

УДК 575.117.2

© Коллектив авторов, 2012.

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *GATA-2* И *IDO* В КЛЕТКАХ СТВОЛОВОГО КОМПАРТМЕНТА КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ РАЗНЫХ СРОКОВ ГЕСТАЦИИ

А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава, Е.Д. Луценко, М.В. Останков, Ю.А. Гаевская, Н.Н. Бабенко, А.Ю. Димитров

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, отдел криопатофизиологии и иммунологии (руководитель – академик НАН Украины А.Н. Гольцев), г. Харьков.

EXPRESSION RATE OF *GATA2* AND *IDO* GENES IN CELLS OF STEM COMPARTMENT OF CRYOPRESERVED FETAL LIVER OF DIFFERENT GESTATION TERMS

A.N. Goltsev, T.G. Dubrava, E.D. Lutsenko, M.V. Ostanokov, Yu.A. Gaevskaya, N.N. Babenko, A.Yu. Dimitrov

SUMMARY

The expression rate of *gata2* and *ido* genes was comparatively studied in general suspension and in isolated by magnet sorting hemopoietic and mesenchymal stem cell fractions of fetal liver of the mice of the 14th and 18th gestation days after cryopreservation. There was demonstrated the expression rate of *gata2* and *ido* genes in fetal liver cells with the prolongation of gestation terms and rise in fetal liver cells of late gestation terms after cryopreservation.

РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ *GATA-2* ТА *IDO* У КЛІТИНАХ СТОВБУРОВОГО КОМПАРТМЕНТУ КРИОКОНСЕРВОВАНОЇ ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ РІЗНИХ ТЕРМІНІВ ГЕСТАЦІЇ

А.М. Гольцев, Т.Г. Дубрава, О.Д. Луценко, М.В. Останков, Ю.О. Гаєвська, Н.М. Бабенко, О.Ю. Димітров

РЕЗЮМЕ

У порівняльному аспекті вивчена експресія генів *gata2* й *ido* у загальній суспензії й у виділених методом магнітного сортування фракціях стовбурових кровотворних і мезенхімальних клітин фетальної печінки мишей 14-ої й 18-ої діб гестації після криоконсервування. Продемонстровано зниження рівня експресії генів *gata2* й *ido* у клітинах фетальної печінки по мірі пролонгації строків гестації й підвищення в клітинах фетальної печінки пізніх строків гестації після криоконсервування.

Ключевые слова: экспрессия генов, стволовая кроветворная клетка, стволовая мезенхимальная клетка, фетальная печень.

В общем спектре препаратов клеточной и тканевой терапии особое место занимает фетальная печень [2, 5]. Ее уникальный терапевтический потенциал продемонстрирован в самых различных ситуациях. При этом в сравнительном аспекте редко анализируются результаты эффективности применения фетальной печени разных сроков гестации. Важность такого анализа заключается в том, что в процессе эмбриогенеза существенно меняются структурные и функциональные характеристики многих составляющих компонентов фетальной печени, но, прежде всего стволых кроветворных и мезенхимальных клеток. Именно эти ключевые компоненты фетальной печени рассматриваются как потенциальные клетки-корректоры гемо- и иммунопоэза при лечении аутоиммунных патологий [7, 12].

Значимость зависимости терапевтического эффекта клеток фетальной печени от срока гестации удваивается еще и в связи с тем, что обязательным компонентом технологического процесса применения фетального материала, включая и печень, в клинической практике является его криоконсервирование [3]. Характер влияния криоконсервирования на биообъект строго зависит

от его исходного состояния. Действительно, продемонстрирована зависимость сохранности стволых кроветворных клеток от фазы клеточного цикла, уровня дифференцировки, предобработки цитостатиками и т.д. [1]. Вместе с тем, в последнее время акцентируется внимание на необходимости аттестации после криоконсервирования геномного и постгеномного профиля клеток стволых компартмента [6, 13]. С точки зрения первостепенной необходимости коррекции при жестких аутоиммунных заболеваниях гемопоэтического плацдарма и иммунной системы, особую значимость представляет оценка состояния соответственно гена *gata2* в стволых кроветворных и *ido* в мезенхимальных клетках.

Целью данной работы было провести оценку уровня экспрессии генов *gata2* и *ido* в клетках стволых компартмента фетальной печени разных сроков гестации до и после криоконсервирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были нефракционированные клетки фетальной печени мышей линии СВА/Н 14-х и 18-х суток гестации и выделенные из них на магнитном сортере (BDTM

Imagnet) фракции с признаками стволовых кроветворных и мезенхимальных клеток. Фракцию стволовых кроветворных клеток получали методом негативной селекции с помощью Biotinylated Mouse Lineage Depletion Cocktail (Lin⁻) и Streptavidin Magnetic Particles-DM и последующей позитивной селекции с использованием CD117 MicroBeads; фракцию мезенхимальных стволовых клеток - методом позитивной селекции с использованием CD105 Multisort Kit (Miltenyi Biotec).

Нефракционированную суспензию клеток фетальной печени криоконсервировали в пластиковых ампулах Nunc (Германия) в объеме 1,8 мл с концентрацией 2×10^6 кл/мл; выделенные на магнитном сортере фракции клеток-предшественников - в криосоломинках (minitubes d - 0,25 mm, Германия) в объеме 30 мкл с той же концентрацией криоконсервировали под защитой 10% диметилсульфоксида по двухэтапной программе [2].

Уровень экспрессии генов *gata2* и *ido* в цельных и фракционированных суспензиях фетальной печени оценивали методом полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции [4] по наличию ампликонов этих генов. Общую РНК выделяли с помощью набора Diatom RNA Prep 100 (Isogene Lab, Ltd, Россия) из 1×10^5 клеток каждого образца. Полученную смесь нуклеиновых кислот обрабатывали ДНКазой I согласно инструкции производителя (ООО «Синтол», Россия). Реакцию обратной транскрипции ставили с использованием гандом-олигонуклеотидов и ревертазы (M-Mlv) (НИИЭ МЗ РФ, «Реверта L» (Россия)). Праймеры к исследуемым генам были сконструированы на основе базы данных «GenBank» (NCBI BLAST, USA): *gata2* - NM_008090.5 (fragment length 272 n.p.), *ido* - NM_008324.1 (fragment length 342 n.p.) и синтезированы в АОЗТ «Медбиосервис» (Киев). Детекцию продуктов амплификации проводили методом капиллярного электрофореза в чип-анализаторе «Agilent 2100» (США). Результаты были нормированы по отношению к показателю экспрессии гена *beta actin* (housekeeping gene) (NM_007393.3). Отрицательным контролем была реакционная смесь без кДНК. Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента с применением компьютерной программы MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выяснение характера влияния криоконсервирования на генетический профиль клеток стволового компартмента представляет интерес с точки зрения перспектив применения и прогноза терапевтической активности криоконсервированных клеток фетальной печени разных сроков гестации.

Выбор генов *gata2* и *ido* обусловлен тем, что ген *gata2* играет важную роль в раннем гемопоэзе и

контролирует самоподдержание стволовых кроветворных клеток [8]. Ген *ido* контролирует наработку фермента индоламин 2,3-диоксигеназы, участвующего в активации супрессорного звена иммунитета [9].

Как видно (рис.1А), с увеличением срока гестации (с 14-х по 18-е сутки) содержание транскриптов гена *gata2* в общем пуле нативных клеток снижалось почти в 2 раза. В выделенной фракции Lin⁻CD117⁺ отмечена такая же тенденция изменения по срокам гестации экспрессии гена *gata2*, но с еще большими различиями. Криоконсервирование же в обеих суспензиях вызывало диаметрально противоположный эффект, а именно, снижение содержания транскриптов в клетках 14 суток гестации и увеличение - 18 суток гестации. Важно заметить, что в выделенной фракции Lin⁻CD117⁺ клеток 18 суток гестации была отмечена максимальная стимуляция экспрессии гена *gata2* в сравнении со всеми исследуемыми образцами, в том числе и нативными 14-х суток гестации. То есть, в отношении гена *gata2* в клетках фетальной печени 18 суток гестации, криоконсервирование проявляло «ревертирующий» эффект. Максимальная степень экспрессии гена *gata2* в выделенной фракции стволовых кроветворных клеток этого срока гестации может быть обусловлена его активацией в отсутствие акцессорно-регуляторных клеток микроокружения.

Общая тенденция изменения уровня экспрессии гена *ido* (рис.1Б) в клетках фетальной печени совпадала с таковой у гена *gata2*. В нативных нефракционированных суспензиях и выделенных CD105⁺ фракциях содержание транскриптов гена *ido* с увеличением срока гестации также существенно снижалось. Похоже, что такой характер изменения экспрессии гена *ido* может быть связан с обеспечением фетальной печенью иммунного профиля организма на той или иной стадии беременности. Факт активации материнских клеток-эффекторов в терминальные сроки пренатального периода есть следствием снижения супрессорной функции Т-регуляторных клеток, что в свою очередь может быть результатом минимизации продукции фермента индоламин 2, 3-диоксигеназы фетальной печенью [10, 11]. В пользу этого свидетельствуют и экспериментальные данные, что инактивация фермента 1-метилтриптофаном приводила к отторжению эмбриона [11].

Важно заметить, что после криоконсервирования ингибция экспрессии гена *ido* как в нефракционированных так и фракционированных клетках фетальной печени 14 суток гестации (рис. 1Б) была выражена в значительно большей степени, чем гена *gata2*. Вместе с тем кратность увеличения экспрессии гена *ido* после криоконсервирования в клетках фетальной печени 18 суток гестации была менее выражена, чем у *gata2*.

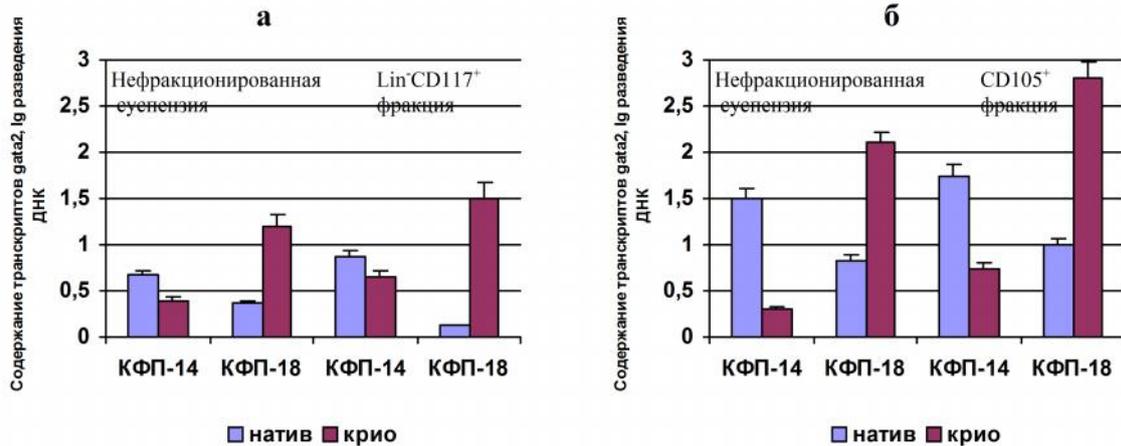


Рис.1 Полуколичественный анализ экспрессии генов *gata2* (а) и *ido* (б) в нефракционированной суспензии клеток фетальной печени и фракциях стволовых кроветворных и мезенхимальных клеток до и после криоконсервирования. Примечание: КФП-14 и КФП-18 – клетки фетальной печени 14 и 18 суток гестации.

Существенно, что общие закономерности изменения уровня экспрессии исследуемых генов имели место даже при некоторых различиях условий криоконсервирования нефракционированной суспензии и выделенных фракций стволовых клеток.

ВЫВОДЫ

По мере пролонгации сроков гестации уровень экспрессии генов *gata2* и *ido* в клетках стволового компартмента фетальной печени снижался. После криоконсервирования уровень экспрессии исследуемых генов в фетальной печени 18 суток гестации существенно повышался, превосходя таковой даже в нативном материале ранних сроков гестации. Данный факт подчеркивает способность криоконсервирования реализовать «ревертирующий» эффект в отношении клеток фетальной печени поздних сроков гестации, что расширяет возможности использования такого материала в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольцев А.Н. Влияние факторов криоконсервирования на иммунологические свойства кроветворных клеток костного мозга: Автореф. дис.. док.мед.наук.-Харьков. - 1988. – 35 с.
2. Гольцев А.Н. Криоконсервированный аллогенный костный мозг – новая мишень иммуномодулирующей активности клеток фетальной печени / Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Мацевитая И.Ю. [и др.] // Пробл. криобиологии.- 2008.- Т.18, №3.- С. 313-315
3. Гольцев А.Н. Особенности влияния криоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации / А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава, Л.В. Останкова [и др.]//Пробл. криобиологии.- 2009.- Т. 9, №2.- С.186-199.
4. Молекулярная клиническая диагностика / Под

ред.. Херрингтона С., Макги Дж. 1999, Москва: Мир.- 558 с.

5. Сухих Г.Т. Перспективы использования фетальных стволовых/прогениторных клеток человека в клеточной терапии / Г.Т. Сухих, В.В. Малайцев, И.М. Богданова // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2008. - №8. – С.5-13.

6. Фуллер Б. Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих / Б. Фуллер, К. Грин, В.И. Грищенко // Пробл. криобиологии. – 2004. - №3. – С.58-71.

7. Goltsev A.N.Peculiarities of functional state modulation of genetic apparatus of fetal liver cells with stemness characteristics after cryopreservation / A.N. Goltsev, E.D. Lutsenko, A.Yu. Dimitrov [et al] // Cryoletters.- 2011.- Vol.32, №6.- P.543-544.

8. Gudmundsson K.O., Thorsteinsson L., Sigurjonsson O.E. Gene expression analysis of hematopoietic progenitor cells identifies Dlg7 as a potential stem cell gene // Stem Cells.- 2007.- Vol.25, №6.- P.1498-1506.

9. Mellor A.L. Indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy / A.L. Mellor, P. Chandler, L.G. Kook [et al.] // J. Rep. Immunology.- 2002.- №57.- P.143-150.

10. Mellor L.A., Munn H.D. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? // Immunology Today.- 1999.- Vol.20, № 10.- P.469-473.

11. Munn D.H. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism / D.H. Munn, M. Zhou, J.T. Attwood [et al.]// Science.-1998.- Vol.281, №5390.- P.1191-1193.

12. Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study / K. Le Blanc, F. Frassoni, L. Ball [et al.]//Lancet.- 2008.- 371.- P.1579-1586.

13. Storey K.B. Strategies for exploration of freeze responsive gene expression: advances in vertebrate freeze tolerance // Cryobiology.- 2004.- 48.- P.134-145.