

Состояние генетического аппарата клеток стволового компартмента криоконсервированной фетальной печени разных сроков гестации

А.Н. ГОЛЬЦЕВ, Е.Д. ЛУЦЕНКО, Т.Г. ДУБРАВА, М.В. ОСТАНКОВ, Н.Н. БАБЕНКО,

Ю.А. ГАЕВСКАЯ, Е.Е. ЯМПОЛЬСКАЯ, А.Ю. ДИМИТРОВ, О.В. ЧЕЛОМБИТКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

State of Genetic Apparatus of Cryopreserved Stem Cells from Fetal Liver of Different Gestation Terms

A.N. GOLTSEV, E.D. LUTSENKO, T.G. DUBRAVA, M.V. OSTANKOV, N.N. BABENKO,

YU.A. GAYEVSKAYA, E.E. YAMPOLSKAYA, A.YU. DIMITROV, O.V. CHELOMBITKO

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В последнее время в криобиологических исследованиях наблюдается четкая тенденция, если не переориентации, то смещения акцента в сторону решения прикладных задач медицинского профиля, поскольку криоконсервирование – этап технологического процесса применения препаратов клеточной и тканевой терапии в клинической практике. Одной из базовых структурно-функциональных единиц органно-тканевых субстратов фетальных тканей являются стволовые клетки, в первую очередь, кроветворные (СКК) и мезенхимальные (МСК). Эти клетки – уникальные хранилища генетической информации, необходимой для реализации адекватных программ пролиферации, дифференцировки и в целом их терапевтического потенциала. В связи с этим принципиально значима морфофункциональная сохранность клеток стволового компартмента после криоконсервирования.

Цель работы – оценить уровень экспрессии генов *gata2* и *ido* в клетках стволового компартмента фетальной печени (ФП) разных сроков гестации до и после криоконсервирования.

В работе использованы клетки ФП мышей линии CBA/H 14 и 18-х суток гестации. Фракции СКК и МСК выделяли методом иммуномагнитного сортирования с использованием соответственно «MicroBeads» CD117 и CD105 («Miltenyi Biotec», США). Криоконсервирование клеток ФП проводили под защитой 10%-го раствора диметилсульфоксида по двухэтапной программе [Гольцев А.Н., 1995]. Экспрессию генов *gata2* и *ido* в нефракционированных клетках ФП и выделенных фракциях клеток Lin-CD117⁺ и CD105⁺ определяли методом ПЦР с этапом обратной транскрипции, детекцию продуктов амплификации проводили на чип-анализаторе «Agilent 2100» (США).

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

Recently in cryobiology a distinct tendency if not to reorientation but to shifting the accent towards the solving of applied tasks of medical expertise, as cryopreservation is the stage of technological process of applying the preparations of cell and tissue therapy in clinical practice. One of the basic structural and functional units of organ and tissue substrates of fetal tissues are stem cells, first of all, hemopoietic (HSCs) and mesenchymal (MSCs) ones. These cells are unique depots of genetic information necessary for the implementation of adequate programs of proliferation, differentiation, generally, their therapeutic potential. Therefore, fundamentally important is morphofunctional integrity of stem cells after cryopreservation.

The research aim was to assess the expression rate of *gata2* and *ido* genes in stem cells of fetal liver (FL) of different gestation terms prior to and after cryopreservation.

We used the FL cells of CBA/H mice of 14th and 18th days of gestation. HSCs and MSCs fractions were isolated by immunomagnetic sorting using respectively CD117 and CD105 MicroBeads (Miltenyi Biotec). The cells were cryopreserved under the protection of 10% dimethyl sulfoxide according to the two-step program [Goltsev A.N., 1995]. Expression of *gata2* and *ido* genes in non-fractionated FL cells and in cells of isolated fractions Lin-CD117⁺ and CD105⁺ was determined by PCR with reverse transcription stage, the amplification products were detected with chip analyzer Agilent 2100 (USA).

It has been found that with prolongation of gestation terms the expression rate of *gata2* and *ido* genes in stem cells of FL reduced. After cryopreservation the expression rate of the studied genes in FL of 18 gestation days increased significantly, exceeding even that of native material of earlier gestation terms. This fact highlights the ability of cryopreservation to implement a 'revitalizing' effect on FL cells of late gestation terms, extending the use of such a material in clinics.