

Анализ уровня экспрессии генов в криоконсервированных клетках фетальной печени в процессе рекультивирования

П.А. Борисов, А.Ю. Димитров, А.Н. Гольцев

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Analysis of Gene Expression in Cryopreserved Fetal Liver Cells During Reculturing

P.A. Borisov, A.Yu. Dimitrov, A.N. Goltsev

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

Известно, что криоконсервирование – мощный физико-химический стрессорный фактор, который обуславливает структурно-функциональные изменения многих биообъектов, в том числе клеток фетальной печени (КФП). Такого рода модификации могут затрагивать различные уровни регуляции состояния КФП, в частности и геномный, и влиять на терапевтический потенциал биоматериала. Данный феномен должен учитываться при оптимизации протоколов криоконсервирования и применения КФП с целью повышения эффективности лечения различных заболеваний. При этом остается неизученным вопрос влияния факторов криоконсервирования на гены КФП после отогрева, а также динамика изменения их экспрессии в процессе рекультивирования. Поэтому целью данной работы было исследовать уровень экспрессии генов *nanog*, *oct4*, *sox2* и *ido* в КФП в течение 7 суток после криоконсервирования.

Суспензию КФП получали из плодов мышей линии СВА/Н 14-и суток гестации. Криоконсервировали КФП под защитой 10% ДМСО со скоростью охлаждения 1 град/мин до -25°C с последующим погружением в жидкий азот на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины). Отогрев проводили на водяной бане при 41°C . Нативные и криоконсервированные КФП культивировали в среде Iscove с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в чашках Петри при 37°C в течение 7 суток. Экспрессию генов *nanog*, *oct4*, *sox2*, *ido* в КФП определяли методом ПЦР непосредственно после криоконсервирования, через 1 ч, 1, 3 и 7 суток.

В образцах, полученных сразу после криоконсервирования, уровень экспрессии всех указанных генов снижался. Однако при рекультивировании в течение недели направленность изменения и временной промежуток восстановления уровня экспрессии генов *nanog*, *oct4*, *sox2* и *ido* до контрольного были индивидуальны. Полученные данные свидетельствуют о важности временного параметра при терапевтическом использовании криоконсервированных КФП.

Cryopreservation is known to be a powerful physical and chemical stress factor, which causes structural and functional changes in many biological objects, including fetal liver cells (FLCs). These modifications may involve various levels of FLCs state regulation, in particular, genomic as well as affect a therapeutic potential of biomaterial. This phenomenon must be taken into account when optimizing the cryopreservation protocols and FLCs application for increasing the treatment efficiency for various diseases. However, the question about the post-effects of cryopreservation on FLCs genes after thawing has remained unstudied, as well as the dynamics of changes in their expression during re-culturing. Therefore, the aim of this study was to investigate the level of expression of *nanog*, *oct4*, *sox2* and *ido* genes in FLCs within 7 days after cryopreservation.

The FLC suspension was derived from fetuses of CBA/H mice of 14 gestation days. FLCs were cryopreserved under the protection of 10% DMSO at a cooling rate of 1 deg/min down to -25°C followed by an immersion in a liquid nitrogen using a programmable freezer UOP-6 (Special Design and Technical Bureau with Experimental Unit of the IPC&C). Thawing was performed in a water bath at 41°C . Native and cryopreserved FLCs were cultured in Iscove's medium supplemented with 10% fetal bovine serum in Petri dishes at 37°C for 7 days. Expression of *nanog*, *oct4*, *sox2*, *ido* genes in FLCs was examined by PCR directly after cryopreservation, 1 hr, 1, 3 and 7 days later.

In the samples obtained immediately after cryopreservation, the expression rate of all these genes was reduced. However, during one week re-culturing the power of changes and duration of the expression recovery for *nanog*, *oct4*, *sox2* and *ido* genes up to the to control value were specific. The findings suggest the importance of a time parameter in therapeutic use of cryopreserved FLCs.

