

УДК 57.043.08:615.361.36.013.014.41

А.Н. Гольцев*, А.Ю. Димитров, Ю.А. Гаевская,
Т.Г. Дубрава, Н.Н. Бабенко, Е.Д. Луценко, М.В. Останков

Экспрессия гена *ido* в мезенхимальных стволовых клетках фетальной печени после криоконсервирования

UDC 57.043.08:615.361.36.013.014.41

A.N. Goltsev*, A.Yu. Dimitrov, Yu.A. Gayevskaya,
T.G. Dubrava, N.N. Babenko, E.D. Lutsenko, M.V. Ostankov

Expression of *ido* Gene in Fetal Liver Mesenchymal Stem Cells Following Cryopreservation

Реферат: Изучены функциональные характеристики, в частности уровень экспрессии гена *ido*, в мезенхимальных стволовых клетках (МСК) фетальной печени (ФП) разного срока гестации до и после воздействия факторов криоконсервирования. Установлено снижение уровня экспрессии гена *ido* по мере гестации ФП. После криоконсервирования уровень экспрессии гена *ido* в клетках ФП 18 суток гестации существенно повышался, превосходя таковой в нативном материале 14- и 18-х суток гестации. Данный факт свидетельствует о способности криоконсервирования реализовывать «ревитализирующий» эффект в отношении клеток ФП поздних сроков гестации. Таким образом, криоконсервирование может быть использовано как способ специфического повышения иммуномодулирующей активности МСК.

Ключевые слова: фетальная печень, мезенхимальные стволовые клетки, криоконсервирование, индоламин 2,3-диоксигеназа, ген *ido*.

Реферат: Вивчено функціональні характеристики, зокрема рівень експресії гена *ido*, в мезенхімальних стовбурових клітинах (МСК) фетальної печінки (ФП) різного терміну гестації до та після впливу факторів криоконсервування. Встановлено зниження рівня експресії гена *ido* протягом гестації ФП. Після криоконсервування рівень експресії гена *ido* в клітинах ФП 18 діб гестації істотно підвищувався, перевищуючи такий у нативному матеріалі 14- та 18-ї доби гестації. Даний факт вказує на здатність криоконсервування реалізовувати «ревіталізуючий» ефект щодо клітин ФП пізніх строків гестації. Таким чином, криоконсервування може бути використано як спосіб специфічного підвищення імуномодулюючої активності МСК.

Ключові слова: фетальна печінка, мезенхімальні стовбурові клітини, криоконсервування, індоламін 2,3-діоксигеназа, ген *ido*.

Abstract: The study was conducted to assess the effect of gestation term and cryopreservation factors on some functional parameters of mesenchymal stem cells (MSCs) in fetal liver (FL), in particular, *ido* gene expression rate. Expression rate of *ido* gene was decreased between 14th to 18th days of FL gestation. Following cryopreservation the expression rate of *ido* gene in FL cells of 18th gestation day increased significantly, and this level exceeded significantly the one in non-frozen samples of the 14th and 18th gestation day. This fact emphasizes the ability of cryopreservation to implement the 'revitalizing' effect in respect of FL cells of late gestation terms. Thus, cryopreservation can be used as the method of specific enhancing of MSCs immune modulating activity.

Key words: fetal liver, mesenchymal stem cells, cryopreservation, indoleamine 2,3-dioxygenase, *ido* gene.

Клеточная и тканевая терапия с использованием продуктов фетоплацентарного комплекса (ПФПК) применяется при лечении различных патологических состояний организма [2, 4, 22, 23]. Криоконсервирование – один из обязательных этапов применения ПФПК в клинической практике. Данная процедура позволяет хранить и использовать биоматериал по мере его востребованности [4]. Вместе с тем остаются нерешенными многие вопросы, касающиеся механизмов многовекторного влияния физико-химических факторов криоконсервирования на ПФПК, от успеха которого

Cell and tissue-based therapy, in particular using fetal and placental products (FPP), is applied in the treatment of various pathological conditions [15, 16, 18, 21]. Cryopreservation is one of the mandatory steps of FPP application in clinical practice. This procedure allows to store and to utilize the biological specimens on demand [21]. However, many questions concerning the mechanisms of diverse influence on the FPP of physical and chemical factors of the cryopreservation, which success is associated with functional adequacy of the biological specimen, have remained open [16, 21].

Отдел криопатофизиологии и иммунологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-57-89, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: cryopato@rambler.ru

Поступила 21.01.2014
Принята в печать 05.02.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №1. – С. 16–27.
© 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 5789, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: cryopato@rambler.ru

Received January 21, 2014
Accepted February 5, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(1): 16–27.
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

зависит функциональная полноценность биообъекта [4, 23].

Воздействие низких температур на различные структуры клеток, включая их генетический аппарат, определяет необходимость аттестации структурно-функциональных характеристик криоконсервированных образцов перед их использованием в клинической практике, в том числе клеток фетальной печени (КФП). Прежде всего, речь идет о мезенхимальных стволовых клетках (МСК) фетальной печени, структурные и функциональные характеристики которых в процессе эмбриогенеза существенно изменяются [1, 3, 4], что предполагает их различную криочувствительность [20]. Как правило, низкотемпературному консервированию подвергаются МСК, полученные путем серийной экспансии *in vitro* [40]. Данная процедура сама по себе является критическим фактором, влияющим на функциональную полноценность МСК, поскольку истощает их мультилинейный дифференцировочный потенциал [11, 14], снижает способность к хомингу и некоторые другие функции [37], что, безусловно, может быть связано с изменением структурной организации данных клеток, а, следовательно, и их криоустойчивости. В некоторых исследованиях показано, что однократный цикл замораживания-отогрева с использованием постоянной низкой скорости охлаждения и диметилсульфоксида (ДМСО) в качестве криопротектора не оказывал существенного влияния на морфологию, кариотип, рецепторный репертуар и мультипотентный дифференцировочный потенциал МСК [10, 33]. В этих экспериментах жизнеспособность клеток оценивали сразу после отогрева. Y. Naaldijk и соавт., используя МТТ-тест, провели сравнительную оценку жизнеспособности МСК, криоконсервированных под защитой ДМСО в различной концентрации (1–10%), непосредственно после отогрева и 3-х суток культивирования [35]. В первом случае статистически значимые различия в жизнеспособности МСК между группами с вариацией концентрации криопротектора отсутствовали (около 80% жизнеспособных клеток), однако во втором случае (после 3-х суток культивирования) высокая жизнеспособность сохранялась только у МСК, криоконсервированных с 7–10%-м ДМСО. При более низких концентрациях ДМСО (менее 4%) наблюдалась гибель клеточных культур. Также показано, что у выживших МСК усиливался остеогенный потенциал независимо от концентрации ДМСО и скорости охлаждения [35].

Ранее нами было отмечено, что сохранность колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) костного мозга (КМ) зависит от вида используемого криопротектора [5]. Так, после криоконсервирования клеток КМ под защитой 10% ДМСО со-

Effects of low temperature exerted on different cell structures, including their genetic apparatus, determine the need in assessment of structural and functional characteristics of cryopreserved samples, including fetal liver cells (FLCs), as a promising object for clinical applications. First of all, this concerns fetal liver mesenchymal stem cells (MSCs), which structural and functional characteristics vary significantly during embryogenesis [17, 19, 21], suggesting their different cryosensitivity [12]. Typically, low temperature preservation involves MSCs obtained by serial expansion *in vitro* [40]. The procedure itself is a critical factor affecting the functional values of MSCs as it exhausts their multilineal differentiation potential [2, 5], reduces the ability for homing and some other functions [37] that can certainly be associated with the changes in structural organization of these cells and, consequently, their cryostability. Several investigations revealed that single cycle of freeze-thawing using constant low cooling rate and dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotectant had no significant effect on morphology, karyotype, receptor repertoire and multipotent differentiation potential of the MSCs [1, 33]. In these experiments, the cell viability was assessed immediately after thawing. Using MTT test Naaldijk *et al.* assessed the viability of MSCs cryopreserved under the protection of DMSO in different concentrations (1–10%), and compared the indices obtained immediately after thawing and post 3 days of culture [35]. In the first case, there were no statistically significant differences in the viability of MSCs between the groups with varying concentrations of cryoprotectant (about 80% of cells were considered as viable), but in the second case (post 3 days of culture) a high viability of MSCs was found only if the cells were cryopreserved with 7–10% DMSO. Moreover if concentrations of DMSO were very low (less than 4%), the cell cultures died. It was also shown that survived MSCs exhibited higher osteogenic potential regardless of DMSO concentration and cooling rate [35].

Previously we noted that the post-thaw survival of fibroblast colony forming units (CFUf) of bone marrow (BM) depended on the type of cryoprotectant used [22]. For example, after the cryopreservation of BM cells under protection of 10% DMSO the survival of CFUf decreased by 50%, whereas in the case of 10% PEO-400 the index was 85%. Furthermore, cryopreservation with the same cooling rate (1 deg/min down to -25°C with following plunging into liquid nitrogen), but various concentrations of DMSO (5 and 10%) resulted in rearrangement of populations with the phenotypic characteristics of MSCs ($\text{CD73}^+\text{CD105}^+$) in thawed suspension of CBA/H mice BM [21]. A relative content of cells carrying MSCs markers increased 2.8 times if 5% DMSO was used (in case of 10% DMSO no changes were found), however, their colony-



хранность КОЕф по тесту колониеобразования снизилась на 50%, тогда как после использования 10% ПЭО-400 – на 85%. Более того, криоконсервирование с одной и той же скоростью охлаждения (1 град/мин до -25°C с последующим погружением в жидкий азот), но различной концентрацией ДМСО (5 и 10%) по-разному изменяло содержание клеток с фенотипическими характеристиками МСК ($\text{CD73}^+\text{CD105}^+$) в отогретой суспензии КМ мышей линии СВА/Н [4]. Отмечено увеличение относительного содержания клеток с маркерами МСК в 2,8 раза при использовании 5% ДМСО (в случае 10% ДМСО такого не наблюдалось), при этом их колониеобразующая способность была ниже, чем в образцах до замораживания-отогрева, а также ниже, чем в образцах, криоконсервированных под защитой 10% ДМСО. Эти результаты свидетельствуют о возможности с помощью некоторых режимов криоконсервирования существенно изменять функциональные характеристики МСК.

Оптимизация протокола замораживания с использованием рассчитанных коэффициентов проницаемости клеточных мембран для молекул воды и криопротектора позволила создать эффективный многоступенчатый протокол охлаждения стволовых клеток кордовой крови [38]. Использование этого же протокола для МСК амниотической жидкости дало возможность сохранить после отогрева клеток их морфологию, кариотип, рецепторный репертуар, мультипотентный дифференцировочный потенциал и экспрессию генов *sox2* и *nanog* на уровне нативного контроля [10]. Получены аналогичные данные о неизменности уровня экспрессии генов самоподдержания (*oct4*, *nanog*, *sox2*, *rex1*), даже после многократного замораживания-отогрева МСК с использованием того же метода [32].

Изучение экспрессии генов, отвечающих за синтез некоторых ростовых факторов, в частности VEGF и PDGF, в деконсервированных фибробластах человека показало повышение содержания соответствующих мРНК [31]. В связи с тем, что VEGF играет важную роль в поддержании гомеостаза клеток и тканей организма [7], повышение его продукции после криоконсервирования может способствовать репарации нелетальных повреждений клеток. Факт активации транскрипции ряда каспаз уже на первые сутки после отогрева криоконсервированных фибробластов [12] позволяет предположить, что гибель не способных к репарации клеток происходит путем апоптоза.

Некоторые исследователи подчеркивают важную роль МСК в реализации иммуномодулирующего воздействия для восстановления иммунной системы, разбалансированной при аутоиммунных заболеваниях [16, 29]. Иммуномодулирующая ак-

forming ability was lower than the level assessed both before freeze-thawing, and in the samples frozen-thawed under 10% DMSO protection. These findings demonstrate the possibility to alter significantly the functional characteristics of MSCs using certain cryopreservation protocols.

Optimization of freezing protocol using the calculated cell membrane permeability coefficients for water and cryoprotectant molecules allowed to develop an effective multistage cooling protocol for cord blood stem cells [38]. Using this protocol for freezing the MSCs of amniotic fluid allowed to preserve post-thaw morphology, karyotype, receptor repertoire, multipotent differentiation potential, *sox2* and *nanog* gene expression at the level of non-frozen-thawed control [1]. Similar data about the preserved expression level of self-maintenance genes (*oct4*, *nanog*, *sox2*, *rex1*), even after multiple freeze-thawing of MSCs were obtained using the same method [32].

Study of expression of genes involved in the synthesis of certain growth factors, in particular, VEGF and PDGF, in thawed human fibroblasts showed an elevated levels of correspondent mRNA [31]. Due to the fact that VEGF plays an important role in maintaining homeostasis of cells and tissues [28], increasing of its production after cryopreservation may facilitate repair of non-lethal damages of cells. The fact that transcription of several caspases was found to activate already to the first day after thawing of fibroblasts [3] suggested that the death of unable to repair cells occurred by apoptosis.

Some researchers emphasize the important role of MSCs in the implementation of the immunomodulatory effects to recover the immune system, affected during autoimmune diseases [7, 29]. Immunomodulatory activity of MSCs is associated with *ido* gene, responsible for the synthesis of the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) [34, 36]. The key role of IDO was shown in the launch of kinurenine pathway of tryptophan catabolism and the formation of its decomposition products such as kinurenic, quinolone, picolone and 3-hydroxyanthranilic acids [27]. These tryptophan catabolites possess the capability to activate the suppressive link of immunity, particularly, regulatory T cells [11]. Moreover, a growing interest has been noted recently in studying the role of *ido* gene and tryptophan metabolites in the regulation of MSCs' proliferation process [6].

It is obvious that the expression level of the *ido* gene, responsible for immunomodulatory function of fetal liver MSCs can serve as a prognostic criterion for functional adequacy of cryopreserved specimens in the treatment of various pathologies [15, 16, 18, 21]. Previously, we have found the changes in the pattern of *ido* gene expression in the MSCs if fetal liver gestation terms were different [17]. Considering that



тивность МСК ассоциируется с геном *ido*, ответственным за синтез фермента индоламин 2,3-диоксигеназы (ИДО) [34, 36]. Показана ключевая роль ИДО в запуске кинуренинового пути катаболизма триптофана и формировании продуктов его распада в виде кинуреновой, квинолиновой, пиколиновой и 3-гидроксиантралиновой кислот [28]. Данные катаболиты триптофана обладают способностью активировать супрессорное звено иммунитета, в частности регуляторные Т-клетки [19]. Более того, в последнее время возрос интерес к изучению роли гена *ido* и метаболитов триптофана в регуляции процесса пролиферации МСК [15].

Очевидно, что уровень экспрессии гена *ido*, ответственного за иммуномодулирующую функцию МСК фетальной печени, может служить прогностическим критерием функциональной полноценности криоконсервированного материала при лечении различных патологий [2, 4, 22, 23]. Ранее нами был установлен факт изменения характера экспрессии гена *ido* в МСК по мере пролонгации сроков гестации фетальной печени [1]. Учитывая, что криоконсервирование – обязательный этап использования МСК в клинической практике, актуально исследование функциональной полноценности деконсервированного материала. В связи с вышеизложенным целью данной работы была оценка уровня экспрессии гена *ido* в МСК фетальной печени мышей до и после криоконсервирования.

Материалы и методы

Объектом исследования были общая суспензия КФП мышей линии СВА/Н и фракции КФП с фенотипическими признаками МСК. Выделяли КФП из эмбрионов на 14-й (КФП-14) и 18-й (КФП-18) посткоитальный день.

Работу выполняли в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Получение суспензии КФП. Выделенную из эмбрионов фетальную печень дезинтегрировали в гомогенизаторе Поттера в среде 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Россия) с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки («БиолоТ», Россия) и 2%-го цитрата натрия (далее в тексте – рабочая среда) с последующим пропусканием через капроновый фильтр.

Фенотипический анализ КФП осуществляли на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США), используя моноклональные антимышьи антитела к мембранным

cryopreservation is a mandatory step of using MSCs in clinical practice, an assessment of functional features of thawed samples is relevant. Thereby, the aim of this study was to evaluate the level of *ido* gene expression in murine fetal liver MSCs before and after cryopreservation.

Materials and methods

The study was performed in total suspension of FLCs from CBA/H mice and FLC fractions with phenotypic features of MSCs. The FLCs were isolated from embryos at the 14th (FLC-14) and 18th (FLC-18) post-coital day.

The experiments were carried out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 3rd National Congress on Bioethics (Kiev, 2007) and consistent with the regulations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Procurement of FLC suspension. Fetal liver isolated from embryos was disintegrated in a Potter homogenizer in medium 199 (Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russia) supplemented with 10% fetal bovine serum (BioloT, Russia) and 2% sodium citrate (hereinafter, the handling medium), the suspension was thereafter passed through a nylon filter.

Phenotypic analysis of FLCs was performed with FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA) using anti-mouse monoclonal antibodies to the MSCs membrane markers CD73 (FITC) and CD105 (PE) (BD Biosciences, USA) according to manufacturer's instructions. As a control served the samples supplemented with non-immune FITC and PE conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences) of the same isotype as the antibodies to the studied marker. Statistical analysis of cytofluorimetric data was performed using WinMDI 2.8.

Evaluation of the MSCs functional capacity. Content of CFUf, which correlates with the content of MSCs [7], was determined by *in vitro* culturing of FLCs with seeding density of 1×10^4 cells/cm² in the presence of irradiated (5 Gy) guinea pig BM feeder cells (2×10^5 cells/cm²) [13]. Culturing was performed in a CO₂ incubator at 37°C in 3 cm glass Petri dishes during 14 days in the Iscov's medium (Sigma, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum. To the 14th day, the number of colonies containing at least 50 cells was determined using the light microscope (LOMO, MIKMED-2, $\times 20$).

Isolation of MSCs by immunomagnetic sorting. The MSCs fraction was procured from the FLCs by positive selection using magnetic sorter (BD ImagnetTM, USA) and CD105 Multisort Kit (Miltenyi Biotec, USA) according to the manufacturer's protocol. It has been shown that the cells with CD105⁺ phenotype selected



маркерам МСК CD73 (FITC) и CD105 (PE) («BD Biosciences», США) согласно инструкции производителя. В качестве контроля использовали пробы с добавлением неиммунных конъюгированных с FITC и PE моноклональных антител («BD Biosciences») того же изотипа, что и антитела к исследуемому маркеру. Статистический учет цитофлуориметрических данных осуществляли с помощью программы «WinMDI 2.8».

Оценка функционального потенциала МСК. Содержание КОЕф, которое коррелирует с содержанием МСК [16], определяли при культивировании КФП *in vitro* с плотностью эксплантации 1×10^4 кл/см² в присутствии облученных (5 Гр) фидерных клеток КМ (2×10^5 кл/см²) морской свинки [8]. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C в стеклянных чашках Петри ($d = 3$ см) в течение 14 суток в среде Iscov's («Sigma», США) с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки. На 14-е сутки в световом микроскопе (ЛОМО, «МИКМЕД-2», $\times 20$) определяли количество колоний, содержащих не менее 50 клеток.

Выделение МСК методом иммуномагнитного сортирования. Фракцию МСК получали из КФП методом позитивной селекции с использованием магнитного сортера («BD Imagnet™», США) и «CD105 Multisort Kit» («Miltenyi Biotec», США) согласно протоколу производителя. Было показано, что выделенные таким образом клетки с фенотипом CD105⁺ под действием специфических индукторов *in vitro* обладали способностью к дифференцировке в остео- и адипогенном направлениях, что подтверждало их принадлежность к МСК [17, 24, 26].

Криоконсервирование КФП. Раствор для криоконсервирования КФП представлял собой рабочую среду с добавлением 20% ДМСО (АО «Галичфарм», Украина). К полученной на рабочей среде общей суспензии КФП и выделенным на магнитном сортере фракциям по каплям добавляли раствор для криоконсервирования в соотношении 1:1 при температуре 22°C в течение 2–3 мин (конечная концентрация криопротектора составила 10%). Экспозицию клеток в растворе проводили в течение 10 мин при той же температуре. Охлаждение КФП осуществляли на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины) по двухэтапной программе со скоростью 1 град/мин до –25°C с последующим погружением в жидкий азот (–196°C) [4]. Общую суспензию КФП с концентрацией 2×10^6 кл/мл и объемом 1,8 мл замораживали в пластиковых ампулах («Nunc», Германия), а выделенные на магнитном сортере фракции объемом 30 мкл и той же концентрацией клеток – в соломинках ($d = 0,25$ мм). Образцы

in such a way possessed the ability for induced *in vitro* differentiation into osteo- and adipogenic directions, suggesting that they belong to the MSCs [8, 20, 25].

Cryopreservation of FLCs. Solution for FLCs cryopreservation was the handling medium supplemented with of 20% DMSO (Galichfarm, Ukraine). The total suspension of FLCs in handling medium as well as the fractions separated by magnetic sorter were dropwise mixed with cryopreservation solution up to the 1:1 ratio at the temperature of 22°C for 2–3 minutes (the final cryoprotectant concentration was 10%). The cells were incubated in the solution for 10 minutes at the stated temperature. Cooling of FLCs was performed in UOP-6 programmable freezer (Special Design and Technical Bureau of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) by two steps: with a rate of 1 deg/min down to –25°C, and then the samples were plunged into liquid nitrogen (–196°C) [21]. Samples of FLCs total suspension with concentration of 2×10^6 cells/ml and a 1.8 ml volume were frozen in plastic vials (Nunc, Germany) and isolated by a magnetic sorter fractions of 30 μ l and with the same concentration of cells were processed in straws ($d = 0.25$ mm). Samples were warmed in a water bath at a temperature of 40...41°C until disappearance of the solid phase, regardless of the type of container. Cells were once washed to remove DMSO by dropwise addition of an equal volume of handling medium and subsequent centrifugation (200 g, 10 min). Cell suspension after isolation, as well as the fractions of cells after immunomagnetic sorting which were not subjected to freeze-thawing would be defined hereinafter as native ones.

Assessment of ido gene expression level. Ido gene expression in total suspension and isolated CD105⁺ fraction of FLCs was assessed by polymerase chain reaction with reverse transcription within one hour after thawing [24]. Total RNA was isolated using the Diatom RNA Prep 100 kit (Isogene Lab, Russia) from 1×10^5 cells of each sample. The resulting nucleic acid mixture was treated with DNAase I according to the manufacturer's instructions (Synthol, Russia). Reverse transcription reaction was performed using random-oligonucleotides and reverse transcriptase (M-Mlv) (Reverte L, R&D Institute of Epidemiology, Russia). Primers to the test gene were constructed using the GenBank database (NCBI BLAST, USA): ido NM_008324.1 (fragment length 342 bp) and synthesized by Medbioservis CJSC (Ukraine). Amplification products were detected by capillary electrophoresis bioanalyzer (Agilent 2100, USA) [23, 24].

The data were statistically processed by the Student's method using a MS Excel software. Data are shown as mean \pm standard deviation. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.



отогревали на водяной бане при температуре 40...41°C до исчезновения твердой фазы независимо от типа контейнера. Клетки однократно отмывали от ДМСО путем по капельного добавления равного объема рабочей среды и последующего центрифугирования (200g, 10 мин). Суспензии клеток после выделения, а также фракции клеток после иммуномагнитного сортирования, не подвергавшиеся процедуре замораживания-отогрева, далее будем называть нативными.

Определение уровня экспрессии гена ido. Уровень экспрессии гена *ido* в общей и выделенной CD105⁺-фракции КФП оценивали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в течение часа после размораживания [9]. Общую РНК выделяли с помощью набора «Diatom RNA Prep 100» («Isogene Lab», Россия) из 1×10⁵ клеток каждого образца. Полученную смесь нуклеиновых кислот обрабатывали ДНК-азой I согласно инструкции производителя (ООО «Синтол», Россия). Для реакции обратной транскрипции использовали гандом-олигонуклеотиды и ревертазу (M-Mlv) («Реверта L», НИИЭ МЗ РФ). Праймеры к исследуемому гену были сконструированы на основе базы данных «GenBank» (NCBI BLAST, США): *ido* – NM_008324.1 (длина фрагмента 342 пар нуклеотидов) и синтезированы в АОЗТ «Медбиосервис» (Украина). Продукты амплификации определяли методом капиллярного электрофореза в биоанализаторе («Agilent 2100», США) [9, 25].

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента с применением компьютерной программы MS Excel. Данные приведены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В связи с противоречивостью данных о воздействии криоконсервирования на генетический профиль различных клеток [10, 21, 24] необходимо было изучить характеристики криоконсервированных препаратов фетального происхождения, используемых в клинической практике. Особое внимание при этом уделяется мезенхимальным клеткам фетальных тканей, паттерн экспрессии определенных генов в которых изменяется по мере пролонгации сроков гестации [1].

Известно, что ИДО – фермент, инициирующий окислительную деградацию *L*-триптофана по кинурениновому пути. Клетки, экспрессирующие ИДО, а также метаболиты триптофана вовлечены в индукцию иммунной толерантности при различных физиологических и патологических условиях, включая инфекционные заболевания, беременность, трансплантацию, нейропатологию, воспали-

Results and discussion

The data on the effects of cryopreservation on the genetic profile of a variety of cells are quite contradictory [1, 14, 20], so it is still extremely important to examine the changes in the characteristics of cryopreserved medicinal products of fetal origin used in clinical practice. Particular attention should be paid to the mesenchymal cells of fetal tissues, in which the pattern of expression of certain genes changes during gestation [17].

The IDO is known as enzyme initiating oxidative degradation of *L*-tryptophan at kinurenine pathway. Cells expressing IDO, as well as tryptophan metabolites are involved in the induction of immune tolerance under various physiological and pathological conditions, including infectious diseases, pregnancy, transplantation, neuropathology, inflammatory and autoimmune disorders. Normally, IDO is actively expressed in most organs and tissues including chorion, placenta, decidua [29]. During pregnancy these cells create the micro-environment, able to produce IDO, which prevents the activation of maternal T cells against the fetus allo-antigens. Serum tryptophan level is decreased at the third trimester of pregnancy as placenta develops and grows.

Considering the above mentioned, not surprising was the fact that *ido* gene expression in FLCs was reduced as gestation term increased, *i. e.* from 14 to 18 days of embryonic development (Fig. 1). It should be noted that the reductions of this index in the total suspension, and in the selected CD105⁺ cell fractions of native samples were quite the same (1.7 to 1.8 times).

Evaluation of the *ido* gene transcripts post-thaw content both in total suspension and in CD105⁺ cell fractions showed that changes of its expression in FLC-14 and FLC-18 had opposite directions. Total suspension of cryopreserved FLC-14 (cFLC-14) had 5 times reduction of *ido* gene transcripts, while cryopreserved FLC -18 (cFLC-18) a 2.5-fold increase if compared to the native control. The same tendency was revealed in isolated fractions of cryopreserved CD105⁺ cells. In cFLC-14 the *ido* gene transcripts content decreased 2.33 times, and in cFLC-18 it was 2.8-fold increased.

The inhibitory effect of cryopreservation on *ido* gene expression in FLC-14 coincides with the findings reported by Francois *et al.* [12]. It was shown that the *ido* gene mRNA expression level was approximately 4 times lower after thawing MSCs if compared with non-frozen cells and the restoration of the level occurred only following 24-hour-long culture. Moreover, the thawed MSCs had a gradual increase in expression of heat shock proteins (HSP), Hsp70, with maximum to the 8th hour post thaw, and returned to baseline (Hsp70 mRNA expression level immediately after thawing) also after 24 hrs. These data allowed to sug-



тельные и аутоиммунные нарушения. В нормальных условиях ИДО экспрессируется в большинстве органов и тканей, в том числе и в хорионе, плаценте, децидуальной оболочке [29]. При беременности эти клетки создают микроокружение, способное к продукции ИДО, что препятствует активации материнских Т-клеток относительно аллоантигенов плода. Уровень триптофана в сыворотке крови снижается к третьему триместру беременности по мере развития и роста плаценты.

В соответствии с вышесказанным неудивительным является факт снижения уровня экспрессии гена *ido* в КФП по мере гестации с 14-х по 18-е сутки развития эмбриона (рис. 1). При этом кратность уменьшения данного показателя в общей суспензии и выделенной фракции CD105⁺-клеток в нативных образцах была примерно одинаковой (в 1,8–1,7 раза).

Результаты оценки содержания транскриптов гена *ido* после криоконсервирования как общей суспензии, так и фракции CD105⁺-клеток продемонстрировали противоположную направленность изменения его экспрессии в КФП-14 и КФП-18. В общей суспензии криоконсервированных КФП-14 (кКФП-14) содержание транскриптов гена *ido* снижалось в 5 раз, при этом в криоконсервированных КФП-18 (кКФП-18) – повышалось в 2,5 раза по сравнению с нативным контролем. Такая же тенденция сохранялась в выделенных криоконсервированных фракциях CD105⁺-клеток. В кКФП-14 содержание транскриптов гена *ido* снижалось в 2,33 раза, а в кКФП-18 – повышалось в 2,8 раза.

Факт ингибирующего влияния криоконсервирования на экспрессию гена *ido* в КФП-14 подтвержден данными М. Francois и соавт. [20]. Так было показано, что уровень экспрессии мРНК гена *ido* снижался сразу после размораживания МСК примерно в 4 раза и восстанавливался только через 24 ч культивирования. При этом в деконсервированных МСК постепенно повышалась экспрессия белков теплового шока (БТШ) – Hsp70, достигая максимума к 8-му часу после отогрева, и возвращалась к исходному уровню (величине экспрессии мРНК Hsp70 непосредственно после отогрева) также через 24 ч. Эти данные позволили предположить, что криоконсервирование временно ингибирует иммуносупрессивные свойства МСК в ответ на повышенную экспрессию БТШ [27]. Интересно, что через 24 ч культивирования в ответ на стимуляцию интерфероном гамма (ИФН γ) отмечено восстановление экспрессии фермента ИДО в криоконсервированных МСК.

Важно установить, насколько синхронизированы изменения экспрессии гена *ido* с изменениями количественного содержания и функции МСК в фетальной печени на разных сроках гестации, а также

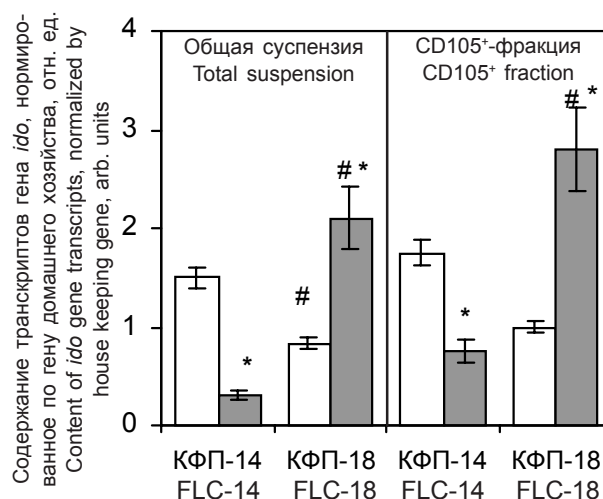


Рис. 1. Полуколичественный анализ экспрессии гена *ido* в общей суспензии КФП и CD105⁺-фракции: □ – до замораживания; ■ – после замораживания и отогрева; * – различия достоверны по отношению к соответствующему нативному контролю; # – по отношению к кКФП-14 ($p < 0,05$).

Fig. 1. Semiquantitative analysis of *ido* gene expression in total FLC suspension and in CD105⁺ fraction: □ – before freezing; ■ – after freeze-thawing; * – differences are significant if compared with corresponding native control; # – if compared with cryopreserved FLC-14 ($p < 0.05$).

gest that cryopreservation inhibited temporarily the immunosuppressive properties of MSCs in response to increased expression of HSPs [28]. Interestingly, that after 24 hours of culture, a stimulation with interferon gamma (IFN γ) resulted in recovery of the IDO enzyme expression in cryopreserved MSCs.

It is important to realize, what is a coincidence of *ido* gene expression changes with those in quantity and function of MSCs in fetal liver of different gestation terms and after cryopreservation? Receptor repertoire of MSCs is the primary when determining their functional status. Processes of self-renewal, proliferation and differentiation of MSCs are realized through complex mechanisms of signals perception by membrane receptors, following transduction and activation of intracellular reactions of phosphorylation and dephosphorylation. From the 14th to the 18th day of embryonic development the content of cells with CD73⁺CD105⁺ phenotype in fetal liver and the ability of MSCs to form colonies *in vitro* increased (2.6 times and 1.5 times, respectively) together with inhibition of *ido* gene expression. In other words, the changes of structural and functional characteristics of MSCs of fetal liver during gestation are inversely related to the degree of *ido* gene expression.

Post-thaw content of CFUF in cFLC-14 decreased by almost 2 times, whereas the content of CD73⁺CD105⁺ cells did not change (Fig. 2). That is, inhi-



после криоконсервирования? Рецепторный репертуар МСК является основным критерием при определении их функционального статуса. Процессы самообновления, пролиферации и дифференцировки МСК реализуются через сложные механизмы акцепции сигналов мембранными рецепторами с последующей трансдукцией и активацией внутриклеточных реакций фосфорилирования и дефосфорилирования. С 14-х по 18-е сутки развития эмбриона содержание клеток с фенотипом CD73⁺CD105⁺ в фетальной печени и способность МСК формировать колонии *in vitro* увеличивались (в 2,6 раза и 1,5 раза соответственно) на фоне ингибирования экспрессии гена *ido*. Другими словами, изменение структурных и функциональных характеристик МСК фетальной печени по мере гестации находится в обратной зависимости от степени экспрессии гена *ido*.

После криоконсервирования относительное содержание КОЕф в кФП-14 снижалось почти в 2 раза, тогда как содержание CD73⁺CD105⁺-клеток не изменялось (рис. 2). Таким образом, в кФП-14 ингибирование экспрессии гена *ido* коррелировало только со снижением колониеобразующей активности МСК. Интересно, что в кФП-18 повышение уровня экспрессии гена *ido* сопровождалось ингибированием в 1,6 раза способности МСК к колониеобразованию и снижением в 1,85 раза относительного содержания CD73⁺CD105⁺-клеток. В этом случае речь может идти о селективной элиминации МСК, а также о шеддинге рецепторов, определяющих их фенотипические признаки [4].

Таким образом, после криоконсервирования в суспензии кФП-18, содержание транскриптов гена *ido* превышало таковой как в нативных кФП-18, так и кФП-14. Следовательно, криоконсервирование проявляло селективный «ревитализирующий» эффект относительно гена *ido* в кФП-18. Видно, что экспрессия гена *ido* после криоконсервирования была более выражена в выделенной фракции CD105⁺-клеток, чем в общей суспензии кФП.

Как упоминалось выше, МСК способны реализовать свою иммуномодулирующую активность при участии фермента ИДО [34, 36], который активирует кинурениновый путь катаболизма триптофана с формированием каскада конечных продуктов (кинурениновой, квинолиновой, пиколиновой

bition of *ido* gene expression in FLC-14 correlated only with a reduction of MSCs colony forming ability. Interestingly, that the cFLC-18 had an increase in *ido* gene expression accompanied by 1.6 times inhibition of MSCs colony forming ability and 1.85 times decrease in the relative content of CD73⁺CD105⁺ cells. In this case, we could suppose the selective elimination of MSCs, or the shedding of receptors that determine their phenotype [21].

Thus, the post-thaw *ido* gene transcripts content in FLC-18 suspension exceeded those in the FLC-18 and FLC-14 prior to freezing. Therefore, cryopreservation exhibited a selective revitalizing effect on *ido* gene in FLC-18. It is evident that *ido* gene expression after cryopreservation was more pronounced in the separated CD105⁺ cell fraction than in total FLC suspension.

As it was mentioned above, the MSCs could implement their immunomodulatory activity by means of the IDO enzyme [34, 36], activating kinurenine pathway of tryptophan catabolism and results in appearance of terminal products (kinurene, quinolic, picolinic acids), responsible for the regulation of T cell tolerance [36]. Synthesis of IDO is controlled by a number of inflammatory cytokines: IL-1, TNF α , IFN γ [6]. Interferons are widely used in medical practice as anticancer, antiviral and immunomodulatory agents, although the exact mechanism of their antiproliferative activity is not fully understood. Nevertheless, through the understanding of the interferones' antiproliferative effect mechanism

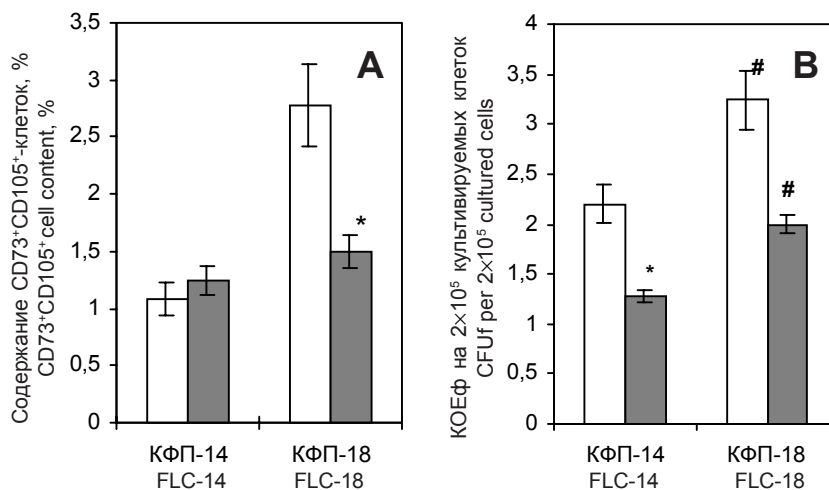


Рис. 2. Содержание CD73⁺CD105⁺-клеток (A) и колониеобразующий потенциал КОЕф (B) в суспензии клеток ФП разных сроков гестации: □ – до замораживания; ■ – после замораживания и отогрева; * – различия достоверны по отношению к соответствующему нативному контролю; # – по отношению к кФП-14 ($p < 0,05$).

Fig. 2. Content of CD73⁺CD105⁺ cells (A) and colony forming potential of CFUf (B) in cell suspension of FL of different gestation terms: □ – before freezing; ■ – after freeze-thawing; * – differences are significant if compared with corresponding native control; # – if compared with cryopreserved FLC-14 ($p < 0.05$).

кислот), ответственных за регуляцию Т-клеточной толерантности [36]. Синтез ИДО находится под контролем ряда воспалительных цитокинов: ИЛ-1, ФНО α , ИФН γ [15]. Интерфероны в лечебной практике широко используются как противоопухолевые, противовирусные и иммуномодулирующие агенты, хотя точный механизм их антипролиферативной активности до конца не исследован. Тем не менее, через понимание механизма антипролиферативного эффекта интерферонов можно объяснить взаимосвязь уровня экспрессии гена *ido* и интенсивности пролиферации МСК. Известно, что после индукции ИФН γ ИДО может ингибировать рост МСК путем снижения содержания триптофана как аминокислоты, необходимой для биосинтеза белка [15]. К тому же метаболиты триптофана могут супрессировать пролиферативную активность МСК по принципу аутокринной регуляции. Такой тип негативной обратной связи с ингибирующим эффектом на пролиферацию продемонстрирован в МСК различного генеза [15, 18].

Исходя из полученных данных можно предположить, что фактором активации экспрессии гена *ido* в КФП-18 может быть именно процесс криоконсервирования. Экспрессия этого гена была максимальной в выделенной фракции МСК. Это подтверждается ранее полученными данными об отсутствии экспрессии гена *ido* в суспензии КФП, лишенной CD105⁺-фракции [6].

Установленное ингибирование колониеобразующего потенциала МСК в криоконсервированных КФП-18 на фоне выраженного повышения уровня экспрессии в них гена *ido* может быть важным дополнительным доказательством способности фермента ИДО регулировать рост и дифференцировку МСК, хотя возможность реализации такого механизма *in vivo* еще не доказана [15]. Установлено, что при триптофановом голодании клеток включаются метаболические процессы адаптации, в частности растет активность триптофанил-тРНК-синтазы (ТТС), которая может поддерживать внутриклеточный резерв триптофана, доступный для синтеза белка [13, 39]. Полученные нами данные исключают компенсаторный механизм активации ТТС, хотя на различных типах клеток, включая МСК человека и мыши, показано, что ТТС может быть коиндуцирована ИФН γ одновременно с ИДО [13, 15, 39]. Однако механизм взаимодействия между данными ферментами до конца не изучен. К тому же в нашем случае экспрессия гена *ido* в МСК повышалась без участия ИФН γ и была индуцирована действием физико-химических факторов криоконсервирования. Точные механизмы активации генов после цикла замораживания-отогрева остаются предметом исследования. Немаловажным является установленный нами факт ингибирования экспрессии гена *ido* в КФП-14.

one could explain the relationships between *ido* gene expression activity and MSCs proliferation intensity. It is known that after the IFN γ induction, IDO could inhibit the growth of MSCs by reducing the amount of tryptophan, an amino acid essential for protein synthesis [6]. Moreover, tryptophan metabolites could suppress the proliferative activity of MSCs according to the principle of autocrine regulation. This type of negative feedback with an inhibitory effect on the proliferation was reported in MSCs of various origins [6, 10].

Our data showed that cryopreservation could be the activating factor for *ido* gene expression in FLC-18. Maximum expression of this gene was found in isolated MSC fraction, and our previous experiments showed that the FLC suspensions deprived of CD105⁺ fraction had nearly no expression of *ido* gene [9].

Inhibition of colony forming ability of MSCs revealed in cryopreserved FLC-18 on the background of significant increase in the level of *ido* gene expression may be an important additional proof for ability of IDO enzyme to regulate the growth and differentiation of MSCs, although the reliability of such a mechanism *in vivo* has not been proved yet [6]. It was found that in the tryptophan deprived cells the adaptative metabolic processes were activated, in particular an alternative enzyme tryptophanyl-tRNA synthase (TTS), which could support an intracellular tryptophan reserve available for protein synthesis [4, 39]. Our data exclude a compensatory mechanism of TTS activation, despite the fact that TTS can be coinduced by IFN γ together with IDO established in different cell types including human and mouse MSCs [4, 6, 39]. However, the mechanism of interaction between these enzymes is not fully understood. Moreover, in our case, *ido* gene expression in MSCs was increased without IFN γ and was induced by some physical and chemical agents of cryopreservation. The exact mechanisms of gene activation after a freeze-thawing cycle are the subject of future research. Of importance is the established by us fact of *ido* gene expression inhibition in cFLC-14.

In case of FLCs, the stimulation or inhibition of certain genes expression after cryopreservation may determine their therapeutic effect, as clinical practice utilizes both the cells obtained at various terms of gestation, and those cryopreserved using different protocols [21]. Established fact about activation of *ido* gene expression in FLC suspension of late gestation term suggests the possibility to change the functional capacities of MSCs after low-temperature preservation, that should be considered during application of this material in clinical practice. It was shown previously during treatment of autoimmune hemolytic anemia, that therapeutic effects of cryopreserved FLC of late gestation terms (FLC-18) was higher if compared with non-frozen-thawed FLCs of 14 and 18 days of gestation [16]. A similar pattern was noted during



Для КФП стимуляция или ингибирование экспрессии определенных генов после криоконсервирования может определять их терапевтический эффект, поскольку в клинической практике используют КФП, как полученные на разных сроках гестации, так и криоконсервированные по различным режимам [4]. Установленный факт активации экспрессии гена *ido* в суспензии КФП поздних сроков гестации свидетельствует о возможности изменения функционального потенциала МСК после действия факторов низкотемпературного консервирования, что необходимо учитывать при использовании такого материала в клинической практике. Ранее, на примере аутоиммунной гемолитической анемии, было показано преимущество терапевтического эффекта криоконсервированных КФП поздних сроков гестации (КФП-18) по сравнению с нативными КФП 14 и 18 суток гестации [23]. Подобная закономерность была отмечена при лечении криоконсервированными КФП 18 суток гестации болезни «трансплантат против хозяина» в эксперименте [2, 4]. Очевидно, что приведенные данные подтверждают, что криоконсервирование способно влиять на терапевтический потенциал КФП в зависимости от срока гестации и управлять внутренним состоянием биообъекта.

Выводы

Установлено повышение содержания МСК с фенотипом $CD73^+CD105^+$ и их колониобразующего потенциала на фоне ингибирования экспрессии гена *ido* по мере пролонгации сроков гестации фетальной печени с 14-х по 18-е сутки.

После криоконсервирования отмечено снижение содержания КОЕф в КФП. При этом в криоконсервированных КФП-18 продукция транскриптов гена *ido* возросла до уровня, превышающего не только данный показатель в нативных клетках, но и в КФП-14 до замораживания.

Литература

1. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д. и др. Уровень экспрессии генов *gata2* и *ido* в клетках стволового компартамента криоконсервированной фетальной печени разных сроков гестации // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, №3, Ч. 2. – С. 81–83.
2. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д. и др. Проявление иммунокорректирующего эффекта криоконсервированных клеток фетальной печени разных сроков гестации в условиях развития экспериментальной модели реакции «трансплантат против хозяина» // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – №3. – С. 82–86.
3. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Останкова Л.В. и др. Особенности влияния криоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кровяных клеток фетальной печени разных сроков гестации // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №2. – С. 186–199.

treatment of experimental graft-versus-host reaction with cryopreserved FLC-18 [18, 21]. Obviously, these data suggest that cryopreservation could affect the therapeutic potential of the FLCs, depending on the term of gestation, and control the internal state of a biological specimen.

Conclusions

Prolongation of fetal liver gestation from 14 to 18 days is accompanied with an increase in the content of MSCs with $CD73^+CD105^+$ phenotype and their colony forming ability on the background of inhibition of *ido* gene expression.

Cryopreservation is followed by a decrease in CFUf content in FLCs. In cryopreserved FLC-18 the *ido* gene transcripts content was higher than those in non-frozen-thawed FLC-18 and FLC-14.

References

1. Angelo P.C., Ferreira A.C.S., Fonseca V.D. Cryopreservation does not alter karyotype, multipotency, or NANOG/SOX2 gene expression of amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Genet Mol Res* 2012; 11(2): 1002–1012.
2. Augello A., Kurth T.B., De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niche. *Eur Cell Mater* 2010; 20: 121–133.
3. Baust J., Van Buskirk R., Baust G. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2000; 36(4): 262–270.
4. Boasso A., Herbeval J.P., Hardy A.W. et al. Regulation of indoleamine-2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human $CD4^+$ T cells. *Blood* 2005; 105(4): 1574–1581.
5. Conget P.A., Minguell J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999; 181(1): 67–73.
6. Croitoru-Lamoury J., Lamoury F.M.J., Caristo M. et al. Interferon- γ regulates the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells via activation of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO). *PLoS ONE* 2011; 6(2): e14698.
7. Deans R.J., Moseley A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28(8): 875–884.
8. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315–317.
9. Dimitrov O.Yu., Borisov P.O., Chelombitko O.V. Comparison of mesenchymal stem cell content and *ido* gene expression level in murine fetal liver of different gestation term. In: *Youth and Progress in Biology. Proceedings of VIII International Conference*; Lviv, Ukraine; Lviv, 2012: p. 343–344.
10. Fallarino F., Grohmann U., Vacca C. et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002; 9(10): 1069–1077.
11. Fallarino F., Grohmann U., You S. et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor ζ -chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 2006; 176(11): 6752–6761.
12. Francois M., Copland I.B., Yuan S. et al. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppres-



4. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г. и др. Криоконсервирование как фактор модификации структурно-функционального состояния и механизма реализации лечебного эффекта клеток стволового компартмента в условиях развития патологий аутоиммунного генеза // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 501–612.
5. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Луценко Е.Д., Дубрава Т.Г. Функциональная активность криоконсервированных кроветворных клеток (КОЕс) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Проблемы криобиологии. – 1993. – №4. – С. 34–39.
6. Дімітров О.Ю., Борисов П.О., Челомбитко О.В. Порівняння вмісту мезенхімальних стовбурових клітин та рівня експресії гена *ido* у фетальній печінці мишей різних строків гестації: 36. тез VIII Міжнародної наукової конференції «Молодь та поступ біології». – Львів, 2012. – С. 343–344.
7. Киселева Е.П., Крылов А.В., Старикова Э.А., Кузнецова С.А. Фактор роста сосудистого эндотелия и иммунная система // Успехи совр. биологии. – 2009. – Т. 129, №4. – С.1–12.
8. Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. – М.: Медицина, 1973. – 223 с.
9. Херрингтон С., Макги Дж. Молекулярная клиническая диагностика. – М.: Мир, 1999. – 558 с.
10. Angelo P.C., Ferreira A.C.S., Fonseca V.D. Cryopreservation does not alter karyotype, multipotency, or NANOG/SOX2 gene expression of amniotic fluid mesenchymal stem cells // Genet. Mol. Res. – 2012. – Vol. 11, №2. – P. 1002–1012.
11. Augello A., Kurth T.B., De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niche // Eur. Cell Mater. – 2010. – Vol. 20. – P. 121–133.
12. Baust J., Van Buskirk R., Baust G. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. – 2000. – Vol. 36, №4. – P. 262–270.
13. Boasso A., Herbeuval J.P., Hardy A.W. et al. Regulation of indoleamine-2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4⁺ T cells // Blood. – 2005. – Vol. 105, №4. – P. 1574–1581.
14. Conget P.A., Minguell J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells // J. Cell Physiol. – 1999. – Vol. 181, №1. – P. 67–73.
15. Croitoru-Lamoury J., Lamoury F.M.J., Caristo M. et al. Interferon- γ regulates the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells via activation of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6, №2. – e14698.
16. Deans R.J., Moseley A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses // Exp. Hematol. – 2000. – Vol. 28, №8. – P. 875–884.
17. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, №4. – P. 315–317.
18. Fallarino F., Grohmann U., Vacca C. et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism // Cell Death Differ. – 2002. – Vol. 9, №10. – P. 1069–1077.
19. Fallarino F., Grohmann U., You S. et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor z-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells // J. Immunol. – 2006. – Vol. 176, №11. – P. 6752–6761.
20. Francois M., Copland I.B., Yuan S. et al. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing // Cytotherapy. – 2012. – Vol. 14, №2. – P. 147–152.
21. Fuller B.J. Gene expression in response to low temperatures in mammalian cells: a review of current ideas // CryoLetters. – 2003. – Vol. 24, №2. – P. 95–102.
22. Ghodsi M., Heshmat R., Amoli M. et al. The effect of fetal liver-derived cell suspension allotransplantation on patients with
23. Friedenstein A.Y., Lalykina K.S. Induction of bone tissue and osteogenic progenitors. Moscow: Meditsina; 1973.
24. Fuller B.J. Gene expression in response to low temperatures in mammalian cells: a review of current ideas. CryoLetters 2003; 24(2): 95–102.
25. Ghodsi M., Heshmat R., Amoli M. et al. The effect of fetal liver-derived cell suspension allotransplantation on patients with diabetes: first year of follow-up. Acta Medica Iranica 2012; 50(8): 541–546.
26. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirous M.A. et al. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products. Biopreservation and Biobanking 2009; 7(1): 29–38.
27. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Lutsenko E.D. et al. The level of *gata2* and *ido* gene expression in stem cells of cryopreserved fetal liver of different gestation terms. Tavricheskiy Mediko-Biologicheskii Vestnik 2012; 15(3), Part 2: 81–83.
28. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Lutsenko E.D. et al. Manifestation of immunocorrective effect of cryopreserved fetal liver cells of different gestation terms during development of experimental graft-versus-host response. Cell Transplantation and Tissue Engineering 2010; (3): 82–86.
29. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Ostankova L.V. et al. Peculiarities of cryopreservation effect on functional potential of fetal liver hemopoietic stem cells of various gestation terms. Problems of Cryobiology 2009; 19(2): 186–199.
30. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dimitrov A.Yu. et al. Peculiarities of functional state modulation of genetic apparatus of fetal liver cells with stemness characteristics after cryopreservation. CryoLetters 2011; 32(6): 543–544.
31. Goltsev A.N., Ostankova L.V., Dubrava T.G. et al. Cryopreservation as a modifying factor of structure and function state and mechanism of therapeutic effect implementation of stem cells under development of autoimmune pathologies. In: Goltsev A.N., editor. Current problems of cryobiology and cryomedicine. Kharkov; 2012: p. 501–612.
32. Goltsev A.N., Ostankova L.V., Lutsenko E.D. et al. Functional activity of cryopreserved cells (CFUs), depending on the myelotransplant composition. Problems of Cryobiology 1993; (4): 34–39.
33. Gottwald E., Muller O., Polten A. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction with the Agilent 2100 Bioanalyzer. Electrophoresis 2001; 22(16): 4016–4022.
34. Harrington, S., McGee J. Molecular clinical diagnostics. New York: Wiley; 1999.
35. Jarocho D., Lukasiewicz E., Majka M. Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105⁺ and CD271⁺ cells. Folia Histochem Cytobiol 2008; 46(3): 307–314.
36. Kedersha N., Anderson P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. Biochem Soc Trans 2002; 30(6): 963–969.
37. King N.J., Thomas S.R. Molecules in focus: Indoleamine 2,3-dioxygenase. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39(12): 2167–2172.
38. Kiseleva Ye.P., Krylov A.V., Starikova E.A., Kuznetsova S.A. Vascular endothelial growth factor and the immune system. Uspekhi Sovr. Biologii 2009; 129(4): 1–12.
39. Le Blanc K., Frassoni F., Ball L. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. Lancet 2008; 371(9624): 1579–1586.
40. Ligam P., Manuelpillai U., Wallace E.M., Walker D. Localisation of indoleamine 2,3-dioxygenase and kynurenine hydroxylase in the human placenta and decidua: implications for role of the kynurenine pathway in pregnancy. Placenta 2005; 26(6): 498–504.
41. Liu K., Yang Y., Mansbridge J. Comparison of the stress response to cryopreservation in monolayer and three-dimensional human fibroblast cultures: stress proteins, MAP



- diabetes: first year of follow-up // *Acta Medica Iranica*. – 2012. – Vol. 50, №8. – P. 541–546.
23. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirous M.A. et al. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products // *Biopreservation and Biobanking*. – 2009. – Vol. 7, №1. – P. 29–38.
 24. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dimitrov A.Yu. et al. Peculiarities of functional state modulation of genetic apparatus of fetal liver cells with stemness characteristics after cryopreservation // *CryoLetters*. – 2011. – Vol. 32, №6. – P. 543–544.
 25. Gottwald E., Muller O., Polten A. Semiquantitative reverse transcription- polymerase chain reaction with the Agilent 2100 Bioanalyzer // *Electrophoresis*. – 2001. – Vol. 22, №16. – P. 4016–4022.
 26. Jarocho D., Lukaszewicz E., Majka M. Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105⁺ and CD271⁺ cells // *Folia Histochem Cytobiol*. – 2008. – Vol. 46, №3. – P. 307–314.
 27. Kedersha N., Anderson P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability // *Biochem. Soc. Trans.* – 2002. – Vol. 30, №6. – P. 963–969.
 28. King N.J., Thomas S.R. Molecules in focus: Indoleamine 2,3-dioxygenase // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 39, №12. – P. 2167–2172.
 29. Le Blanc K., Frassoni F., Ball L. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study // *Lancet*. – 2008. – Vol. 371, №9624. – P. 1579–1586.
 30. Ligam P., Manuelpillai U., Wallace E.M., Walker D. Localisation of indoleamine 2,3- dioxygenase and kynurenine hydroxylase in the human placenta and decidua: implications for role of the kynurenine pathway in pregnancy // *Placenta*. – 2005. – Vol. 26, №6. – P. 498–504.
 31. Liu K., Yang Y., Mansbridge J. Comparison of the stress response to cryopreservation in monolayer and three-dimensional human fibroblast cultures: stress proteins, MAP kinases, and growth factor gene expression // *Tissue Eng*. – 2000. – Vol. 6, №5. – P. 539–554.
 32. Mamidi M. K., Nathan K. G., Singh G. Comparative cellular and molecular analyses of pooled bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells during continuous passaging and after successive cryopreservation // *J. Cell. Biochem.* – 2012. – Vol. 113, №10. – P. 3153–3164.
 33. Martinello T., Bronzini I., Maccatrozzo L. et al. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood // *Tissue Eng. Part C. Methods*. – 2010. – Vol. 16, №4. – P. 771–781.
 34. Mellor A.L., Chandler P., Lee G.K. et al. Indoleamine-2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy // *J. Reprod. Immunol.* – 2002. – Vol. 57, №1–2. – P. 143–150.
 35. Naaldijk Y., Staude M., Fedorova V. et al. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide // *BMC Biotechnology*. – 2012. – Vol. 12. – P. 49–59.
 36. Newman R.E., Yoo D., LeRoux M.A., Danilkovitch-Miagkova A. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells // *Inflamm. Allergy Drug Targets*. – 2009. – Vol. 8, №2. – P. 110–123.
 37. Rombouts W.J.C., Ploemacher R.E. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture // *Leukemia*. – 2003. – Vol. 17, №1. – P. 160–170.
 38. Woods E.J., Liu J., Pollok K. et al. A theoretically optimized method for cord blood stem cell cryopreservation // *J. Hematother. Stem. Cell Res.* – 2003. – Vol. 12, №3. – P. 341–350.
 39. Yadav M.C., Burudi E.M., Alirezaei M. et al. IFN gamma-induced IDO and WRS expression in microglia is differentially regulated by IL-4 // *Glia*. – 2007. – Vol. 55, №13. – P.1385–1396.
 40. Zhang S., Qian H., Wang Z. et al. Preliminary study on the freeze-drying of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* – 2010. – Vol. 11, №11. – P. 889–894.
 - kinases, and growth factor gene expression. *Tissue Eng* 2000; 6(5): 539–554.
 32. Mamidi M. K., Nathan K. G., Singh G. Comparative cellular and molecular analyses of pooled bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells during continuous passaging and after successive cryopreservation. *J Cell Biochem* 2012; 113(10): 3153–3164.
 33. Martinello T., Bronzini I., Maccatrozzo L. et al. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. *Tissue Eng Part C Methods* 2010; 16(4): 771–781.
 34. Mellor A.L., Chandler P., Lee G.K. et al. Indoleamine-2,3- dioxygenase, immunosuppression and pregnancy. *J Reprod Immunol* 2002; 57(1–2): 143–150.
 35. Naaldijk Y., Staude M., Fedorova V. et al. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC Biotechnology* 2012; 12: 49–59.
 36. Newman R.E., Yoo D., LeRoux M.A., Danilkovitch-Miagkova A. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009; 8(2): 110–123.
 37. Rombouts W.J.C., Ploemacher R.E. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 2003; 17(1): 160–170.
 38. Woods E.J., Liu J., Pollok K. et al. A theoretically optimized method for cord blood stem cell cryopreservation. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12(3): 341–350.
 39. Yadav M.C., Burudi E.M., Alirezaei M. et al. IFN gamma-induced IDO and WRS expression in microglia is differentially regulated by IL-4. *Glia* 2007; 55(13): 1385–1396.
 40. Zhang S., Qian H., Wang Z. et al. Preliminary study on the freeze-drying of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 2010; 11(11): 889–894.

