

Влияние различных концентраций криопротектора ДМСО на уровень экспрессии stemness-генов в стволовых клетках фетальной печени мышей до и после криоконсервирования

П.А. Борисов, А.Ю. Димитров, М.В. Останков, А.Н. Гольцев

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Different DMSO Concentrations on Expression Level of Stemness Genes in Mice Fetal Liver Stem Cells Prior to and after Cryopreservation

P.A. Borisov, A.Yu. Dimitrov, M.V. Ostankov, A.N. Goltsev

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

Криоконсервирование является обязательным этапом использования клеточного материала в клинической практике. Варьирование условий криоконсервирования, включая начальные этапы предобработки криопротектором, может оказывать разное влияние на характеристики биообъекта. Мезенхимальные (МСК) и гемопоэтические (ГСК) стволовые клетки фетальной печени (КФП) широко применяются в клеточной терапии. Плюрипотентность стволовых клеток контролируется рядом транскрипционных факторов, наиболее значимыми из которых являются *Nanog*, *Oct4* и *Sox2*. Анализ состояния stemness-генов может дать понимание принципов функционирования геномного аппарата клеток после криоконсервирования и оптимизировать его существующие протоколы.

Цель исследования – изучить влияние температуры экспозиции и разных концентраций криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) на уровень экспрессии генов *nanog*, *oct4* и *sox2* в стволовых клетках фетальной печени мышей до и после криоконсервирования.

Материалы и методы. Суспензию клеток получали методом гомогенизации фетальной печени 14 и 18 суток гестации мышей линии C57BL. Фракции CD105⁺ (МСК) и CD117⁺ (ГСК) КФП получали методом иммуномагнитного сортирования. К выделенным фракциям при температуре 20 или 4°C добавляли ДМСО, конечная концентрация которого составляла 5 или 10%. Экспозицию клеток в растворе проводили в течение 10 мин при вышеуказанной температуре. Суспензию клеток криоконсервировали на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины) со скоростью 1 град/мин до –25°C с последующим погружением в жидкий азот, отогревали на водяной бане при 37°C. Анализ экспрессии генов *nanog*, *oct4*, *sox2* в субпопуляциях нативных, экспонированных с криопротектором и криоконсервированных клеток проводили методом ОТ-ПЦР анализа (методом $\Delta\Delta Ct$). Результаты обрабатывали статистически по методу Стьюдента с использованием компьютерной программы «Origin».

Результаты исследования показали, что повышение концентрации криопротектора приводило к снижению уровня экспрессии stemness-генов до и после криоконсервирования. Экспозиция с охлажденным криопротектором оказывала меньшее влияние на данный параметр. В клетках, которые замораживали с 10%-м ДМСО, добавленным в среду при температуре 4°C, уровень экспрессии до и после криоконсервирования изменялся в наименьшей степени по сравнению с нативом.

Cryopreservation is a mandatory stage for using cell samples in clinical practice. Varying conditions of cryopreservation, including the initial stages of treatment with cryoprotectant may have different effects on the characteristics of bioobject. Mesenchymal (MSCs) and hematopoietic (HSCs) stem cells of fetal liver (FLC) are widely applied in cell therapy. Pluripotency of stem cells is controlled by a number of transcription factors, the most significant of which are *nanog*, *oct4* and *sox2*. Analysis of the stemness-genes status can give understanding of the functioning of cell genomic apparatus after cryopreservation and optimize the existing protocols.

The research aim was to study the effect of exposure temperature and different concentrations of cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO) on the expression level of *nanog*, *oct4* and *sox2* genes in mice fetal liver stem cells prior to and after cryopreservation.

Materials and methods. The cell suspension was procured by homogenization of C57BL mice fetal liver of 14 and 18 gestation days. CD105⁺ (MSCs) and CD117⁺ (HSCs) fractions of FLCs were obtained by immunomagnetic sorting. The extracted fractions were supplemented with DMSO at 20 or 4°C, final concentration of cryoprotectant in the solution was 5 or 10%. Cell exposure in the solution was carried out for 10 min at the stated temperatures. Cell suspension was cryopreserved using the programmable freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of IPCC of NAS of Ukraine) with the cooling rate of 1 deg/min down to –25°C and following plunging into liquid nitrogen, then thawed in water bath at 37°C. The expression of *nanog*, *oct4*, *sox2* genes in subpopulations of native cells, those exposed to cryoprotectant and cryopreserved ones was analyzed by RT-PCR (using $\Delta\Delta Ct$). The results were statistically processed by Student's t-test using Origin software.

The results showed that elevated cryoprotectant concentration resulted in a lower expression level of stemness-genes before and after cryopreservation. Exposure with the cooled cryoprotectant had less effect on this parameter. In the cells frozen with 10% DMSO added at 4°C the expression level prior to and after cryopreservation changed in the least degree if compared to the native.

