

**Морфологическая и функциональная оценка клеток
фетальной печени человека при долгосрочном культивировании**

UDC 611.36.013:57.085.2

P. TODOROV¹, R. KONAKCHIEVA¹, J. DIMITROV²,
V. NOVACHKOV², D. KYURKCHIEV³, S.I. DROKIN⁴, N.A. GOROKHOVA^{4*}**Morphological and Functional Assessment
of Human Fetal Liver Cells in Long-Term Culture**

Морфологию и состояние клеток фетальной печени человека исследовали в условиях культивирования. Выявлена высокая пролиферативная активность адгезивной фракции клеток фетальной печени. Большой размер ядер и малое количество органелл в цитоплазме клеток адгезивной фракции по данным световой и электронной микроскопии свидетельствовали о низкой степени дифференцировки клеток в культуре. Иммунофенотипический анализ установил слабую экспрессию HLA-DR, CD13 и CD45. Таким образом, данные, полученные с помощью проточной цитометрии, показали низкое содержание дифференцированных клеток в изученных культурах клеток фетальной печени.

Ключевые слова: клетки фетальной печени, адгезивная фракция, культура клеток, иммунофенотипический анализ.

Морфологию і стан клітин фетальної печінки людини досліджували в умовах культивування. Виявлено високу проліферативну активність адгезивної фракції клітин фетальної печінки. Великий розмір ядер і маленька кількість органел у цитоплазмі клітин адгезивної фракції за даними світлової і електронної мікроскопії свідчили про низький ступінь диференціювання клітин в культурі. Імунофенотипічний аналіз встановив слабку експресію HLA-DR, CD13 і CD45. Таким чином, дані, що було отримано за допомогою проточної цитометрії, показали низький вміст диференційованих клітин у досліджених культурах клітин фетальної печінки.

Ключові слова: клітини фетальної печінки, адгезивна фракція, культура клітин, імунофенотипічний аналіз.

Morphology and behavior of human fetal liver cells (hFLCs) during culture were investigated. The adherent fraction of fetal liver cells was found to possess a good proliferative activity. Light and electron microscopic assessment showed the large nucleus size and the poor content of cytoplasmic organelles evidenced the low differentiation status of the cell culture. In this respect immunophenotypic analysis was carried out and low expression of HLA-DR, CD13 and CD45 was determined. The data obtained by flow cytometry revealed poor content of differentiated and antigen-presenting cells in the examined cultures of hFLCs.

Key-words: fetal liver cells, adherent fraction, cell culture, immunophenotype analysis.

Фетальная печень человека является богатым источником стволовых клеток [2], которые в перспективе могут использоваться для замещения дегенеративных и поврежденных тканей [2, 7]. Работы, посвященные морфологической и функциональной оценке клеток фетальной печени человека при развитии в культуре *in vitro*, немногочисленны. Опыт работы с фетальными клетками в Болгарии невелик [4], поэтому наше исследование направлено на определение клеточных линий для долгосрочных исследований *in vitro*. Были определены некоторые характеристики адгезивной фракции клеток фетальной печени, полученных из

Human fetal liver is a rich source of stem cells which are progenitors of different cell types [2], which can be used perspectively to replace degenerative and damaged tissue [2, 7]. Reports representing morphological and functional assessment of human fetal liver cells during *in vitro* culture are practically meagre. Experience with fetal stem cells in Bulgaria is very limited [4] and our current research has focussed to the establishment of cell lines for basic long-term *in vitro* studies. We explored several characteristics as well as the behavior of adherent fraction of fetal liver cells isolated from human fetuses of 8th-12th week of gestation during long-term *in vitro* culture.

¹Институт биологии и иммунологии репродукции, г. София, Болгария

²Университетский госпиталь "Майчин дом", г. София, Болгария

³Университетский госпиталь "Иван Рильский", г. София, Болгария

⁴Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-34, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

¹Institute of Biology and Immunology of Reproduction, Sofia, Bulgaria

²University Hospital "Maichin dom", Sofia, Bulgaria

³University Hospital "Ivan Rilski", Sofia, Bulgaria

⁴Institute 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 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

плодов человека 8-12 недель гестации при долгосрочном культивировании *in vitro*.

Материалы и методы

Получение тканей и культивирование клеток.

Во всех экспериментах использовали ткань фетальной печени человека, предоставленную Университетским госпиталем "Майчин дом", г. София, Болгария. Материал был получен при абортках на 8-12-й неделе гестации при информированном согласии пациенток и в соответствии с процедурой, одобренной местным комитетом по медицинской этике. Материал помещали в среду промывки (Medi-Cult) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) и гепарина. Затем печень выделяли, удаляли соединительную ткань и несколько раз отмывали фрагменты органов в той же среде.

Клеточную суспензию получали механическим измельчением с использованием ферментативного расщепления, как описано в [5], не позднее двух часов после получения материала. Полученные клетки затем отмывали и культивировали в 24-луночных планшетах в среде X-VIVO-15 (Cambrex) с добавлением 10% ФТС. Концентрация клеток на лунку составляла 5×10^4 . По достижении сплошного монослоя на 5-6-е сутки культуру клеток подвергали обработке трипсином и субкультивированию. Культуральную среду заменяли каждые 2-3-е сутки. После каждого пассажа клетки исследовали с помощью иммунофенотипирования, световой и электронной микроскопии.

Морфологические исследования проведены после стандартного окрашивания гематоксилин-эозином (ГЭ) и окрашивания по методу Мэй-Грюнвальд-Гимза [6]. Перед окрашиванием монослои были дважды отмыты фосфатным буфером в течение 10 мин и зафиксированы 3%-м раствором ледяной уксусной кислоты с метанолом в течение 2-3 мин. Детальное исследование и фотографирование окрашенных культур клеток проводили на световом микроскопе Суоран-Reichert.

Электронная микроскопия проводилась после 5-го пассажа. Клетки культивировали в 6-сантиметровых чашках Петри до получения сплошного монослоя. Затем их снимали с чашек и переносили в небольшие объемы фосфатного буфера. Клеточные суспензии центрифугировали при 150 g и фиксировали в 2,5%-м глютаральдегиде на 0,1%-м какодилатном буфере (pH 7,3) в течение 10 мин, затем фиксировали в 1%-м растворе OsO_4 и проводили обезвоживание в возрастающих концентрациях этанола и заливку с помощью набора Durcupan (Fluka). Используя ультрамикротом Reichert, получили около 700-800 срезов. Препараты были помещены на решетки. Ультратонкие срезы

Materials and methods

Tissue collection and cell culture. In all experiments human fetal liver tissue was used. Fetuses were collected after receiving an informed consent from patients underwent abortion during 8th to 12th week of gestation and the procedure was approved by the local Medical Ethics committee. The fetuses were collected in Flushing-medium (Medi-Cult), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and heparin. Liver was detached, the adjoining tissue was removed and organ fragments were washed several times in the above medium.

Cell suspensions were isolated by mechanical dispersion using enzymatic digestion as described elsewhere [5] not later than two hours after tissue collection. The isolated cells were then washed and cultured in 24-well plates in X-VIVO-15 Medium (CAMBREX) at 5×10^4 cells/well density, supplemented with 10% FBS. After obtaining a confluent monolayer within five to six days the cells were trypsinized and subcultured. The culture medium was substituted every 2-3 days. After repeated passages the cells were appropriately treated for immunophenotyping, conventional and electron microscopy.

Morphological assessment. Morphological assessment was made after routine staining with hematoxyllin-eosin (H&E) and according to the technique of May-Grunwald-Giemsa [6]. Prior to the staining the monolayers were washed twice in PBS for 10 min and fixed in 3% acetic acid solution of ice-cold methanol for 2-3 min. The stained cell cultures were thoroughly examined and photographed with light microscope Cytopan-Reichert.

Electron microscopy. Electron microscopy was performed at the time of the 5th passage. Cell culture was performed in 6 cm Petri dishes until obtaining confluent monolayers. Cells were scrapped from the dish in small volumes of phosphate buffer. Cell suspensions were then centrifuged at 150 g and fixed in 2.5% glutaraldehyde and 0.1% cacodylate buffer (pH 7.3) for 10 min. Second fixation in 1% OsO_4 followed, then the preparations were dehydrated in ascending alcohol concentrations and put into Durcupan (Fluka). About 700-800 sections were made using Reichert Ultramicrotome. The slides were mounted onto meshfibers. The ultra-thin sections were contrasted with uranyl- and plumbic acetate. The preparations were examined with electron microscope JEM 1200 EX.

Flow cytometry. Expression of HLA-DR, CD13 and CD45 was determined through activation and statistical analysis of 5000 cells using flow cytometer FACS Callibur (BD, USA) and appropriate software (CellQuest). The cells were counted and adjusted to 1×10^6 cells/ml. 50 μl from the cell suspension were incubated in FALCON tubes with the respective

контрастировали уранил- и свинцовым ацетатом и затем исследовали на электронном микроскопе JEM 1200 EX.

Проточная цитометрия. Экспрессию HLA-DR, CD13 и CD45 определяли активацией и статистическим анализом 5000 клеток с использованием проточного цитометра FACS Calibur (BD, США) и соответствующего программного обеспечения (CellQuest). Количество клеток подсчитывали и доводили до 1×10^6 клеток/мл. Клеточную суспензию (50 мкл) инкубировали в пробирках (Falcon) с антителом (BD, США) в течение 30 мин при 37°C в темноте. Контрольные клетки инкубировали в другой пробирке без антител. После инкубации клетки обрабатывали 2 мл промывочной среды (Cellwash, BD, USA) и затем центрифугировали в течение 5 мин при 1300 об/мин. Супернатант удаляли и пробирки заполняли 500 мкл фиксирующего раствора (Cell-FIX, BD, США).

Результаты и обсуждение

Пролиферация. Установлено, что в указанных условиях адгезивная фракция клеток фетальной печени человека обладает хорошей пролиферативной активностью *in vitro*. На 5-6-е сутки культивирования клетки образовывали сплошной монослой с типичными вихреобразными кластерами (рис. 1). После трипсинизации субкультуры росли быстрее и после 3-го пассажа клетки образовывали плотный монослой на 3-4-е сутки. Известно, что линии соматических клеток человека имеют ограниченное количество циклов дробления (несколько десятков). В наших экспериментах не установлена разница между пролиферативной активностью клеток последнего пассажа по сравнению с предыдущим. На основании этих наблюдений мы предположили, что клетки были в основном малодифференцированными и обладали способностью к “продолжительному” делению.

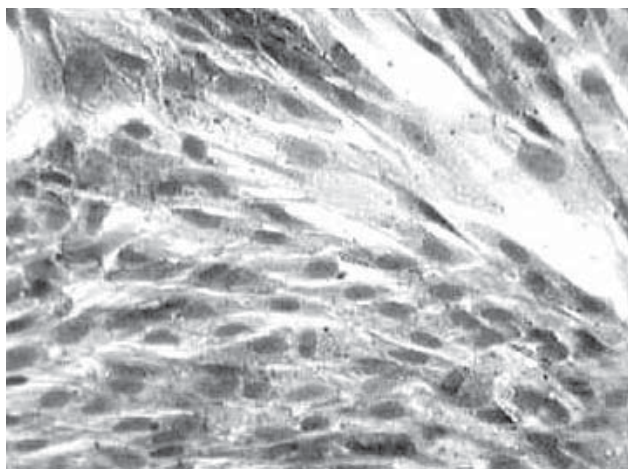


Рис. 1. Монослой клеток фетальной печени человека (Мэй-Грюнвальд-Гимза, $\times 100$).

Fig. 1. Monolayers of human fetal liver cells (May-Grunwald-Giemsa, $\times 100$).

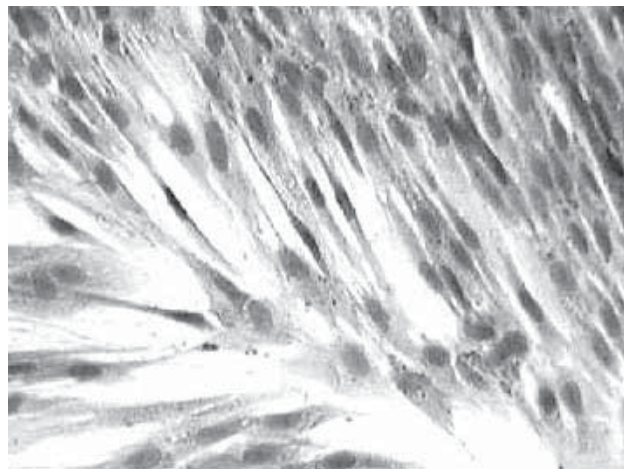
antibody (BD, USA) for 30 min at 37°C and in the dark. Control cells were incubated in another tube without antibodies. After incubation the cells were treated with 2 ml of washing solution (CellWash, BD, USA) and then centrifuged for 5 min at 1300 rpm. The supernatant was removed and each tube was supplied with 500 μ l fixing solution (CellFIX™, BD, USA).

Results and discussion

Proliferation. We found that under the above conditions adherent fraction of human fetal liver cells possessed a good proliferative activity *in vitro*. On the 5th-6th day of culture the cells formed confluent monolayers with typical whirl-like clusters (Fig. 1). Upon trypsinization the subculture expanded more rapidly and after the 3^d passage the cells established high-density monolayer within three to four days. It is known that human somatic cell lines possess a capacity of duplication cycles which is limited to several dozens. In our experiments we found no difference in the proliferation capacity of the last passage compared to the preceding passages. Based on these observations it was assumed that the cells were mainly low differentiated and able to divide “permanently”.

Morphological status of fetal liver cells. In the stained preparations we observed the presence of stretched, mostly bipolar cells with sharpened ends (Fig. 2) without expressed contacts. These characteristics are typical for fibroblast cells. The cytoplasm was amphophylic (slightly acidophylic). Their nuclei were oval, with dispersed chromatin and 2-4 nucleoluses with high density.

Fig. 3. represents giant single cells with one oval nucleus and several nucleoluses. We also observed polygonal cells with porous cytoplasm and finely-granulated eosinophylic zone around the nucleus, identical with that of the Golgy apparatus (typical



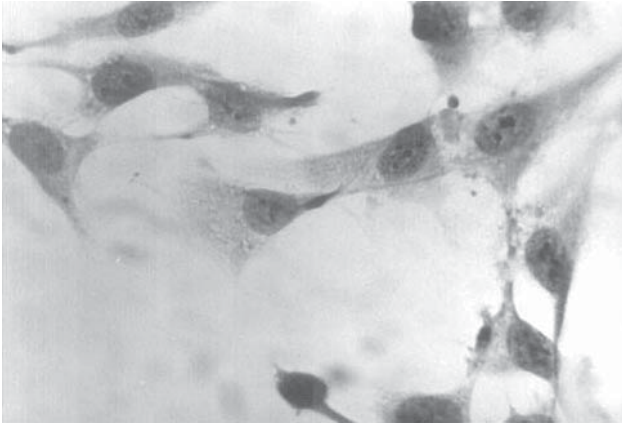


Рис. 2. Клетки фетальной печени человека (Мэй-Грюнвальд-Гимза, $\times 400$).

Fig. 2. Human fetal liver cells (May-Grunwald-Giemsa, $\times 400$).

Морфология клеток фетальной печени. В окрашенных препаратах наблюдали растянутые, в основном биполярные клетки с заостренными концами без выраженных контактов (рис. 2). Такие характеристики являются типичными для фибробластных клеток. Цитоплазма клеток амфотильная (слегка ацидофильная). Ядра клеток были овальными с дисперсным хроматином и 2-4 плотными ядрышками.

На рис. 3 показана гигантская отдельная клетка с одним овальным ядром и несколькими ядрышками. Также наблюдали полигональные клетки с пористой цитоплазмой и эозинофильной зоной вокруг ядра с мелкой грануляцией, схожей с аппаратом Гольджи, что типично для клеток печени. Клетки с овальным ядром, содержащим большое количество хроматина, и цитоплазмой с небольшим количеством органелл наблюдались редко (рис. 3).

На электронных микрофотографиях (рис. 4) показаны сильно вытянутые биполярные клетки с относительно большим ядром, содержащим большое количество гетерохроматина. Ядрышки хорошо сформированы и чаще всего расположены около ядерной мембраны, что указывает на повышенную биосинтетическую активность. Клеточная мембрана гладкая без папиллярных протуберанцев и контактных зон с соседними клетками. В цитоплазме наблюдаются малое количество органелл с умеренной электронной плотностью и большое количество разрозненных гранул гликогена. Полученные данные подтверждают фибробласто-

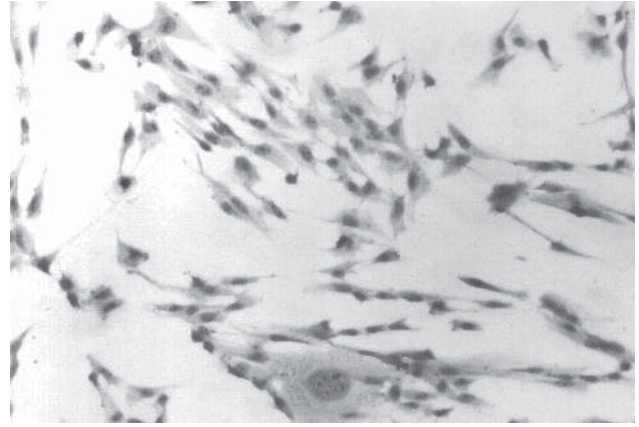


Рис. 3. Клетки фетальной печени человека (ГЭ, $\times 100$).

Fig. 3. Human fetal liver cells (H&E, $\times 100$).

for liver cells). Cells with oval, chromatin-rich nuclei and poor cytoplasm are rarely found (Fig. 3).

Electron microphotographs (Fig. 4) showed high-lengthened bipolar cells with relatively large nuclei, rich of heterochromatin. The nucleoluses were well shaped and often situated near the membrane of the nucleus indicating enhanced biosynthetic activity. The cell membrane was smooth without papillar protuberances and contact zones to neighboring cells. The number of organelles in the cytoplasm was low and they showed moderate electron density. A great number of scattered glycogen granules in the cytoplasm was detectable. Although these findings confirmed the fibroblast-like appearance of the cells observed during the light microscope assessment, we did not assume these cells to be fibroblasts. Differentiated fibroblasts are known for their cytoplasm



Рис. 4. Электронные микрофотографии клеток фетальной печени человека.

Fig. 4. Electron microphotographs of human fetal liver cells.

подобную природу клеток, выявленную также с использованием световой микроскопии, однако мы не склонны их считать фибробластами. Известно, что цитоплазма дифференцированных фибробластов содержит большое количество органелл с выраженной эндоплазматической сетью, большими вакуолями с мелко гранулированными белками и т.п. Клеткам исследуемых культур не присущи такие признаки. Напротив, большой размер ядра и небольшое количество цитоплазматических органелл свидетельствует о низком уровне дифференцировки клеточной культуры.

Иммунофенотипический анализ показал низкую экспрессию HLA-DR, CD13 и CD45. Обнаружено низкое содержание дифференцированных и антиген-презентирующих клеток в исследованных культурах (таблица). Мы полагаем, что HLA-DR был доступен только по причине большей экспрессии этих рецепторов не только на лимфоидных, но также на эритроидных клетках (рис. 5). Необходимо отметить, что полученный показатель 12,84% для специфической экспрессии HLA-DR был значительно ниже, чем показатель для взрослых [1, 2]. Этот результат важен для оценки трансплантационного потенциала клеток фетальной печени человека, что обусловлено ролью этого маркера в клеточно-опосредованном иммунном ответе. В целом низкая экспрессия молекул группы CD является показателем низкой дифференцировки и высокого содержания бластных элементов в культурах изолированных клеток фетальной печени [3].

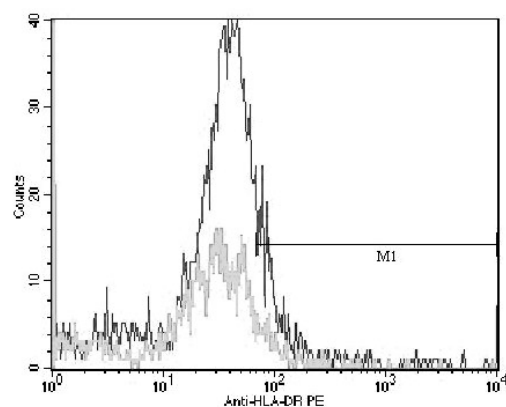
Выводы

Высокая пролиферативная активность и морфологический статус клеток фетальной печени в условиях культивирования позволяют предположить, что исследованные клеточные культуры имеют низкий уровень дифференцировки. Иммунофенотипический анализ также показал низкое содержание дифференцированных клеток в культурах изолированных клеток фетальной печени. Полученные данные важны при разработке новых протоколов криоконсервирования.

Фенотип гемопоэтических клеток в культуре клеток фетальной печени

Phenotypic content of hemopoietic cells in fetal liver cell culture

Фенотип Phenotype	Содержание,% Content, %
HLA-DR	12,84
CD13	0,93
CD45	2,51



Histogram Statistics

File: HLA-DR.002
Sample ID: HLA-DR
Tube: tube #1
Acquisition Date: 22-Nov-04
Gated Events: 5000
X Parameter: FL2-H Anti-HLA-DR PE (Log)

Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel: DCs
Gate: No Gate
Total Events: 5000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	5000	100.00	100.00	92.81	30.93	664.48	36.19	1
M1	68, 9910	642	12.84	12.84	501.99	136.74	331.64	89.77	75

Рис. 5. Экспрессия HLA-DR на клетках фетальной печени человека.

Fig. 5. Histogram of the HLA-DR expression on human fetal liver cells.

which is rich of organelles with prominent endoplasmic reticulum, wider tanks, filled with finely granulated proteins etc. Those cell features were not distinctive in our cultures. In contrast, the large nucleus size and the poor content of cytoplasm organelles evidenced of the low differentiation status of the cell culture.

Immunophenotype analysis. Low expression of HLA-DR, CD13 and CD45 was determined. The immunophenotype analysis revealed poor content of differentiated and antigen-presenting cells in the examined cultures (Table). We supposed that the availability of HLA-DR (Fig. 5) was merely due to a higher expression of these receptors not only on lymphoid, but also on erythroid cells. We should notice that the obtained value of 12.84% for the specific expression of HLA-DR was significantly lower than those reported in adult humans [1, 2]. This finding is of great importance underscoring the transplantation potential of human fetal liver cells because of the role of this marker in the cell mediated immune response. As a whole, the low expression of molecules from the CD group was indication of low differentiation level and high percent of blast elements in the isolated fetal liver cell cultures [3].

Conclusion

High proliferative activity and morphological status of fetal liver cells under culture conditions allowed to suppose the low differentiation level of the examined cell cultures. The immunophenotype analysis also indicated the poor content of differentiated cells in

Данное исследование частично поддержано грантом № NB-1522/05 Национального фонда научных исследований Министерства образования и науки Болгарии.

Литература

1. Collins R., Anastasi J., Terstappen L. et al. Donor-Derived Long-Term Multilineage Hematopoiesis in a Liver-Transplant Recipient // *New England Journal of Medicine*.— 1993.— Vol. 328, N11.— P. 762-765.
2. Suskind D.L., Muench M.O. Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34+ cytokeratin 7/8+ cells express markers for stellate cells // *J. Hepatol.*— 2004.— Vol. 40, N2.— P. 261-268.
3. Tarasov A.I., Petrenko A.Y., Jones D.R.E., Grischenko V.I. Phenotypic Analysis and Colony-Forming Activity of Human Fetal Liver Hematopoietic Cells // *Experimental Oncology*.— 2002.— Vol. 24.— P. 180-181.
4. Todorov P. Possibilities of using of fetal cells and tissue for cell therapy // *Reproductive Health*.— 2005.— Vol. 9.— P. 6-10.
5. Todorov P., Konakchieva R., Dimitrov J. et al. Vitrification of human embryonic stem cells for cryopreservation // *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*.— Vol. 2005.— Vol. 58, N9.— P. 103-108.
6. Toepfer K. Analysis of the May-Grunwald-Giemsa staining technic as a contribution to the necessity of working with pure, defined dyes // *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.*— 1972.— Vol. 78.— P. 272-276.
7. Zalzman M., Anker-Kitai L., Efrat S. Differentiation of human liver-derived, insulin-producing cells toward the beta-cell phenotype // *Diabetes*.— 2005.— Vol. 54, N9.— P. 2568-2575.

Поступила 14.03.2006

the isolated fetal liver cell cultures. This data will be highly informative for the development of new cryopreservation protocols.

This work was partially supported by Grant No NB-1522/05 of the National Foundation of Scientific Research of the Ministry of Education and Science, Bulgaria.

References

1. Collins R., Anastasi J., Terstappen L. et al. Donor-Derived Long-Term Multilineage Hematopoiesis in a Liver-Transplant Recipient // *New England Journal of Medicine*.— 1993.— Vol. 328, N11.— P. 762-765.
2. Suskind D.L., Muench M.O. Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34+ cytokeratin 7/8+ cells express markers for stellate cells // *J. Hepatol.*— 2004.— Vol. 40, N2.— P. 261-268.
3. Tarasov A.I., Petrenko A.Y., Jones D.R.E., Grischenko V.I. Phenotypic Analysis and Colony-Forming Activity of Human Fetal Liver Hematopoietic Cells // *Experimental Oncology*.— 2002.— Vol. 24.— P. 180-181.
4. Todorov P. Possibilities of using of fetal cells and tissue for cell therapy // *Reproductive Health*.— 2005.— Vol. 9.— P. 6-10.
5. Todorov P., Konakchieva R., Dimitrov J. et al. Vitrification of human embryonic stem cells for cryopreservation // *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*.— Vol. 2005.— Vol. 58, N9.— P. 103-108.
6. Toepfer K. Analysis of the May-Grunwald-Giemsa staining technic as a contribution to the necessity of working with pure, defined dyes // *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.*— 1972.— Vol. 78.— P. 272-276.
7. Zalzman M., Anker-Kitai L., Efrat S. Differentiation of human liver-derived, insulin-producing cells toward the beta-cell phenotype // *Diabetes*.— 2005.— Vol. 54, N9.— P. 2568-2575.

Accepted in 14.03.2006