

Криоконсервирование как фактор модуляции иммунокорректирующего потенциала клеток фетальной печени

А.Ю. ДИМИТРОВ, Е.Д. ЛУЦЕНКО, О.В. ЧЕЛОМБИТКО, М.В. ОСТАНКОВ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation as Modulation Factor for Immune Correcting Potential of Fetal Liver Cells of Different Gestation Terms

A.YU. DIMITROV, YE.D. LUTSENKO, O.V. CHELOMBITKO, M.V. OSTANKOV, A.N. GOLTSEV
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Применение фетального материала получило широкое распространение в лечении аутоиммунных заболеваний (АИЗ). Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) фетальной печени (ФП) благодаря уникальной иммуномодулирующей активности заняли ключевое место в клеточной терапии. Одним из механизмов влияния МСК на иммунные клетки реципиента является синтез фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). Криоконсервирование позволяет не только сохранить биообъект, но и перевести его в качественно новое состояние с характерными изменениями на транскрипционном уровне. Известно, что иммуномодулирующая активность клеток ФП (КФП) после воздействия ультразвуковых температур изменяется и может даже превышать активность нативных клеток. Данные факты обусловили необходимость изучения изменений на молекулярно-генетическом уровне в МСК после процедуры замораживания КФП, что поможет усовершенствовать программы терапевтической аппликации данного материала после криоконсервирования.

Цель исследования – изучение функциональной активности гена *Ido* в КФП разных сроков гестации после криоконсервирования для оценки их терапевтической эффективности при лечении АИЗ.

Объектом исследования были КФП мышей линии СВА/Н. Суспензию клеток получали методом гомогенизации в среде 199 КФП плодов мышей 14 и 18 суток гестации. Криоконсервировали КФП под защитой 10% ДМСО со скоростью замораживания 1°C/мин до –25°C и с последующим погружением в жидкий азот на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины). Оттаивание проводили на водяной бане при 37°C. Экспрессию гена *Ido* в общей суспензии КФП, а также в выделенных на магнитном сортере фракциях CD105⁻ и CD105⁺ (МСК) определяли методом ОТ-ПЦР, детекцию продуктов амплификации проводили на биоанализаторе Agilent 2100 (USA).

Установлены отличия содержания транскриптов гена *Ido* в нативных КФП 15 и 18 суток гестации. Фракция CD105⁺ КФП ранних сроков развития характеризовалась значительно большим содержанием мРНК *Ido* по сравнению с общей суспензией КФП, фракцией CD105⁻, а также с фракциями КФП поздних сроков развития. После криоконсервирования наблюдались изменения в активности транскрипции гена *Ido*. Установлен факт повышения экспрессии гена *Ido* в криоконсервированных КФП поздних сроков гестации. Таким образом, криоконсервирование в зависимости от срока гестации может дифференцированно активировать в МСК ФП экспрессию гена *Ido*. Подобные исследования позволят повысить эффективность лечения АИЗ трансплантацией криоконсервированных МСК.

Application of fetal material is widely used for treatment of autoimmune diseases (AID). Fetal liver (FL) mesenchymal stem cells (MSC) play a key role in cell therapy due to their unique immunomodulatory activity. Indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) synthesis is one of the possible mechanisms how MSC influence the recipient's immune cells. Cryopreservation allows not only to store biological material but to transfer it in qualitatively new state with typical changes at transcriptional level. It is known that immune modulating activity of FL cells (FLC) changes after the influence of ultralow temperatures and can even exceed the activity of untreated cells. These data have stipulated the necessity to study the molecular-genetic changes in MSCs after the cryopreservation of FLC, that might help to improve the programs for therapeutic application of the given material after its cryopreservation.

The research aim was to study the functional activity of *Ido* gene in FLC of different gestation terms after cryopreservation to estimate their therapeutic efficiency during AID treatment.

The research object were FLC of CBA/H mice. Cell suspension was obtained by homogenization of murine fetuses of the 14th and 18th gestation day in medium 199. FLC were cryopreserved under protection of 10% DMSO in the programmable freezer according to the following program: cooling with the rate of 1°C/min down to –25° with following plunging into liquid nitrogen. Thawing was carried-out at 37°C in water bath. Expression of *Ido* gene in total FLC suspension as well as CD105⁻ and CD105⁺ (MSC) fractions separated by immunomagnetic sorting were examined by RT-PCR method, the amplification products were detected using bioanalyzer Agilent 2100 (USA).

Differences of *Ido* gene transcript content of the 14th and 18th gestation day native FLCs were found. CD105⁺ fraction of FLC of early gestation terms had significantly higher *Ido* mRNA content comparing to total FLC suspension, CD105⁻ fraction and the fraction of FLC of later gestation terms. After cryopreservation the changes in the activity of *Ido* gene transcription were observed. The fact of increased *Ido* expression in cryopreserved FLCs of later gestation terms was established. Thus depending on the gestation term cryopreservation can differentially activate *Ido* gene expression in FL MSC. Such studies will allow the improvement of AID treatment efficiency using cryopreserved MSC transplantation.