

Морфологический и фенотипический анализ различных популяций клеток эмбриональной печени человека после выделения и криоконсервирования

Ю.А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Morphological and Phenotypic Analysis of Various Populations of Human Embryonic Liver Cells After Isolation and Cryopreservation

YU.A. PETRENKO

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

Эмбриональная печень человека (ЭПЧ) 8-12 недель гестации содержит большое количество гемопоэтических, гепатических и мезенхимальных клеток-предшественников. В работе была предпринята попытка охарактеризовать данные популяции клеток, определить их устойчивость к факторам выделения и криоконсервирования.

Ультраструктуру клеток ЭПЧ исследовали с помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К, снабженного системой съема и анализа изображения. Фенотипический анализ клеток ЭПЧ проводили с использованием проточного цитофлуориметра FACS Calibur (BD Biosciences) или EPICS-Altra Flow Sorter (Beckman Coulter). Криоконсервирование клеток проводили под защитой 5% ДМСО со скоростью охлаждения 1°C/мин до -80°C, после чего клетки погружали в жидкий азот. Отогрев проводили на водяной бане при 37°C.

Электронно-микроскопические исследования ультратонких срезов ЭПЧ 8-12 недель гестации позволили оценить морфологические особенности и локализацию основных ее клеточных популяций. После ферментативного выделения критических изменений в морфологии клеток не наблюдалось. В то же время была установлена разная устойчивость клеток гемопоэтического и гепатического ростков к факторам криоконсервирования. Гепатические клетки оказались менее устойчивы, что, главным образом, проявлялось в нарушениях внутриклеточных структур.

Кроме клеток эритроидного и гепатического рядов, представляющих большинство в ЭПЧ данного срока гестации, была выделена популяция фибробластоподобных клеток, активно пролиферирующих *in vitro*. Фенотипический анализ клеток 4-го пассажа установил наличие CD29, CD44, CD105, HLA-ABC, слабую экспрессию CD49D и отсутствие CD33, CD34, CD4, CD45 и HLA-DR антигенов. Данный фенотип был описан ранее для мезенхимальных клеток-предшественников из костного мозга и пуповинной кордовой крови.

Количество кроветворных клеток-предшественников до и после криоконсервирования было оценено по экспрессии клетками CD34 и CD38 антигенов. Содержание ранних кроветворных предшественников с фенотипом CD34⁺ CD38⁻ составило 0,46±0,28%. После криоконсервирования их жизнеспособность составила около 80%. При оценке колониеобразующей активности ККП после криоконсервирования наблюдалось незначительное снижение общего количества образованных колоний по сравнению со свежeweделенными клетками.

Таким образом, в данной работе на основании морфологических и фенотипических исследований представлены различные популяции клеток ЭПЧ, а также показана их устойчивость к факторам выделения и криоконсервирования.

Human embryonic liver (HEL) of 8-12 gestation weeks contains a big number of hematopoietic, hepatic and mesenchymal progenitor cells. The attempt to characterize these cell populations as well as to determine their resistance to isolation and cryopreservation factors has been done.

The HEL cell ultrastructure was studied using PEM-125K electron microscope, supplied with the image recording and analysing system. Cells were phenotypically analysed by flow cytometry using FACS Calibur (BD Biosciences) or EPICS-Altra Flow Sorter (Beckman Coulter). Cells were cryopreserved under protection of 5% DMSO with the cooling rate 1°C/min down to -80°C, afterwards samples were immersed into liquid nitrogen. Thawing was done at water bath at 37°C.

Electron-microscopy studies of the ultrathin sections of 8-12 gestation weeks' HEL allowed to assess the morphological peculiarities and localization of its main cell populations. After non-enzymatic isolation no critical changes in cell morphology were observed. At the same time different resistance of cells of hematopoietic and hepatic lineage to cryopreservation factors was established. Hepatic cells appeared to be less resistant and that was mainly manifested by disorders of intracellular structures.

Besides cells of erythroid and hepatic lineages that represent the majority in HEL of the indicated gestation terms, the population of fibroblast-like cells, that could actively proliferate *in vitro* was isolated.

The flow cytometry analysis of the 4th passage cells indicated the presence of CD29, CD44, CD105, HLA-ABC, low expression of CD49D and no CD33, CD34, CD4, CD45 and HLA-DR antigens. This phenotype was previously described for mesenchymal progenitor cells from bone marrow and umbilical cord blood. An amount of hematopoietic progenitor cells prior to and after cryopreservation was evaluated by the expression of CD34 and CD38 antigens. The content of early hematopoietic precursors with CD34⁺CD38⁻ phenotype was 0.46±0.28%. After cryopreservation their viability makes about 80%. When evaluating the colony-forming activity of hematopoietic progenitor cells after cryopreservation a slight reduction of total amount of colony formation in comparison with freshly isolated cells was observed.

Thus, basing on morphological and phenotypic studies this study presented the characteristics of different populations of HEL cells, as well as the indices of their resistance to isolation and cryopreservation factors.