

**Экспрессия гена индоламин-2,3-диоксигеназы
в криоконсервированных фетальных нервных клетках**
Е.А. Порожан, А.Ю. Димитров, Н.Н. Бабенко, Т.Г. Дубрава, А.Н. Гольцев
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Indoleamine-2,3-Dioxygenase Gene Expression in Cryopreserved Fetal Nerve Cells
E.A. Porozhan, A.Yu. Dimitrov, N.N. Babenko, T.G. Dubrava, A.N. Goltsev
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Индоламин-2,3-диоксигеназа (ИДО) – фермент, способствующий супрессии Т-клеточного звена иммунитета. Данные о возможности коррекции иммунного статуса организма при аутоиммунных заболеваниях путем ингибции Т-клеточной реактивности по ИДО-зависимому механизму позволяют рассматривать фетальные нервные клетки (ФНК) как один из перспективных препаратов клеточной терапии [А. Dimitrov, 2013]. Однако отсутствуют данные об изменении экспрессии гена *ido* в ФНК после криоконсервирования.

Цель исследования – изучить уровень экспрессии гена *ido* в адгезивной и неадгезивной фракциях нативных и криоконсервированных ФНК.

Материалы и методы. Эксперименты выполняли на ФНК мышей линии СВА 14 суток гестации. Клетки криоконсервировали с 10% ДМСО по следующей программе: охлаждение со скоростью 1 град/мин до -9°C , остановка в течение 10 мин, затем охлаждение со скоростью 1 град/мин до -25°C , затем 10 град/мин до -60°C и погружение в жидкий азот. Нативные и криоконсервированные ФНК культивировали *in vitro* в среде DMEM/F12 («Seriva», Германия) при добавлении 15% эмбриональной телячьей сыворотки в чашках Петри с покрытием «BioCoat» Ламинин/Фибронектин («BD Pharmingen», США) при 37°C в течение 48 ч. Для стимуляции экспрессии гена *ido* в культуру ФНК через 24 ч добавляли интерферон- γ (ИФН- γ) («Sigma-Aldrich», США). Экспрессию гена *ido* в общей, адгезивной и неадгезивной суспензиях ФНК оценивали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Показано, что в адгезивной фракции нативных ФНК, обогащенной клетками глии, уровень экспрессии гена *ido* был в 3,8 раза выше по сравнению с неадгезивной. После стимуляции ИФН- γ содержание транскриптов гена *ido* в адгезивной фракции ФНК увеличилось в 12,5 раза, а в неадгезивной – в 7,2 раза. Уровень экспрессии гена *ido* непосредственно после размораживания общей суспензии ФНК вырос в 3,5 раза по сравнению с нативным контролем. Установлено повышение содержания транскриптов гена *ido* при культивировании криоконсервированных ФНК без стимуляции ИФН- γ , причем в адгезивной фракции – в 5,2 раза, в неадгезивной – в 2,3 раза. Стимуляция ИФН- γ криоконсервированных ФНК *in vitro*, как и в нативном материале, способствовала увеличению экспрессии гена *ido*.

Полученные данные свидетельствуют о более высоком уровне экспрессии гена *ido* в адгезивной фракции фетального мозга, обогащенной клетками глии. Использование ИФН- γ , как мощного индуктора экспрессии *ido*, позволит усилить терапевтические свойства ФНК. Криоконсервирование оказывало стимулирующий эффект на уровень экспрессии гена *ido* в ФНК, что может быть предпосылкой успешной реализации иммунокорригирующего потенциала этого материала при аутоиммунных заболеваниях.

Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) is an enzyme contributing to the suppression of T-cell immunity link. Different subpopulations of fetal brain cells have the ability to synthesize IDO. The data on possible correction of immune status of an organism in autoimmune diseases by inhibition of T-cell reactivity of IDO-dependent mechanism allow us to consider fetal nerve cells (FNCs) as one of the promising preparations of cell therapy [A. Dimitrov, 2013]. There is no evidence of change in *ido* gene expression in FNCs after cryopreservation.

The research objective was to study *ido* gene expression in adhesive and non-adhesive fractions of native and cryopreserved FNCs.

Materials and methods. The experiments were performed in FNCs of CBA mice of 14 gestation days. Cells were cryopreserved with 10% DMSO using the following program: cooling with the rate of 1 deg/min down to -9°C , stop during 10 min, then cooling with the rate of 1 deg/min down to -25°C , afterwards 10 deg/min down to -60°C and plunging into liquid nitrogen. Native and cryopreserved FNCs were cultured *in vitro* in DMEM/F12 (Seriva, Germany) supplemented with 15% FBS in Petri dish coated with a BioCoat Laminin/Fibronectin (BD Pharmingen, USA) at 37°C for 48 hrs. To stimulate *ido* gene expression the FNC culture after 24 hrs was supplemented with IFN- γ (Sigma-Aldrich, USA). Expression of *ido* gene in total, non-adhesive and adhesive suspensions of FNCs was assessed by polymerase chain reaction in real time.

Results. It was shown that the adhesive fraction of native FNC enriched with glial cells the *ido* gene expression level was 3.8 times higher than if compared to the non-adhesive one. After stimulation with IFN- γ the *ido* gene transcripts content in the adhesive FNC fraction increased 12.5 times and did 7.2 times in the non-adhesive one. The *ido* gene expression level immediately after freeze-thawing of total FNC suspension increased 3.5 times as compared to the native control. We observed an increase in the content of *ido* gene transcripts when culturing cryopreserved FNCs without stimulation of IFN- γ , moreover in the adhesive and non-adhesive fractions it was 5.2 times and 2.3 times, respectively. Stimulation of *in vitro* cryopreserved FNCs with IFN- γ , the same as in native material, contributed to the increased *ido* gene expression.

Thus, the findings indicate that a higher level of *ido* gene expression is inherent to an adhesive fraction of fetal brain enriched with glial cells. Using IFN- γ as a powerful inducer of *ido* expression will enhance the therapeutic properties of FNCs. Cryopreservation had a stimulating effect on the level of *ido* gene expression in FNCs that might be precondition for the successful implementation of this material immunocorrective potential in autoimmune diseases.

