

**Влияние криоконсервирования на иммунологическую активность
и фенотипический состав лимфоидных клеток
эмбриональной печени человека**

Ю.А. ПЕТРЕНКО, А.И. ТАРАСОВ, В.И. ГРИШЕНКО, А.Ю. ПЕТРЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков***Cryopreservation Effect on Immunologic Activity
and Phenotypic Composition of Human Embryonic
Liver Lymphoid Cells**

PETRENKO YU.A., TARASOV A.I., GRISCHENKO V.I., PETRENKO A.YU.

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

Исследовали фенотип свежeweделенных и криоконсервированных клеток эмбриональной печени (КЭП) человека, а также их способность вызывать иммунный ответ лимфоцитов взрослых доноров (ЛВД) при сокультивировании. Данные проточной цитометрии не позволили выявить достоверной экспрессии маркеров лимфоидной коммитации (CD1⁺, CD10⁺, CD5⁺, CD20⁺) и показали, что содержание CD7⁺ и CD13⁺ клеток в эмбриональной печени незначительно (менее 1%). В наибольшей степени в свежeweделенных и криоконсервированных суспензиях представлены CD45⁺ (2,65±0,32%) и HLA-DR⁺ (7,51±1,35%) клетки. Низкое содержание лимфоидных клеток сопровождалось слабой иммуногенной активностью клеток печени, исследованной в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). Криоконсервирование позволяет сохранить пролиферативную активность КЭП человека и не влияет на её фенотип и иммунологическую активность.

Досліджували фенотип свіжоізольованих і криоконсервованих клітин ембріональної печінки людини, а також їх здатність викликати імунну відповідь лімфоцитів дорослих донорів при сокультивуванні. Дані проточної цитометрії не дозволили виявити вірогідної експресії маркерів лімфоїдної комітації (CD1⁺, CD10⁺, CD5⁺, CD20⁺) і показали, що вміст CD7⁺ та CD13⁺ клітин у ембріональній печінці незначний (менше ніж 1%). Найбільше в свіжоізольованих і криоконсервованих суспензіях представлені CD45⁺ (2,65±0,32%) і HLA-DR⁺ (7,51±1,35%) клітини. Низький вміст лімфоїдних клітин супроводжувався слабкою імунногенною активністю клітин печінки, що була досліджена у змішаній культурі лімфоцитів. Криоконсервування дозволяє зберегти проліферативну активність клітин ембріональної печінки людини і не впливає на її фенотип та імунологічну активність.

Authors studied the phenotype of freshly isolated and cryopreserved cells from human embryonic liver (HEL), and its capability to provoke an immune response of adult donor lymphocytes (ADL) during co-culturing. Flow cytometry data did not allow to reveal the statistically significant expression of lymphoid commitment markers (CD1⁺, CD10⁺, CD5⁺, CD20⁺) and showed the insignificant content of CD7⁺ and CD13⁺ cells in embryonic liver (less than 1%). In freshly isolated and cryopreserved suspensions the CD45⁺ and HLA-DR⁺ cells are presented in the greatest extent (2.65±0.32% and 7.51±1.35%, correspondingly). Low content of lymphoid cells was accompanied by poor immunogenic activity of liver cells, studied in mixed lymphocyte culture (MLC). Cryopreservation allows to keep the proliferative activity of HEL cells, and does not influence its phenotype and immunological activity.

В настоящее время основным методом лечения патологий, обусловленных депрессией кроветворения различной этиологии, является трансплантация гемопоэтических клеток костного мозга. Однако ее проведение требует тщательного подбора донора по гистосовместимости и возможна, в основном, между близнецами и сиблингами. Использование КЭП для трансплантации может быть более перспективным, так как они характеризуются высоким содержанием кроветворных стволовых клеток и слабой иммуногенностью. Последнее положение основывается, главным образом, на результатах клинического применения. Вместе с тем вопросы состава лимфоидных клеток и иммунологической активности КЭП, а также

Nowadays the main method for treating the pathologies caused by hematopoiesis depression of various etiology is the transplantation of bone marrow hematopoietic cells. However its realisation requires an accurate donor selection for histocompatibility and it is possible, mainly, between the twins and siblings. Using of HEL cells for transplantation might be more perspective, since they are characterised by a high content of hematopoietic stem cells and low immunogenic activity. The latter is based, mainly, on results of clinical application. At the same time the composition of lymphoid cells and immunological activity of HEL cells, and action of low temperatures on these indices are poorly investigated.

действия низких температур на эти показатели мало изучены.

Цель настоящей работы – исследование фенотипа свежевыделенных и криоконсервированных КЭП человека, а также их способности вызывать иммунный ответ ЛВД при сокультивировании.

КЭП выделяли из печени эмбрионов человека 9-11 недель гестации неферментативным методом [7], адаптированным для малых объемов. Жизнеспособность свежевыделенной суспензии, оцененная по окрашиванию трипановым синим, составляла $81 \pm 4\%$. Криоконсервирование проводили под защитой 5%-го ДМСО по 3-этапной программе замораживания с начальной скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ и инициацией кристаллообразования. После хранения в низкотемпературном банке и отогрева на водяной бане при 37°C жизнеспособность суспензии составляла не менее 70%.

Деконсервированные суспензии КЭП отмывали от криозащитной среды центрифугированием 3000 об/мин 5 мин и разводили средой RPMI-1640 (содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, глутамин и HEPES) до концентрации 4×10^6 клеток/мл. ЛВД получали рутинным методом. Сокультивирование КЭП с ЛВД проводили в 96-луночных планшетах. На третий день в культуру вносили 20 мкCi/мл ^3H -тимидина и через 24 ч культивирования включение его в ДНК определяли на β -счетчике Beckman.

Имунофенотипический анализ КЭП проводили методом проточной цитометрии с применением панели моноклональных антител производства фирмы Медбиоспектр (Москва, Россия). Для иммунофенотипирования были использованы антитела кластеров CD1, CD10, CD13, CD5, CD7, CD20, CD45 и HLA-DR.

Выбор моноклональных антител был основан на том, что CD1 экспрессируется тимоцитами на ранних стадиях развития [11]. CD1 коэкспрессировался с CD7 клетками печени плодов человека [1]. CD10⁺ клетки могут образовываться *in vitro* из гемопоэтических клеток-предшественников фетальной печени человека [6] и являются предшественниками В-лимфоцитов. Таким образом, CD10, как и CD19, представляет собой маркер В-лимфоидной коммитации [4]. В работе [5] показана экспрессия CD13 и HLA-DR в клетках печени плодов человека; CD13 экспрессируется стромальными клетками [9], которые могут участвовать в развитии В-клеток. В большинстве случаев CD5⁺ фенотип ассоциируется с Т-лимфоцитами, однако в ходе эмбрионального развития он присущ зрелым В-лимфоцитам [2]. HLA-DR в организме взрослого человека, как известно, экспрессируется антигенпрезентирующими клетками и играет важную роль в иммунной

The aim of this work is to study the phenotype of freshly isolated and cryopreserved HEL cells, and their ability to generate the immune response of ADL during co-culturing.

HEL cells were obtained from human embryonic liver of 9-11 gestation weeks using non-enzymic method [7], adapted to low volumes. Viability of freshly isolated suspension, estimated by trypan blue staining, made $81 \pm 4\%$. Cryopreservation was performed under protection of 5% Me₂SO with 3-stage freezing protocol with the initial rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ and initiation of crystal formation. After storage in low temperature bank and thawing in water bath at 37°C the viability made not less than 70%.

Thawed HEL cell suspensions were washed out of cryoprotectant with centrifugation at 3000rot/min during 5 min and dilution with RPMI-1640 medium (containing 10% of embryonic calf serum, glutamin and HEPES) to concentration of 4×10^6 cells per ml. ADL were obtained by routine method. Co-culturing of HEL cells with ADL was performed in 96-wells plate. By the 3rd day 20 mCi/ml of ^3H -thymidine was introduced into culture and in 24 hrs of cultivation its inclusion in DNA was determined with Beckman β -counter.

Immunophenotypic analysis of HEL cells was performed with flow cytometry method using the set of monoclonal antibodies (Medbiospekt, Russia). For immunophenotyping we used the antibodies from the following clusters: CD1, CD10, CD13, CD5, CD7, CD20, CD45 and HLA-DR.

The choice of monoclonal antibodies was based on the fact, that CD1 is expressed by thymocytes at early development stages [11]. CD1 is co-expressed with CD7 cells of human fetal liver [1]. CD10⁺ cells can be formed *in vitro* from hemopoietic stem cells of human fetal liver [6] and are the B-lymphocyte precursors. Thus, CD10, as well as CD19, is a marker for B-lymphoid commutation [4]. In the paper [5] the expression of CD13 and HLA-DR in human fetal liver cells is shown; CD13 is expressed by stromal cells [9], which can participate in B-cells development. In most cases the CD5⁺ phenotype is associated with T-lymphocytes, but during embryonic development it is inherent to mature B-lymphocytes [2]. As it is known, HLA-DR in an adult human organism is expressed by antigen-presenting cells and plays an important role in immune reaction, mediated by CD4⁺ T-lymphocytes. CD45 is a common antigen of human lymphocytes.

Investigation results do not allow to reveal a significant expression of CD1, CD10, CD5, CD20 by both freshly isolated and cryopreserved HEL cells. CD7 expression (Table 1) was found in $0.44 \pm 0.13\%$ of cells from total HEL suspension, and about the half of CD7⁺ cells also expressed HLA-DR. HLA-DR expressed in maximum number of HEL cells: $7.72 \pm 1.38\%$. CD13⁺

реакции, опосредованной CD4⁺ Т-лимфоцитами. CD45 является общим антигеном лейкоцитов человека.

Результаты исследований не позволили выявить достоверной экспрессии CD1, CD10, CD5, CD20 как свежeweыделенными, так и криоконсервированными КЭП человека. Экспрессия CD7 (табл. 1) выявлена на 0,44±0,13% клеток тотальной суспензии КЭП человека, причём около половины CD7⁺ клеток экспрессировало также HLA-DR. HLA-DR экспрессировался на максимальном количестве КЭП человека – 7,72±1,38%. CD13⁺ клетки составили 0,57±0,12, а CD45⁺ – 2,65±0,32%. После криоконсервирования фенотипический состав КЭП не изменялся.

В табл. 2 приведены данные по включению ³H-тимидина в ДНК КЭП и ЛВД. Видно, что свежeweыделенные КЭП человека характеризуются высокой спонтанной пролиферативной активностью. Процедура криоконсервирования приводит к незначительному (p>0,05) снижению скорости включения ³H-тимидина в ДНК. Этот факт свидетельствует о высокой жизнеспособности свежeweыделенных и криоконсервированных КЭП. Вместе с тем ЛВД обладают низкой пролиферативной активностью. Внесение в культуральную среду митогена 5 мкг/мл фитогемаггутина (ФГА) приводило к 7-9-кратной стимуляции включения ³H-тимидина. Для исключения вклада спонтанной пролиферации КЭП во включение ³H-тимидина в ЛВД при постановке экспериментов по смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) КЭП человека предварительно обрабатывали митомцином. Совместное культивирование КЭП и ЛВД не вызывало стимуляции включения ³H-тимидина в ЛВД. При этом свежeweыделенные и криоконсервированные КЭП оказывали сходный эффект (табл. 2).

Результаты экспериментов по СКЛ свидетельствуют о том, что КЭП человека 9-11 недель гестации обладают слабой иммуногенной активностью, что соответствует данным [3]. Это обусловлено низким содержанием в них зрелых лимфоидных клеток, способных участвовать в реакциях иммунного ответа. Ранее нами было показано, что основную часть (более 80%) гемопоэтических КЭП человека составляют эритроидные клетки различной степени зрелости [8]. Относительно высокое процентное содержание в КЭП HLA-DR⁺ клеток, очевидно, обусловлено их экспрессией не только на лимфоидных, но и на эритроидных клетках [10]. Криоконсервирование позволяет сохранить проли-

Таблица 1. Фенотипический состав гемопоэтических КЭП
Table 1. Phenotypic composition of hemopoietic HEL cells

Фенотип Phenotype	Содержание (%) Cell content (%)	
	До криоконсервирования before cryopreservation	после криоконсервирования after cryopreservation
CD7 ⁺ HLA-DR ⁻	0,23±0,10	0,20±0,08
CD7 ⁺ HLA-DR ⁺	0,21±0,03	0,18±0,08
HLA-DR ⁺	7,51±1,35	8,23±1,12
CD13 ⁺	0,57±0,12	0,41±0,08
CD45 ⁺	2,65±0,32	2,33±0,25

cells made 0.57±0.12%, and CD45⁺ made 2.65±0.32%. Phenotypic composition of HEL cells after cryopreservation did not change.

Data on the inclusion of ³H-thymidine into DNA of HEL cells and ADL are shown in Table 2. It is seen that freshly isolated HEL cells are characterised with a high spontaneous proliferative activity. Cryopreservation procedure leads to an insignificant (p>0,05) decrease in ³H-thymidine inclusion into DNA. This fact testifies to a high viability of freshly isolated and cryopreserved HEL cells. At the same time the ADL reveal a low proliferative activity. Introduction of 5 mcg/ml of a mitogen phytohemagglutinine (PHA) resulted in a 7-9-fold stimulation of ³H-thymidine inclusion. To exclude a contribution of spontaneous proliferation of HEL cells in the inclusion of ³H-thymidine into ADL when performing the experiments on MLC the HEL cells were preliminarily processed with mitomycine. Co-culturing of HEL cells and ADL did not stimulate the ³H-inclusion to ADL. Herewith the freshly isolated and

Таблица 2. Скорость включения ³H-тимидина (имп/мин) в КЭП человека и ЛВД в СКЛ
Table 2. Rate of ³H-thymidine inclusion (imp/min) into HEL cells and ADL in MLC

Условия эксперимента Experiment conditions	Скорость включения ³ H-тимидина ³ H-thymidine inclusion rate
Свежeweыделенные КЭП Freshly isolated HEL cells	7187±820
Криоконсервированные КЭП Cryopreserved HEL cells	5844±694
ЛВД ADL	1069±112
ЛВД после обработки ФГА ADL after PHA treatment	7815±195
СКЛ со свежeweыделенными КЭП MLC with cryopreserved HEL cells	329±102
СКЛ с криоконсервированными КЭП MLC with cryopreserved HEL cells	364±140

феративную активность КЭП человека, не влияет на ее фенотип и иммунологическую активность.

Литература

1. *Barcena A, Muench M.O., Galy A.H., et al.* Phenotypic and functional analysis of T-cell precursors in the human fetal liver and thymus: CD7 expression in the early stages of T- and myeloid-cell development // *Blood.*— 1993.— Vol.82 (11).— P. 3401-3414.
2. *Foussat A., Balabanian K., Amara A., et al.* Production of stromal cell-derived factor 1 by mesothelial cells and effects of this chemokine on peritoneal B lymphocytes // *Eur. J. Immunol.*— 2001.— Vol. 31(2).— P. 350-359.
3. *Lindton B., Markling L., Ringden O., et al.* Mixed lymphocyte culture of human fetal liver cells // *Fetal Diagnosis and Therapy.*— 2000.— 15.— P. 71-78.
4. *Miller J.S., McCullar V., Punzel M., et al.* Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells // *Blood.*—1999.— Vol.93 (1).— P. 96-106.
5. *Muench M.O., Roncarolo M.G., Namikawa R.* Phenotypic and functional evidence for the expression of CD4 by hematopoietic stem cells isolated from human fetal liver // *Blood.*— 1997.— Vol. 89 (4).— P. 1364-1375.
6. *Muench M.O., Humeau L., Paek B., et al.* Differential effects of interleukin-3, interleukin-7, interleukin 15, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the generation of natural killer and B cells from primitive human fetal liver progenitors // *Exp. Hematol.*— 2000.— Vol.28 (8).— P. 961-973.
7. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N.* Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // *Analytical Biochemistry.*— 1991.— Vol. 194.— P. 325-329.
8. *Tarasov A.I., Petrenko A.Yu., Jones D.R.E., and Grischenko V.I.* Phenotypic Analysis and Colony-Forming Activity of Cryopreserved Human Fetal Liver Hematopoietic Cells // *Experimental Oncology.*— 2002.— Vol. 24(3).— P. 180-183.
9. *Turner C.W., Archer D.R., Wong J., Yeager A.M., Fleming W.H.* In utero transplantation of human fetal haemopoietic cells in NOD/SCID mice // *Br. J. Haematol.*— 1998.— Vol. 103 (2).— P. 326-334.
10. *Trebichavsky I., Nyklicek O.* Expression of HLA-DR molecules and some other differentiation antigens within early human fetus // *Folia Biol (Praha).*— 1992.— Vol.38 (5).— P. 269-276.
11. *Vanhecke D., Leclercq G., Plum J., Vandekerckhove B.* Characterization of distinct stages during the differentiation of human CD69⁺CD3⁺ thymocytes and identification of thymic emigrants // *J. Immunol.*— 1995.— Vol.155 (4).— P.1862-1872.

Поступила 24.12.2002

cryopreserved HEL cells did the same effect (Table 2).

Experimental results on MLC testify to the fact, that HEL cells of 9-11 gestation weeks possess a low immunogenic activity, corresponding to the data in the paper [3]. It results from a low content in HEL cells of mature lymphoid cells, capable of participating in immune responses. In our previous studies [8] we showed that the erythroid cells of various maturation stage were the main part (more than 80%) of HEL hematopoietic cells. Relatively high percentage of HLA-DR⁺ cells in HEL suspensions is evidently caused by expression of this antigen not only in lymphoid cells but also in erythroid ones [10]. Cryopreservation allows to keep the proliferative activity of HEL cells, and does not affect their phenotype and immunological activity.

References

1. *Barcena A, Muench M.O., Galy A.H., et al.* Phenotypic and functional analysis of T-cell precursors in the human fetal liver and thymus: CD7 expression in the early stages of T- and myeloid-cell development // *Blood.*— 1993.— Vol.82 (11).— P. 3401-3414.
2. *Foussat A., Balabanian K., Amara A., et al.* Production of stromal cell-derived factor 1 by mesothelial cells and effects of this chemokine on peritoneal B lymphocytes // *Eur. J. Immunol.*— 2001.— Vol. 31(2).— P. 350-359.
3. *Lindton B., Markling L., Ringden O., et al.* Mixed lymphocyte culture of human fetal liver cells // *Fetal Diagnosis and Therapy.*— 2000.— 15.— P. 71-78.
4. *Miller J.S., McCullar V., Punzel M., et al.* Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells // *Blood.*—1999.— Vol.93 (1).— P. 96-106.
5. *Muench M.O., Roncarolo M.G., Namikawa R.* Phenotypic and functional evidence for the expression of CD4 by hematopoietic stem cells isolated from human fetal liver // *Blood.*— 1997.— Vol. 89 (4).— P. 1364-1375.
6. *Muench M.O., Humeau L., Paek B., et al.* Differential effects of interleukin-3, interleukin-7, interleukin 15, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the generation of natural killer and B cells from primitive human fetal liver progenitors // *Exp. Hematol.*— 2000.— Vol.28 (8).— P. 961-973.
7. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N.* Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // *Analytical Biochemistry.*— 1991.— Vol. 194.— P. 325-329.
8. *Tarasov A.I., Petrenko A.Yu., Jones D.R.E., and Grischenko V.I.* Phenotypic Analysis and Colony-Forming Activity of Cryopreserved Human Fetal Liver Hematopoietic Cells // *Experimental Oncology.*— 2002.— Vol. 24(3).— P. 180-183.
9. *Turner C.W., Archer D.R., Wong J., Yeager A.M., Fleming W.H.* In utero transplantation of human fetal haemopoietic cells in NOD/SCID mice // *Br. J. Haematol.*— 1998.— Vol. 103 (2).— P. 326-334.
10. *Trebichavsky I., Nyklicek O.* Expression of HLA-DR molecules and some other differentiation antigens within early human fetus // *Folia Biol (Praha).*— 1992.— Vol.38 (5).— P. 269-276.
11. *Vanhecke D., Leclercq G., Plum J., Vandekerckhove B.* Characterization of distinct stages during the differentiation of human CD69⁺CD3⁺ thymocytes and identification of thymic emigrants // *J. Immunol.*— 1995.— Vol.155 (4).— P.1862-1872.

Accepted in 24.12.2002