

## Влияние криоконсервирования на экспрессию stemness-генов в клетках фетальной печени мышей

П.А. Борисов, А.Ю. Димитров, А.Н. Гольцев, М.В. Останков  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Effect of Cryopreservation on Expression of Stemness-Genes in Mouse Fetal Liver Cells

P.A. Borysov, A.Yu. Dimitrov, A.N. Goltsev, M.V. Ostankov  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

В настоящее время в клеточной и тканевой терапии используются мезенхимальные (МСК) и гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) фетальной печени (ФП). Применение биообъектов в клинической практике предусматривает их криоконсервирование. Самообновление и плюрипотентность стволовых клеток находятся под контролем транскрипционных факторов, из которых наиболее значимыми являются *nanog*, *oct4* и *sox2*. Анализ состояния stemness-генов позволяет раскрыть механизмы функционирования генетического аппарата клетки после замораживания-отогрева, а также оптимизировать существующие протоколы криоконсервирования.

Цель данного исследования – сравнительный анализ изменения экспрессии генов *nanog*, *oct4* и *sox2* в клетках фетальной печени мышей до и после криоконсервирования.

Объектом исследования были клетки ФП мышей линии C57BL. Суспензию клеток получали из гомогената фетальной печени мышей 14 суток гестации в среде 199. Фракции CD105<sup>+</sup> (МСК) и CD117<sup>+</sup> (ГСК) выделяли методом иммуномагнитного сортирования с помощью моноклональных антител к CD105 и CD117 («BD», США). Клетки ФП криоконсервировали под защитой 10% ДМСО на программном замораживателе со скоростью 1 град/мин до –25°C с последующим погружением в жидкий азот. Затем образцы отогревали на водяной бане при 37°C. Жизнеспособность клеток определяли окрашиванием пропидий йодидом. Экспрессию генов *nanog*, *oct4* и *sox2* в нативных и криоконсервированных выделенных фракциях оценивали с помощью РТ-ПЦР.

Показано, что используемый метод выделения и криоконсервирования позволяет сохранить высокую жизнеспособность клеток. Уровень экспрессии исследуемых генов в суспензии клеток ФП и выделенных фракциях CD105<sup>+</sup> и CD117<sup>+</sup> отличался до и после криоконсервирования.

Таким образом, криоконсервирование влияет на экспрессию stemness-генов в исследуемых фракциях и, следовательно, изменяет функциональное состояние генетического аппарата клетки.

Nowadays mesenchymal (MSCs) and hematopoietic (HSCs) stem cells of fetal liver (FL) are used in cell and tissue therapy. The important part of application of biological objects in clinical practice is cryopreservation. Stem cells self-renewal and pluripotency are controlled by transcription factors, the most principal are *nanog*, *oct4* and *sox2*. The analysis of stemness-genes state could clear up the principles of cell genomic apparatus functioning after cryopreservation, and improve existing cryopreservation protocols. The aim of research was to carry out a comparative analysis of changes in the expression of *nanog*, *oct4* and *sox2* genes in mouse fetal liver cells before and after cryopreservation.

Fetal liver cells from C57BL mice were the research object. Cell suspension was obtained by homogenization of mouse fetal livers in 199 medium at the 14<sup>th</sup> day of gestation. Fractions CD105<sup>+</sup> (MSCs) and CD117<sup>+</sup> (HSCs) were separated by immunomagnetic sorting using monoclonal antibodies to CD105 and CD117 (BD, USA). Fetal liver cells were cryopreserved under protection of 10% DMSO with a programmed freezer with 1 deg/min cooling rate down to –25°C and then immersed into liquid nitrogen. After storage the samples were thawed in a water bath at 37°C. Cell viability was assayed by propidium iodide staining. Gene expression in isolated fresh and cryopreserved cell subpopulations was estimated by RT-PCR.

It has been shown, that the used method of isolation and cryopreservation allowed to preserve a high cell viability. The expression of target genes in fetal liver suspension and its isolated fractions was different before and after cryopreservation.

Thus, cryopreservation affected the expression of stemness-genes in the studied fractions and therefore changed the functional state of genetic apparatus of a cell.

