horne S.D., Ye K.J., Bremer S.W., Chowdhury S.K., Ye C.J. 2013. Karyotype heterogeneity and unclassified chromosomal abnormalities. Cytogenet. Genome Res. V. 139. P. 144.

Hiyama E., Hiyama K. 2007. Telomere and telomerase. Br. J. Cancer. V. 96. P. 1020.

Imaizumi K., Nishishita N., Muramatsu M., Yamamoto T., Takenaka C., Kawamata S., Kobayashi K., Nishikawa S., Akuta T. 2014. A simple and highly effective method for slow-freezing human pluripotent stem cells using dimethyl sulfoxide, hydroxyethyl starch and ethylene glycol. PLoS One. V. 9. P. e88696. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088696

Matidi M., Bhonde R. 2011. Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells. Arch. Toxicol. V. 86. P. 651.

McGranahan N., Burrell R.A., Endesfelder D., Novelli M.R., Swanton C. 2012. Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. EMBO Rep. V. 13. P. 528.

Passerini V., Ozeri-Galai E., de Pagter M.S., Donnelly N., Schmalbrock S., Kloosterman W.P., Kerem B., Storchová Z. 2016. The presence of extra chromosomes leads to genomic instability. Nat. Commun. V. 7. P. 10754. https://doi.org/10.1038/ncomms10754

Pera M.F., Reubinoff B., Trounson A. 2000. Human embryonic stem cells. J. Cell Sci. V. 113. P. 5.

Polchow B., Kebbel K., Schmiedeknecht G., Reichardt A., Henrich W., Hetzer R., Lueders C. 2012. Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. J. Transl. Med. V. 10. P. 98.

Rangel N., Forero-Castro M., Rondón-Lagos M. 2017. New insights in the cytogenetic practice: Karyotypic chaos, nonclonal chromosomal alterations and chromosomal instability in human cancer and therapy response. Genes (Basel). V. 8. P. 155.

Ray M., Mohandas T. 1975. Proposed banding nomenclature for the Chinese hamster chromosomes (Cricetulus gruseus). Cytogenet. Cell Genet. V. 16. P. 83.

Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.Y., Trounson A., Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. Nat. Biotechnol. V. 18. P. 399.

Tan Z., Chan Y.J.A., Chua Y.J.K., Rutledge S.D., Pavelka N., Cimini D., Rancati G. 2019. Environmental stresses induce karyotypic instability in colorectal cancer cells. Mol. Biol. Cell. V. 30. P. 42.

Tang D.Q., Wang Q., Burkhardt B.R., Litherland S.A., Atkinson M.A., Yang L.J. 2012. *In vitro* generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. Am. J. Stem Cells. V. 1. P. 114.

Response of the Endometrial Mesenchymal Stem Cell Genome to the Procedure of Long-Term Cryopreservation

T. M. Grinchuk[a], M. A. Shorokhova[a], *, and N. A. Pugovkina[a]

[a] *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

**e-mail: shili-mariya@yandex.ru*

Information about the effect of cryopreservation on functions and the genetic of cells of different genesis is not unambiguous and is in the process of accumulation. This work is aimed at studying the effect of long-term storage (7 years) of human endometrial mesenchymal stem cells (eMSCs) in the frozen state on the stability of their genome in vitro. The results showed destabilization of the karyotype structure in the descendants of cells after their thawing, namely, aneupolyploidization, increased fragility of chromosomes, resulting in a huge pool of aberrant chromosomes, and impaired condensation in homologues. Chromosomal breakds in centromeric regions offen accompa-

nied by the preservation of genetic material in the form of independent chromosomes. Almost all chromosomes of the set were involved in the process of destabilization of the eMSCs cell genome. It has been shown that the procedure of long-term cryopreservation can become an inducer of premature cellular aging of eMSCs after their thawing. Comparison of the data obtained with the results of karyotyping of transformed Chinese hamster cells that underwent a similar procedure led to the conclusion that cryopreservation for biological systems can be a stress that induces genetic defects of various types at the karyotype level. The response of the genome of cells of different origin to the same conditions of cryopreservation may differ.

Keywords: human endometrial mesenchymal stem cells, karyotype, chromosomes, cryogenic freezing, genome instability