



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО
„АКАД. К. БРАТАНОВ”

Надя Емилова Петрова

ИЗОЛИРАНЕ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ОВАРИАЛНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Специалност: „Развъждане на селскостопански животни, биология и биотехника на размножаването”, шифър 04.02.01.

Научен ръководител: доц. Пламен Тодоров, дбн

София, 2019 г.

Дисертационният труд е написан на 121 страници и включва 28 фигури и 8 таблици. В библиографския списък са цитирани 161 литературни източника, от които 4 на кирилица и 157 на латиница.

Научно жури:

Вътрешни членове:

Доц. д-р Пламен Тодоров, дбн
Доц. д-р Росен Стефанов, дб

Външни членове:

Проф. д-р Стайка Лалева, дсн
Проф. Живко Кръстанов, дсн
Доц. Янчо Тодоров, дб

Резервни членове:

Доц. д-р Бойко Георгиев, дб- вътрешен член
Проф. Маргарита Генова, дм- външен член

Защитата на дисертационния труд ще се състои на от часа в заседателната зала на Института по биология и имунология на размножаването. Материалите по защитата се намират на разположение в библиотеката на ИБИР-БАН.

Настоящите проучвания са частично финансирани по проекти:

„Изследване експресията на мезенхимни и плурипотентни стволово-клетъчни маркери и опити за насочена диференциация на клетки, изолирани от фоликуларна течност.“ (Договор ДФНП-172) по „Програма за подпомагане на младите учени в БАН“;

„Получаване, характеризиране и ин-витро диференциация на овариални стволови клетки“ (Договор ДФНИ – Б – 01/10) към Фонд „Научни изследвания“ към Министерство на Образованието и науката (МОН).

Забележка: Номерата на фигурите и таблиците не съответстват на тези в дисертационния труд. Пълният списък на цитираните литературни източници е достъпен в дисертационния труд.



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО
„АКАД. К. БРАТАНОВ”

Надя Емилова Петрова

ИЗОЛИРАНЕ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ОВАРИАЛНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Специалност: „Развъждане на селскостопански животни, биология и биотехника на размножаването”, шифър 04.02.01.

Научен ръководител: доц. Пламен Тодоров, дбн

София, 2019 г.

СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА

- BMP (Bone morphogenetic protein) - костни морфогенни протеини
- CD (Cluster of differentiation) - клъстър на диференциация
- ESC (Embryonic stem cells) - ембрионални стволови клетки
- FBS (Fetal Bovine Serum) - фетален говежди серум
- FITC (Fluorescein isothiocyanate) - флуоресцин изоцианат
- FSH (Follicle stimulating hormone) - фоликулостимулиращ хормон
- FSHR (Follicle stimulating hormone receptor) – рецептор за фоликулостимулиращ хормон
- GCs (granulosa cells) - гранулозни клетки
- ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) - интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоид
- MSC (Mesenchymal stem cells) - мезенхимни стволови клетки
- Oct3/4 (Octamer-binding transcription factor 3/4) - Октамер-свързан транскрипционен фактор
- OCs (ovarian cells) – овариални клетки
- PI (Propidium Iodide) - пропидиев йодид
- SC (Stem cells) - стволови клетки
- SCID (Severe combined immunodeficiency) - тежък комбиниран имунодефицит
- Sox-2 (SRV-related HMG-box-2) - транскрипционен фактор, свързан с регулацията на ембрионалното развитие
- SSEA (Stage specific embryonic antigen) - стадий-специфичен ембрионален антиген
- VSELs (Very small embryonic-like stem cells) - много малки ембрионално-подобни стволови клетки

ВЪВЕДЕНИЕ

Демографската криза (както в България, така и в повечето Европейски страни) е сред силно дебатираните и значими проблеми в съвременното общество. Според доклад на ООН през 2050 г. населението в България ще бъде с 27,9 % по-малко от това през 2015 г. Намалването на тази тенденция е от социално и икономическо значение. Проблемът се задълбочава от факта, че все повече двойки имат репродуктивни трудности. Сред основните фактори за женски стерилитет е намаленият яйчников резерв при пациентки в напреднала възраст или такива, преминали курс на химио/лъчетерапия. При тях се наблюдава липса на ооцити, отклонения в оплождането и/или развитието на предимплантационните ембриони. Медицината все още не успява да разреши всички проблеми, свързани с безплодието.

От друга страна развитието в областта на стволовите клетки дава надежди за много жени да се сдобият с дете. Тези неспециализирани популации могат да се самообновяват или диференцират в нови клетъчни линии като този баланс се поддържа от сложна мрежа от вътрешни (напр. ядрени транскрипционни фактори) и външни фактори (междуклетъчни контакти, растежни фактори и др.). Отговорни са за правилното ембрионално развитие, растежа и поддържане на хомеостазата в организма. Последни данни сочат, че тези уникални клетки могат да бъдат открити в почти всички органи и системи (както при човек, така и при животни) и представляват естествен физиологичен механизъм за справяне с уврежданията на местно ниво. Там тяхната съдба се регулира от средата (т. нар. стволовоклетъчна ниша).

Съществуващата до скоро догма в репродуктивната биология отхвърляше категорично възможността във възрастни яйчници при бозайници да има стволови клетки. Според нея овариалният резерв се формира през пренаталния период и намаляването на съществуващия при раждането пул ооцити не може да бъде компенсирано. От филогенетична гледна точка горното твърдение изглежда противоречиво. Според еволюционната биология не би трябвало женските бозайници (вкл. и хората) да развият такъв ретрогресивен репродуктивен механизъм, който да изисква запазването на техните гамети от феталния им период в продължение на няколко десетилетия. Такова съхранение би довело до натрупване на спонтанни или предизвикани от околната среда промени на ооцитите в „почиващите си” първични фоликули. През последните години в научната общност започнаха бурни дебати по отношение на съществуването на овариалните стволови клетки. Тези неспециализирани популации биха могли да се използват както за получаване на нови яйцеклетки, така и за моделни системи за тестване на медикаменти, изясняването на сложни процеси и др. Темата е от значение както за хуманната медицина, така и за животновъдството и екологията, тъй като биха могли да се изготвят протоколи за *in vitro* получаване на яйцеклетки на ценни или изчезващи видове. Въпросът е актуален, но и дискуссионен и налага допълнителни по-задълбочени изследвания.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

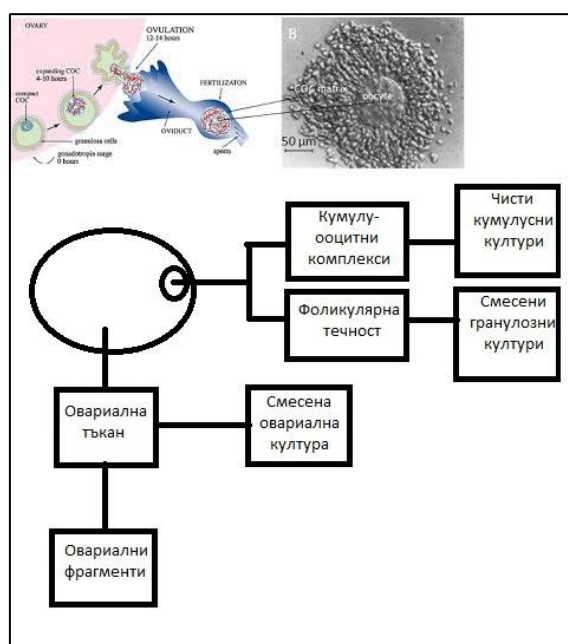
Целта на настоящата дисертационна работа е да се установи наличието на стволови клетки в яйчника и да се направят опити тези клетки да се характеризират.

Така поставената цел предполага решението на следните основни **задачи**:

1. Да се получат и характеризират клетъчни култури от различни участъци на човешки и животински яйчници.
2. Да се оптимизират методите за култивиране на овариални клетки.
3. Да се усъвършенстват техниките за криоконсервация на овариални клетки с цел стокиране на достатъчно проби за настоящи и бъдещи изследвания.
4. Да се изследва наличието на мезенхимни стволови клетки в яйчника и да се проучи способността им за диференциация в различни клетъчни типове.
5. Да се провери експресията на маркери за плурипотентност от овариални клетки.
6. Да се сравнят характеристиките на овариалните стволови клетки с тези на стволови клетки, изолирани от други източници

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследванията бяха проведени през периода 2012 – 2018 г. Като опитен материал бе използвана овариална тъкан от човек (получена при планови операции в МБАЛ „Софиямед“, Университетска болница СБАЛАГ „Майчин дом“ и МБАЛ „Доверие“), зайци (Калифорнийска порода) и плъхове (Wistar), както и човешки гранулозни клетки от фоликуларни аспирати и кумулусни клетки, изолирани от кумулус-ооцитни комплекси (получени при *in vitro* процедури в „Медицински Център Димитров“) (фиг.1). Всички изследвания върху човешки материал бяха осъществявани след подписване на информирано съгласие от страна на пациентите и с разрешение от Комитета по медицинска етика.



Фиг. 1 Изследователски материал

Експериментите са осъществени чрез използване на следните методики:

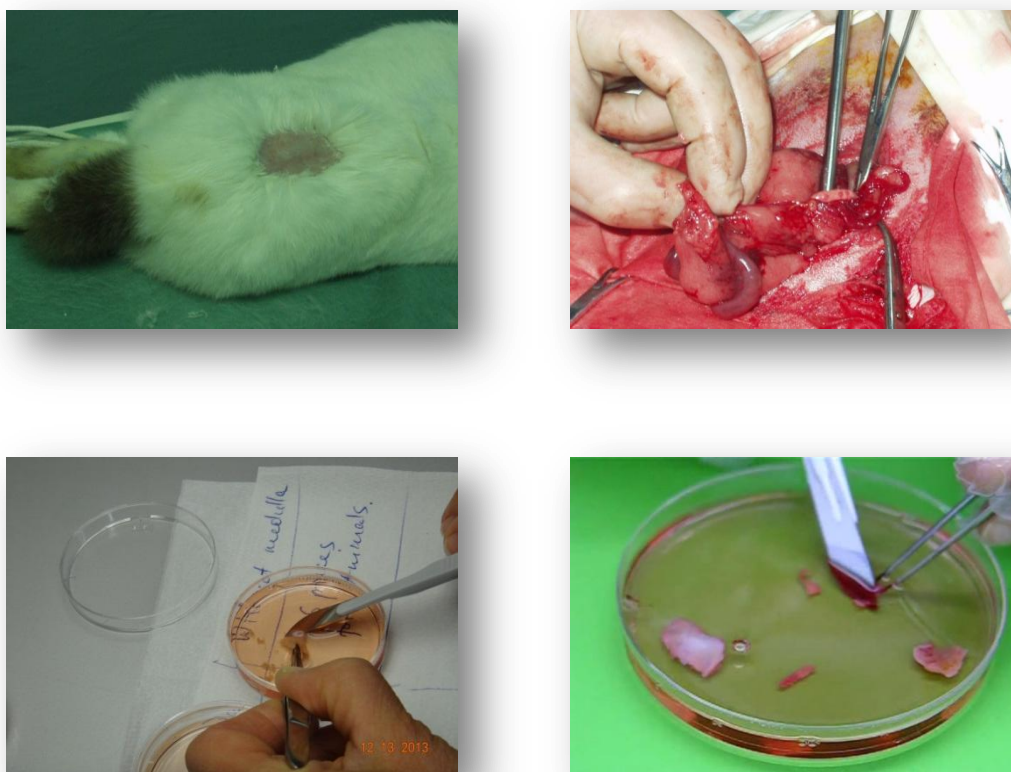
- Култивиране на клетки и тъкан
- Криоконсервация
- Ко-култивиране
- Обработка на гамети
- Ксенотрансплантация на човешка овариална тъкан на SCID-мишки
- Морфологични изследвания
- Флоуцитометрия
- Диференциация

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Получаване и култивиране на овариални клетки

1.1. Получаване на първични клетъчни култури

Първичните клетъчни култури бяха получени от тъкан и фрагменти от човешки (n=71), плъши (n=16) и заешки (n=9) яйчници, фоликуларни аспирати (n=43) и кумулус-ооцитни комплекси (n=7). При използване на овариална тъкан експлантите бяха нарязвани и дисоцирани ензимно (чрез инкубация с колагеназа тип 1А) и впоследствие механично (тритуирани през игла) (*фиг. 2*).



Фиг. 2 Подготовка на овариалната тъкан

За да няма компрометиране на резултатите, в настоящия дисертационен труд са използвани само проби, при биопсията на които не бе установено наличие на злокачествени образувания и малигнени клетки.

Гранулозните клетки бяха получавани по два начина- чрез обработка на фоликуларните аспирати (смесена гранулозна култура) или при денудация на кумулус-ооцитни комплекси (чиста кумулусна култура).

Аспиратите съдържат разнообразие от клетки - еритроцити, бели кръвни клетки, дендритни клетки, фибробласти, епителни, тека-клетки и др. Получените клетъчни

култури след обработка на фоликулярната течност бяха със смесен характер. С цел избягване на попадане на голямо количество еритроцити в пробите, използвахме обработка през градиент (Фикол).

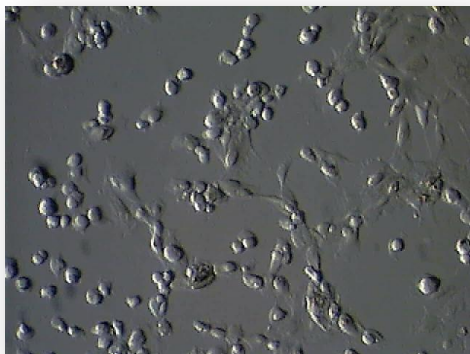
С цел получаване на чиста култура от кумулусни клетки, те бяха механично и ензимно (хиалуронидаза) отделяни от яйцеклетката (т.нар. денудация). Процесът стандартно се прилага при ICSI (инжектиране с помощта на микроманипулатор на един сперматозоид в цитоплазмата на яйцеклетката) процедурата. Той е необходим, за да се визуализира полярното телце и да може правилно да се ориентира ооцита преди инжектиране на сперматозоида, както и да се избягне запушване на микропипетите от гранулозните клетки по време на ICSI. Недостатъци на метода са по-трудна достъпност на материала и по-малко количество добити клетки в сравнение с гранулозните клетки от фоликулярна течност.

Човешките овариални проби (тъкан, фоликулярна течност и кумулусни клетки) бяха получени след подписано информирано съгласие от пациентките и разрешение на Комитета по медицинска етика.

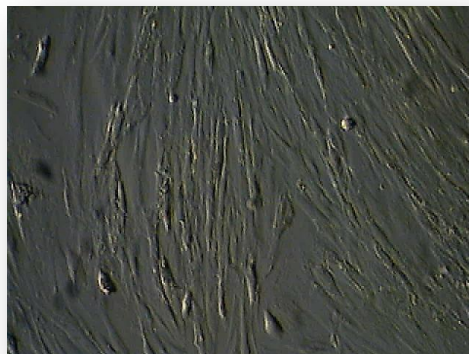
Първите няколко дни от култивирането сменяхме хранителната среда ежедневно, за да отстраним мъртвите, неприкрепили се клетки и еритроцитите, а след това - на всеки 2-3 дни.

1.2. Характеристики на овариалните култури

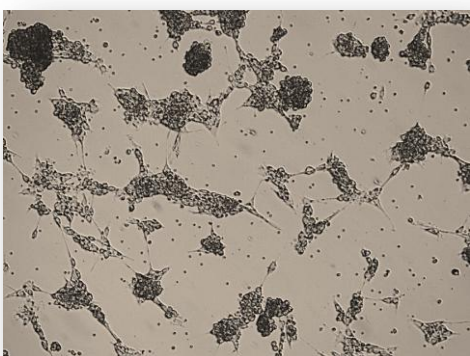
Клетките бяха посяти в концентрация 1×10^5 . Използвахме тази концентрация, тъй като има данни, че при култивиране в по-голяма гъстота (1×10^6) при говежди гранулозни клетки се наблюдават процеси на диференциация и изменения в генния профил (*Baufeld A. and Vanselow J., 2018*). В хода на експерименталната работа бе установено, че за едно денонощие след посяването на овариалните клетки (смесена овариална и гранулозна култура и кумулусна култура), те се прикрепваха към дъното на културалния съд. Наблюдавахме конfluентност на около 11-13 ден от култивирането. Прави впечатление, че след трипсинизация плътен монослой се достигаше по-рано - на 8-10 ден. На базата на тези резултати можем да обобщим, че изолираните от нас клетки се характеризират с умерена пролиферативна активност (*фиг. 3*).



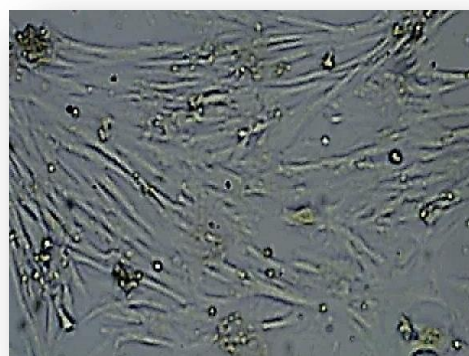
A1)



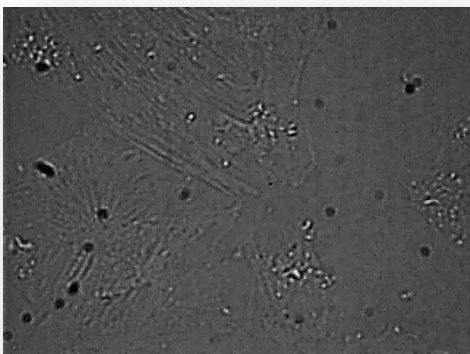
A2)



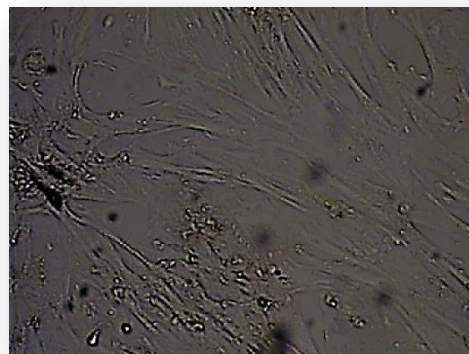
B1)



B2)



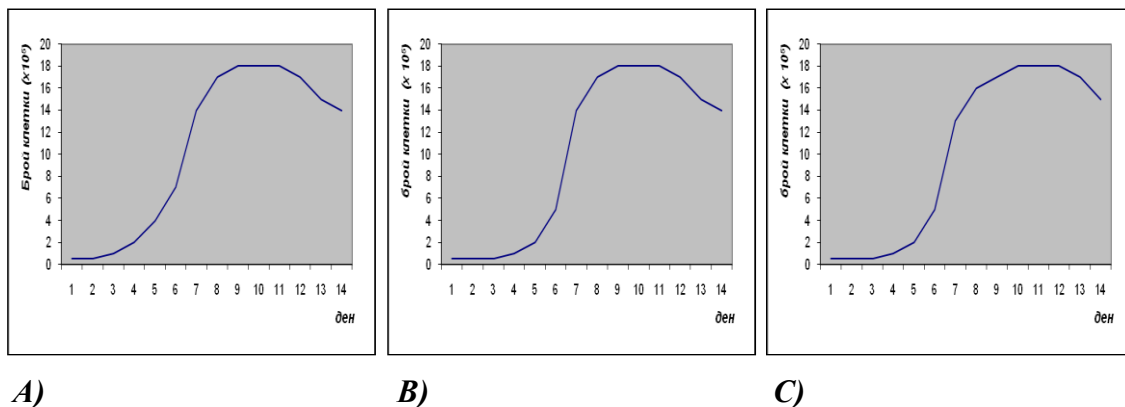
C1)



C2)

Фиг. 3 *А) Първична смесена овариална клетъчна култура А1) Четвърти ден от култивирането (50x) А2) Единадесети ден от култивирането (50x)
В) Гранулозни клетки от фоликулярни аспирати- В1) на трети ден от култивирането (50x) и В2) на девети ден от култивирането (50x), и
С) Кумулусни култури, получени чрез денудация- С1) на пети ден от култивирането (100x) и С2) на тринадесети ден от култивирането (50x)*

Растежната крива беше типична S-образна. Първите 3-4 дни наблюдавахме период на бавен растеж. Логаритмичната фаза бе на 5-6 ден. На 9-11 ден отчетохме плато. След 12-я ден се наблюдаваше намален пролиферативен потенциал. (фиг. 4)

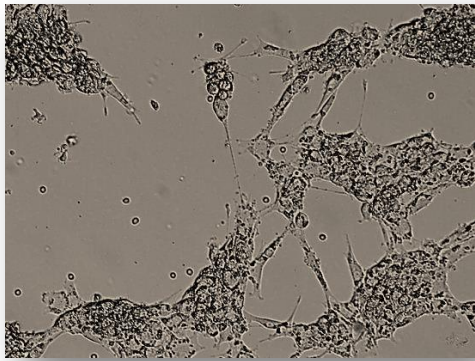


Фиг. 4 Растежна крива на първични култури - смесени овариални клетки (A), гранулозни клетки от фоликуларни аспирати (B) и кумулусни клетки (C)

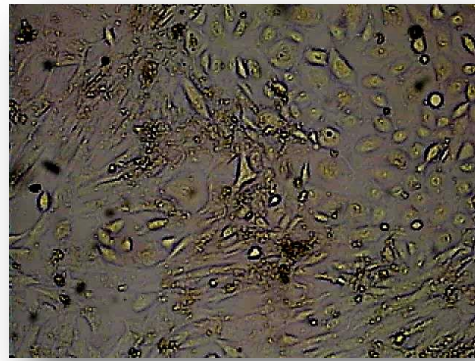
В първичните овариални култури клетките бяха с хетерогенна морфология (епителоидни и фибробластоподобни). Цитоплазмата им бе силно гранулирана, което вероятно се дължи на повишена секреторна активност. В повечето случаи клетките растяха на колонии, по-рядко по единично. В центъра на колониите клетките нямаха ясно изразена граница.

В хода на култивирането на първичните култури наблюдавахме миграция на клетки извън колониите. Отчетена бе и промяна и в морфологията на клетките като от звездовидни клетки с дълги, разклоняващи се цитоплазмени израстъци те придобиваха фибробластоподобна форма (фиг. 5). Подобни процеси бяха наблюдавани и при плъщите и заешки овариални култури (фиг. 6). Други учени също отчитат епително-мезенхимен преход при *in vitro* култивиране на овариални клетки (Zhu Y. et al., 2010; Bukovsky A., 2011).

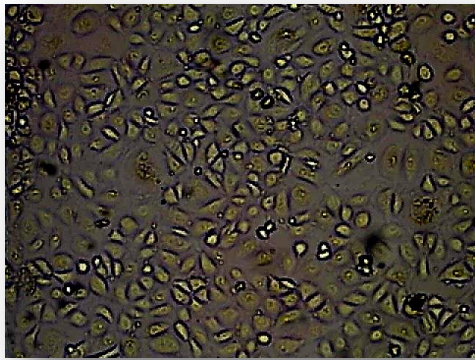
При продължително култивиране освен фибробластоподобни клетки можеха да се видят и отделни епителоидни популации (фиг.5, C). Колонии с подобна морфология се наблюдават и от други учени, като някои от тях могат да се поддържат *in vitro* при над 130 пасажа в продължение на година (Ai A. et al., 2019).



A)



B)

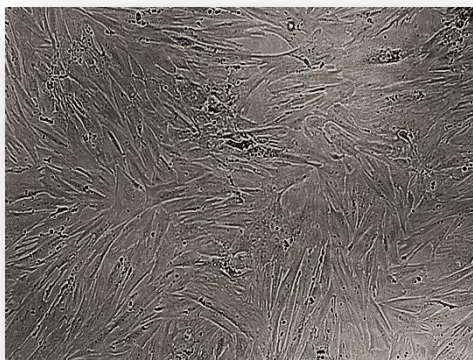


C)

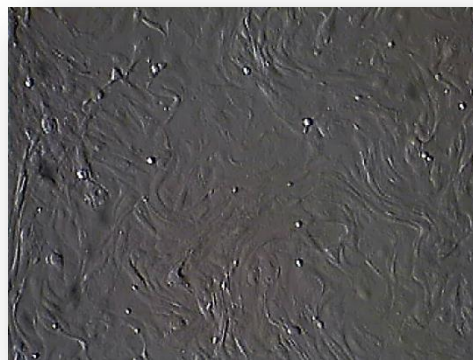


D)

Фиг. 5 Гранулозни клетки (смесена култура) A) клетки с цитоплазмени израстъци (200x), B) хетерогенност на културата (50x), C) епителoidна форма (100x), D) фибробластоподобна форма (50x)



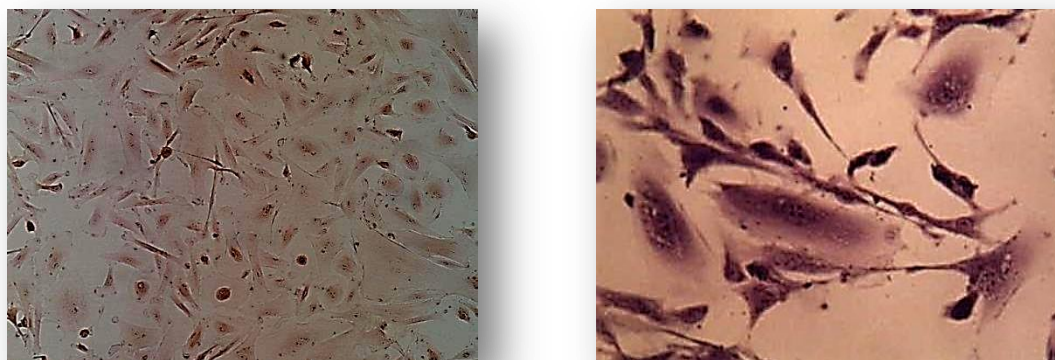
A)



B)

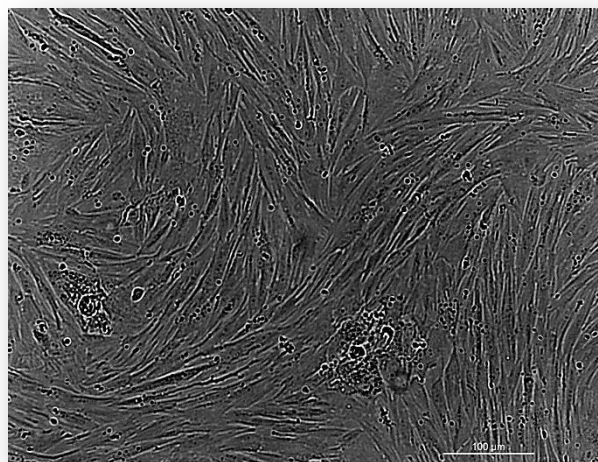
Фиг. 6 Плъши (A) и заешки (B) овариални клетки с фибробластоподобна форма (100x)

След оцветяване с хематоксилин-еозин наблюдавахме полигонални клетки с големи ядра и сравнително голямо ядрено-цитоплазмено съотношение, което свидетелства за ниска степен на диференциация (*фиг. 7*). Хематоксилинът оцветява киселите структури (ядро, ядръце и др.) в синьо-виолетово, а еозинът маркира алкалните белтъци на цитоплазмата в розово.



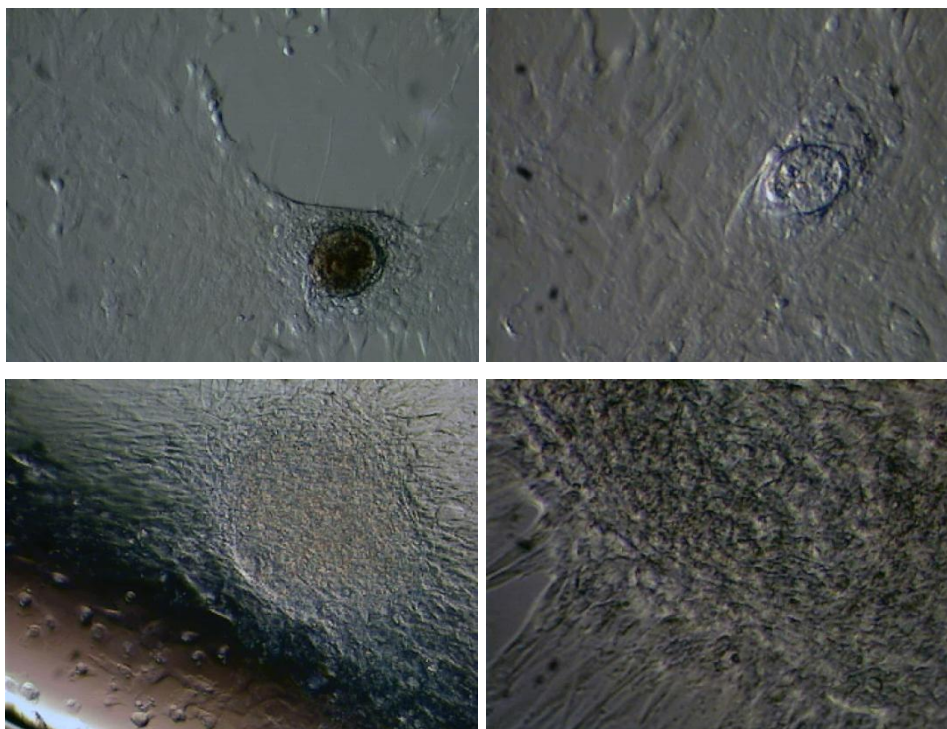
Фиг. 7 Овариални клетки, оцветени с хематоксилин-еозин. (100x)

Интересен беше фактът, че конфлуентният монослой се характеризираше със специфични за мезенхимните стволови клетки „класообразни“ завихрения (*Фиг. 8*).



Фиг. 8 "Класообразни" завихрения (100x)

При някои от смесените овариални култури наблюдавахме спонтанно образуване на колонии, подобни на тези които образуват ембрионалните стволови клетки (*фиг. 9*):



Фиг.9 Колонообразуваща активност (50x, 50x, 100x, 400x)

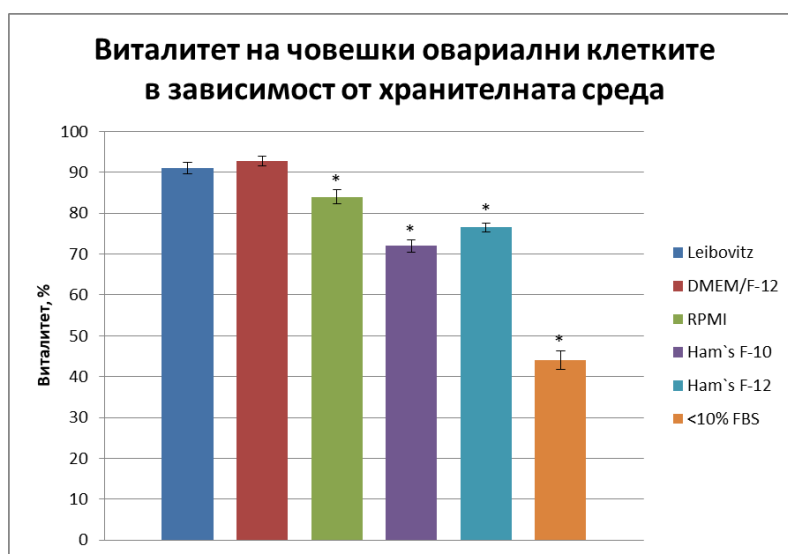
Gong и екипът му също съобщават за образуване на колонии от клетки с характеристики на ембрионалните стволови клетки, получени от миши яйчници (*Gong S.P. et al., 2010*).

1.3. Оптимизиране на условията на култивиране на овариалните клетки

1.3.1. Изследване на различни среди за култивиране

С цел оптимизиране на културалните условия тествахме влиянието на различни хранителни среди (Leibovitz, DMEM/F-12, RPMI, Ham`s F-10, Ham`s F-12) върху пролиферативната способност и виталност на клетките. За целта бяха използвани човешки (n=6), плъши (n=6) и заешки (n=6) смесени овариални култури. Изолираните клетки бяха посяти в еднаква концентрация (1×10^5) и култивирани в отделните среди (обогатени с 10% FBS и пеницилин/стрептомицин) при еднакви други условия. За определяне на пролиферацията използвахме растежна крива и времето за достигане на плътен монослой. Виталитетът на клетките бе изчисляван след оцветяването им с трипаново синьо. Най-добри резултати по отношение на жизнеспособността и пролиферативната активност отчетохме при средите DMEM/F-12 ($92,8 \pm 1.17\%$ витални клетки) и Leibovitz ($91 \pm 1,41\%$ витални клетки), като плътен монослой се образуваше след около 11-13 дни (първична култура) и 8-10 дни (след трипсинизиране). Добри (макар и малко по-ниски) стойности бяха регистрирани при клетките култивирани с

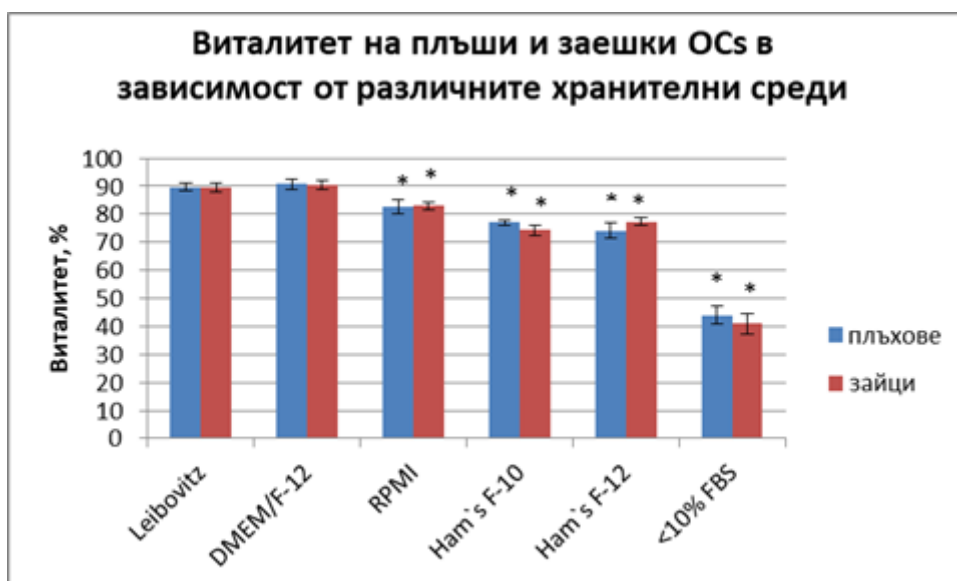
RPMI ($84 \pm 1,79\%$ виталност). Хранителните среди Ham`s F-10 ($72 \pm 1,54\%$ виталност) и Ham`s F-12 ($76,5 \pm 1,05\%$ виталност) не дадоха задоволителни резултати, като клетките по-бавно достигаха плътен монослой (за около 16-17 дни при първична култура). Изследвахме също така влиянието на концентрацията на FBS върху популациите. Култивирането в безсерумна среда или съдържаща по-малко от 10% FBS доведе до понисък процент адхезирали клетки, високо ниво на апоптоза и изменения във формата. При увеличаването му над 10% в средата за култивиране не наблюдавахме увеличаване скоростта на пролиферация на културата. От друга страна е известно, че наличието на високи концентрации серум в средата за култивиране би могло да е фактор за диференциация на клетките. Статистически достоверна разлика наблюдавахме между виталността на клетките, култивирани в Leibovitz и DMEM/F-12, спрямо останалите хранителни среди ($p < 0,05$). Няма статистически достоверна разлика между жизнеността на клетките, инкубирани в Leibovitz, спрямо тези в DMEM/F-12 (Фиг. 10).



Фиг. 10 Виталност на човешките овариалните клетки (смесена култура), култивирани в различни хранителни среди; Статистически достоверна разлика наблюдавахме между виталността на клетките при култивиране в Leibovitz и DMEM/F-12, спрямо останалите хранителни среди ($p < 0,05$). Няма статистически достоверна разлика между жизнеността на клетките, инкубирани в Leibovitz, спрямо тези в DMEM/F-12.

При плъшите и заешките култури наблюдавахме подобни резултати. Клетките проявяваха най-добра пролиферативна активност и бяха с най-висок процент жизненост при култивиране в среда DMEM/F-12 и Leibovitz (фиг. 11).

Получените резултати ни дадоха основание да предложим DMEM/F-12 и Leibovitz като подходяща среда за култивиране на човешки и животински овариални клетки.

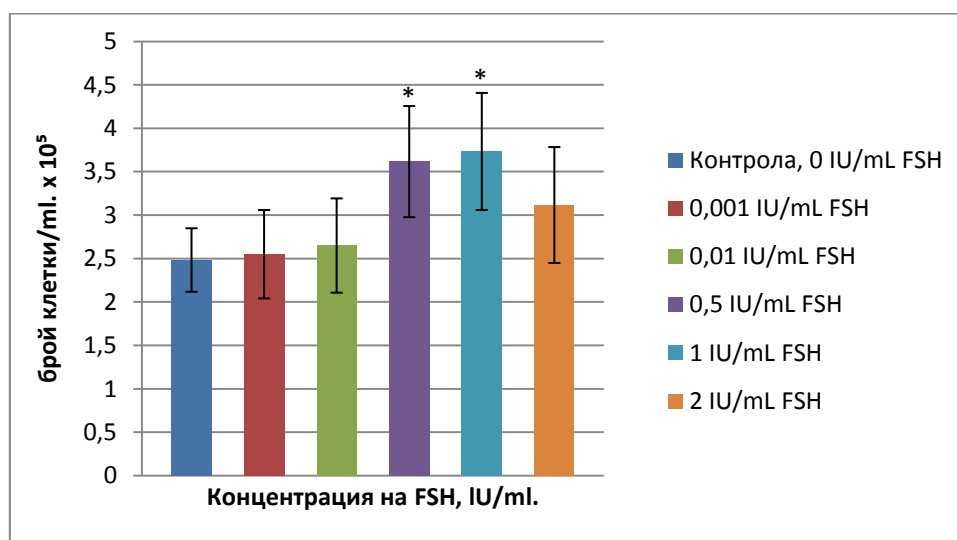


Фиг. 11 Виталност на пльши и заешки ОСs, култивирани в различни хранителни среди. Статистически достоверна разлика наблюдавахме между виталността на клетките, култивирани в Leibovitz и DMEM/F-12, спрямо останалите хранителни среди ($p < 0,05$). Няма статистически достоверна разлика между жизнестотността на клетките, инкубирани в Leibovitz, спрямо тези в DMEM/F-12.

1.3.2. Влияние на FSH върху пролиферацията на овариалните клетки (смесена култура) в *in vitro* условия

Фоликулостимулиращият хормон (FSH) се отделя от хипофизата и играе ключова роля в контролиране на функцията на мъжката и женската полова система. Действа чрез свързване със своя специфичен рецептор FSHR, който е член на силно консервативната суперфамилия G-protein coupled receptor (GPCR) (Ulloa-Aguirre A. *et al.*, 2018). Той се експресира от гранулозните клетки. Тези рецептори липсват в примордиалните фоликули (тогава те по-малко реагират на ендокринната система) и се появяват в първичните. Рецепторите регулират растежа и зреенето на фоликулите, пролиферацията на GC и индуцират необходимите ензими за конвертирането на андрогените от тека клетките в естроген (Qin N. *et al.*, 2015). Известни са четири изоформи на FSHR. От тях биологично активни са FSHR1 и FSHR3 (Bhartiya D. *et al.*, 2016). Първият е 75 kDa G-протеин, който се експресира от гранулозните клетки на зреещите фоликули. Той участва в стероидогенезата по пътя на cAMP сигналната трансдукция. Докато FSHR3 е 39 kDa протеин, характерен за епителните и гранулозните клетки (Patel H. *et al.*, 2013). Има данни, че овариалните стволови клетки в *in vitro* условия също се повлияват от действието на фоликулостимулиращия хормон (Parte S. *et al.*, 2013).

Гранулозни клетки от фоликулярна течност бяха култивирани в DMEM/F-12 (суплементирани с 10% FBS) с добавени различни концентрации FSH (0,001-2 IU/ml) при стандартни други условия. В контролата клетките бяха култивирани само в клетъчната среда без добавен хормон. На петия ден клетките бяха преброявани чрез броителна камера. Отчетохме увеличаване на пролиферацията при популациите, култивирани с 0,5 IU/ml FSH, спрямо тези без добавен хормон. Установихме също така забавяне на процесите на дедиференциация. Резултатите бяха най-добри при използване на 1 IU/ml FSH. Клетките достигаха плътен монослой за около 11-12 дни. При ниски концентрации на хормона (0,001 и 0,01 IU/ml) не установихме различия в темповете на клетъчна пролиферация, както и в морфологията спрямо контролата. Известно е, че FSH стимулира увеличаването на диаметъра на фоликулите *in vivo*, както и стимулира пролиферацията на гранулозните клетки в клетъчни култури (Chang H. M. et al., 2016). При по-големи концентрации на хормона (2 IU/ml) наблюдавахме намаляване на пролиферацията на клетките в сравнение с 1 IU/ml и липса на статистическа достоверност спрямо контролата (фиг. 12).



Фиг. 12 Влияние на добавянето в средата за култивиране на FSH върху пролиферацията на гранулозни клетки от фоликулярни аспирати ($p < 0,01$)

След по-дълготрайно култивиране и особено след трипсинизиране наблюдавахме процеси на дедиференциация на клетките независимо от добавянето на FSH.

1.4. Изследване влиянието на овариални клетки (смесена култура) в система за ко-култивиране.

Ко-култивирането е често използван метод за отчитане взаимодействия между различни клетъчни популации. Известно е, че отделните клетки в системата модифицират хранителната среда като вероятните процеси, които протичат са отделяне на цитокини, растежни фактори, биологично активни молекули, хормони, хранителни вещества; детоксикация на културалната среда чрез хелация на йони на тежки метали; подобряване на физико-химични показатели и др. В литературата се срещат данни за повишаване на успеваемостта на имплантация и бременност при ембриони, които са били ко-култивирани с кумулусни клетки. (*Bhadarka H. et al., 2017*). Използва се също така ко-култивиране на различни стволови клетки, репродуктивни клетки със SC и др.

За да проследим функционалната активност на овариалните клетки (смесена култура), те бяха ко-култивирани с предватително изолирана подвижна фракция човешки сперматозоиди и с помощта на Sperm Class Analyser (Microoptic, Spain) беше проследена подвижността на мъжките гамети през определени часови интервали (0 ч., 3 ч., 6 ч., 12 ч., 24 ч., 36 ч., 72 ч., 95 ч., 120 ч.). За целта човешки нормоспермични еякулати (n=10) бяха обработени през плътностни градиенти (*SupraSperm System, Medicult*). По този начин бяха отстранени семиналната плазма, левкоцитите, неподвижните и морфологично увредени сперматозоиди. След достигане на плътен монослой на овариалните клетки към тях прибавяхме получената подвижна фракция сперматозоиди. В контролната група обработените гамети бяха култивирани в чиста хранителна среда. Установихме, че на 2-3-я час на инкубация се увеличава общата подвижност на гаметите и в опитната, и в контролната проба (**табл. 1**). Това може да се обясни с хиперактивацията на сперматозоидите в този времеви интервал, която се подпомага от белтъчните молекули в средата за култивиране. На 6-ия час от инкубирането наблюдавахме тенденция към по-добро запазване на мотилитета на гаметите в ко-културата, а на 12-ия час отчетохме статистически достоверна разлика спрямо контролата. В опитната група се наблюдаваха единични подвижни сперматозоиди до 96-ия час, докато в контролната те запазваха мотилитета си до 76-ия час. Можем да обобщим, че ко-култивирането на сперматозоиди с овариални клетки подобрява преживяемостта и подвижността на гаметите. Подобни данни са отчетени при култивиране на сперматозоиди с кумулусни клетки (*Kalthur G. et al., 2009*). Получените резултати вероятно се дължат на отделянето от овариалните клетки на растежни фактори, гликопротеини, пептиди, стероиди и др. в културалната среда. Друг

вероятен механизъм е неутрализиране на свободните радикали в хранителната среда, към които сперматозоидите са много чувствителни.

Час	0 ч.	3 ч.	6 ч.	12 ч.	24 ч.	36 ч.	72 ч.	95 ч.	120ч.
Подвижност, %									
Контрола	89,2 ±1,1	91,3 ±1,2	82,3 ±1,4	67,5 ±1,1	54,1 ±1,0	40,1 ±0,9	8,9 ±0,8	0	0
Ко- култивиране с овариални клетки	89,2 ±1,1	91,9 ±1,8	85,7 ±1,1	70,1 ±1,3*	69,5 ±1,4**	63,7 ±2,1***	19,8 ±2,2***	единични подвижни сперма- тозоиди	0

*Табл.1: Ко-култивиране на изолирана фракция подвижни сперматозоиди от нормоспермични еякулати с човешки овариални клетки (*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).*

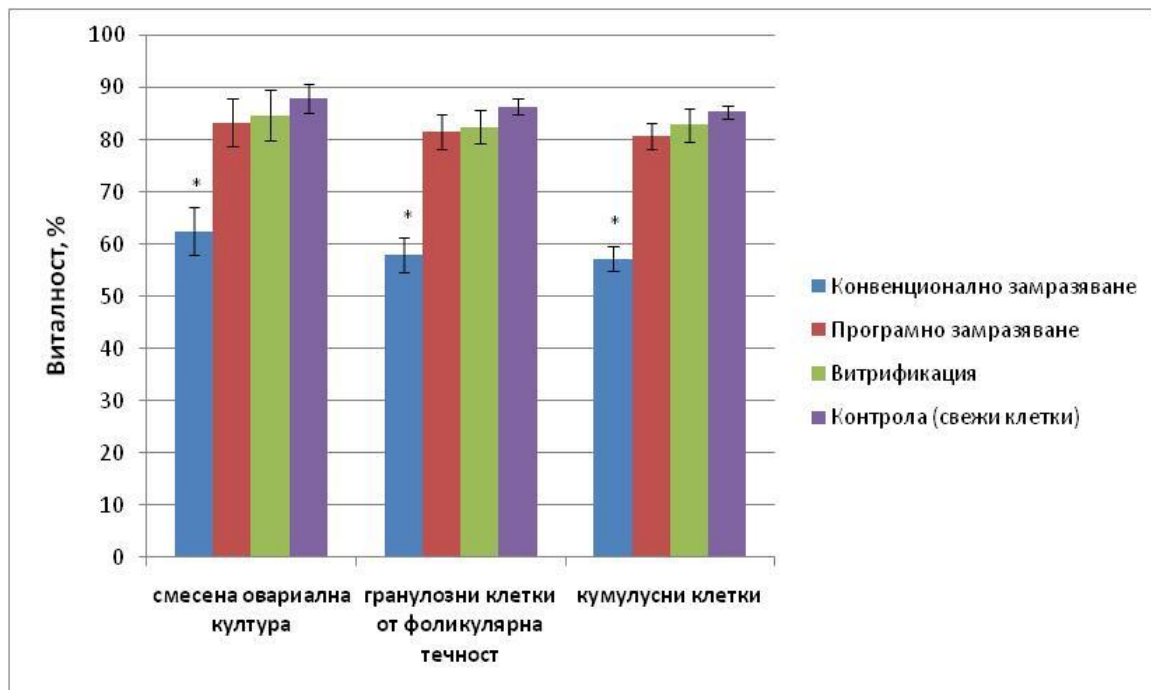
1.5. Сравнителни изследвания върху методи за криоконсервация

С цел стокиране на достатъчно проби за настоящи и бъдещи изследвания бе необходимо оптимизиране на протоколите за криоконсервация на овариалните клетки. Изследвано бе влияние на различни методи на замразяване.

Предварително култивирани и намножени клетки бяха разделени в четири групи - първа група (замразени съответно конвенционално на парите на азота), втора група (програмно), трета група (чрез витрификация) и контрола (свежи, незазамразени). Клетките бяха размразени и оцветени с трипаново синьо, за да се отчете тяхната жизненост. Сравнявахме проби (смесени овариални култури, гранулозни клетки от фоликуларна течност или кумулусни клетки), получени от една и съща пациентка, култивирани при еднакви условия и на един и същи пасаж.

Най-нисък процент преживяемост наблюдавахме при конвенционалното замразяване на парите на азота (*фиг. 13*). Това може да се обясни с невъзможността за контролиране на скоростите за замразяване, което води до образуване на вътреклетъчни кристали и поражения, предизвикани от дехидратацията и температурния шок. Независимо, че резултатите при конвенционалното замразяване са по-ниски, те са удовлетворителни.

Методът е сравнително лесен за изпълнение и не изисква използването на специална апаратура, което го прави приложим в практиката.



Фиг.13 Влияние на метода на замразяване върху виталитета на овариалните клетки ($p < 0,001$)

Замразяването с помощта на програмен замразител е доста прецизен метод, при който стриктно се следи скоростта на охлаждане спрямо зададената му програма. На точно определен етап се извършват процесите на сидинг (иницииране на кристалообразуване), което предпазва клетките от увреждания, свързани с процесите на преохлаждане. Освен това дава възможност за замразяване при еднакви условия при различните повторения.

При замразените клетки чрез витрификация наблюдавахме тенденция към по-добро запазване на виталитета. За първи път методът е приложен за криоконсервация на миши ембриони (*Rall W. and Fahy G., 1985*). Към днешна дата той успешно се прилага и за замразяване на овоцити (*Kafi M. et al., 2019*) и ембриони (*Ginström Ernstad E. et al., 2019*). Основните различия на “витрификацията” спрямо бавното замразяване са следните:

- дехидратирането на клетките и проникването на криопротектора се осъществява преди започване на охлаждането (при положителни температури);

- охлаждането се извършва с високи скорости, като директно се преминава от положителни към свръхниски температури;

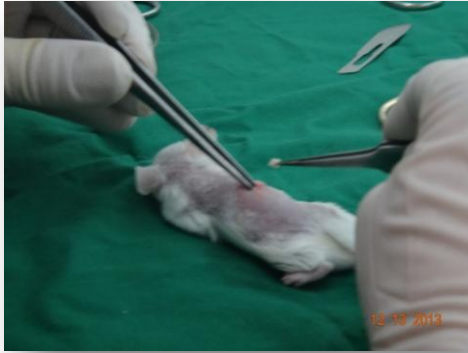
- използват се високи концентрации на криопротекторите и кратко време за еквилибрация (до няколко секунди).

Процесът е технически лесен за изпълнение, не изисква скъпоструваща апаратура (различни типове и видове програмни замразители) и за разлика от програмното замразяване не отнема много време. При витрификацията материалът замръзва в стъклоподобен вид, без образуването на кристали, което предпазва биообекта от механични разкъсвания и промяна в концентрациите на солите. По този начин се създават значително по-подходящи условия за запазване на виталитета на клетките. Недостатъци на метода са, че чрез него не могат да се замразяват големи обеми, използват се високи концентрации на криопротектори и това не е много подходящо при работа със стволови клетки.

Можем да обобщим, че за научни цели и при наличие на нужната апаратура програмното замразяване е добър метод за замразяване на овариалните клетки. Те запазват във висок процент своята жизненост и има възможност за еднакви експериментални условия, които могат с голяма прецизност да се настроят от оператора. Наблюдавахме статистически достоверна разлика между виталитета на клетките, замразени програмно, спрямо контролата, но такава не бе отчетена спрямо пробите, криоконсервирани чрез витрификация.

1.6. Култивиране и криоконсервация на овариални фрагменти

За да проверим функционалността на овариалната тъкан преди и след замразяване, бе тестван *in vivo* модел на култивиране. За целта замразени и след това размразени фрагменти от човешки яйчник трансплантирахме на имунодефицитни (SCID) мишки (*фиг. 14*). Тежката комбинирана имунодефицитност при тези лабораторни животни е предизвикана от генна мутация, която води до невъзможност да се произведат функционални Т- и В-лимфоцити. Това подпомага приемането на чуждата тъкан, като предотвратява възникване на „реакция на присадката спрямо приемателя”.



Фиг.14 Ксенотрансплантация на човешка овариална тъкан

В началните етапи (5-6 дни) трансплантът е в условия на хипоксия и исхимия. Ключов момент за успешната трансплантация е реваскуларизацията (*фиг. 15*). Има данни, че фоликулостимулиращият хормон подобрява този процес (*Wang Y. et al., 2012*). Това бе причина животните да бъдат инжектирани през два дни с 1.0 IU рекомбинантен FSH.



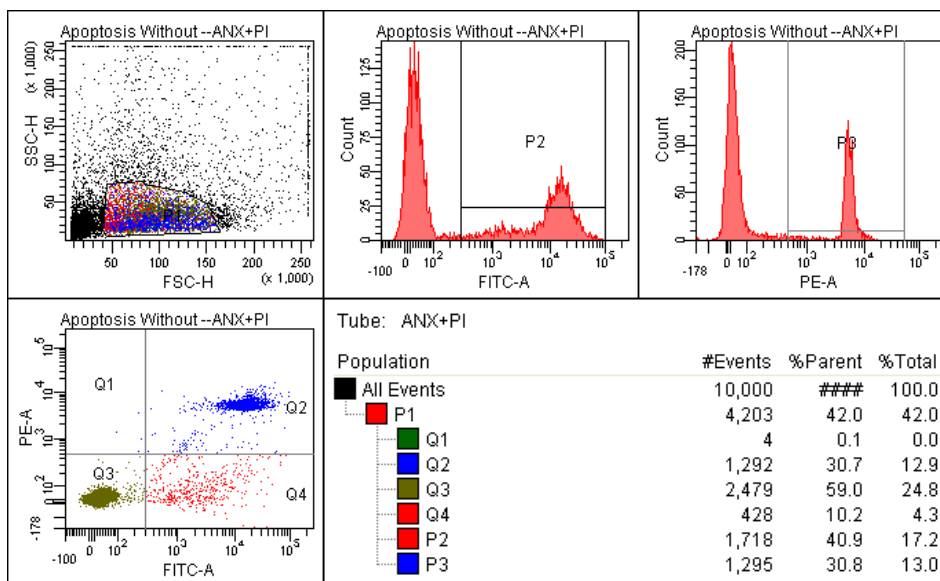
Фиг.15 Реваскуларизация на ксенотрансплантираната овариална тъкан

На 45-тия ден след трансплантацията мишките бяха умъртвени, а от човешките експланти бяха изолирани клетки, които тествахме, за да проверим нивата на апоптоза. Изследването бе направено чрез флоуцитометрия с помощта на FITC-Annexin V apoptosis detection Kit I (BD Biosciences). За целта беше отчетена фосфатидилсериновата транслокация. Апоптозата е процес на програмирана клетъчна смърт, който протича при многоклетъчните организми. Тя включва серия от биохимични процеси, които водят до промени в клетъчната мембрана, свиване на клетките, фрагментация на ядрата им, кондензация на хроматина, ДНК-фрагментация и др. В крайните етапи клетката се разпада на отделни мембранноразделени „апоптични телца”, които се подлагат на фагоцитоза. Апоптозата е физиологичен процес, който протича на ниво клетка и цели по-ефективното адаптиране на целия организъм към заобикалящата го среда. Тя играе ключова роля в ембрионалното развитие. За разлика от нея некрозата е патологичен процес, при който клетките умират, вследствие на травми. Процесът засяга големи участъци и не е ограничен на ниво клетка.

Фосфатидилсеринът е компонент на фосфолипидите и се намира от цитоплазмената страна на клетъчната мембрана. Известно е, че по време на апоптоза той се изнася извън клетката с помощта на белтъка скрамблаза. Това е сигнал клетката да бъде фагоцитирана.

Китът, който използвахме при нашите анализи, съдържа пропидиев йодид като ДНК- свързващо багрило. Клетките в началните етапи на апоптоза се характеризираха с положителна експресия на анексин V и отрицателна за пропидиев йодид (FITC-Annexin V +/ PI-). Популациите в късна апоптоза и мъртвите клетки са положителни и по двата маркера- FITC-Annexin V +/ PI+. Некротичните клетки се отличават по своята отрицателна експресия на анексин V и положителна на пропидиев йодид (FITC-Annexin V - / PI+). Живите клетки са отрицателни и по двата маркера (FITC-Annexin V - / PI-) **(Фиг. 16)**.

Флоуцитометричните анализи показаха $12,7 \pm 1.7\%$ клетки в ранна апоптоза (FITC-AnnexinV+, PI-), $59,2 \pm 3.1\%$ витални клетки (FITC-AnnexinV-, PI -) и $27,8 \pm 2.3\%$ мъртви клетки (FITC-AnnexinV+, PI+).



Фиг.16 Ниво на апоптоза при клетки, изолирани от транспланта (репрезентативни данни от експеримент).

2. Мезенхимни стволови клетки в яйчника

2.1. Флоуцитометричен анализ на експресия на характерни за MSC маркери

Според публикуваните от Международната асоциация за клетъчна терапия минимални изисквания дадени клетки да бъдат определени като MSC е те да се прикрепят към съда за култивиране, да притежават способността да се диференцират *in vitro* в остеоласти, адипоцити и хондробласти, да експресират повърхностните антигени CD73, CD90 и CD105 и да са отрицателни за CD34, CD45, CD14 и HLA-DR. (Dominici M. et al. , 2006).

Характерът на растеж на култивираните от нас овариални клетки, както и гореизброените критерии, ни даде основание да проверим дали те експресират мезенхимни стволочклетъчни маркери. Като положителна контрола използвахме MSK, изолирани от мастна тъкан.

На базата на флоуцитометричен анализ с Human MSC Analysis Kit (BD Stemflow™) установихме, че популация от овариалните клетки както в смесената, така и в гранулозната култура, са позитивна за CD90, CD105 и CD73 (фиг. 17 А, табл.2). Поради хетерогенността на културата наблюдавахме, че част от клетките (ок. 6-8 %) експресират антителата от отрицателния коктейл (CD45, CD34) (Фиг. 17 А). Като контрола използвахме MSC от мастна тъкан (фиг. 17 В, табл. 2).

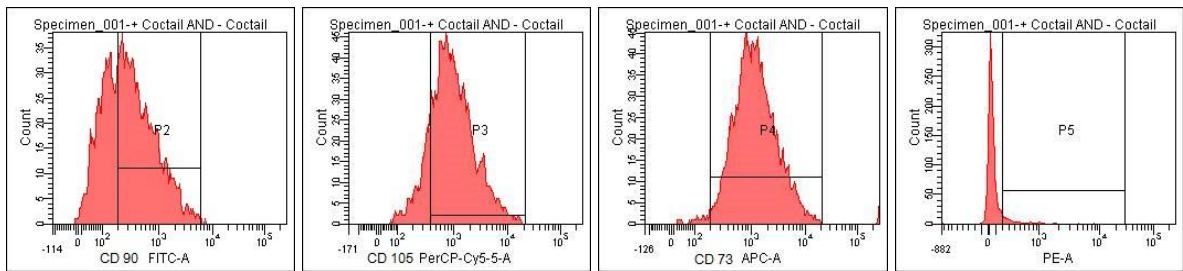
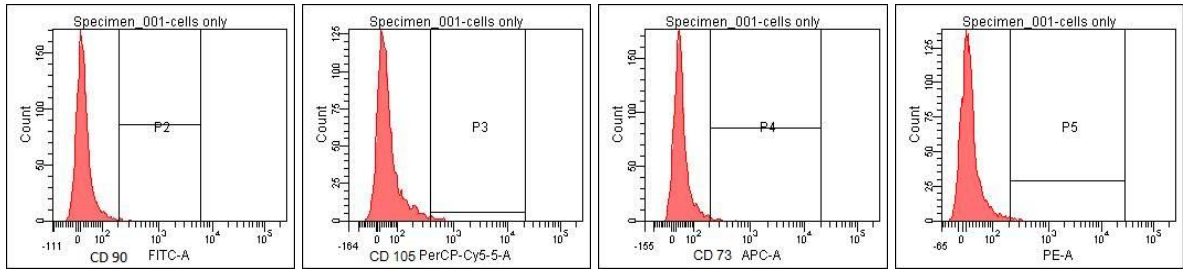
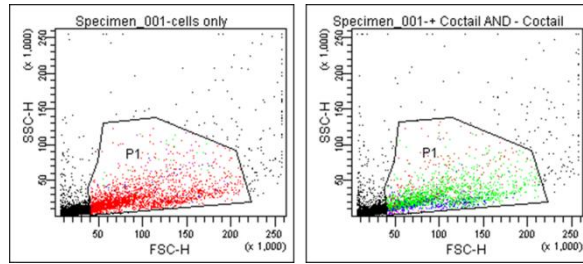
Вид клетки	Гранулозни клетки	Овариални клетки	МСК от мастна тъкан
Маркер	от фоликуларни аспирати		
CD90	64,5%±1,1	74,3%±0,8	89,0±0,7
CD105	83,4%±1,1	86,7%±1,4	94,8±1,8
CD73	94,0%±1,4	72,9%±2,1	94,6±1,2

Табл.2 Експресия на мезенхимни стволовоклетъчни маркери

Количествено експресията на мезенхимни стволовоклетъчни маркери силно се различаваше в зависимост от участъка, от който са изолирани популациите (кортекс, медула, смесена култура, фоликуларни аспирати), продължителността на култивиране, броят пасажирания и др. фактори. Така например при проведени анализи на първична клетъчна култура установихме по-ниска експресия на изследваните молекули (CD90, CD105 и CD73). При последващото им размножаване този процент нарастваше. При MSC от костен мозък също се наблюдава повишаване на нивата на експресия на изследваните маркери след увеличаване на броя на пасажиранията (*Hu Y. et al., 2018*).

При проведените от нас изследвания прави впечатление, че гранулозните клетки от фоликуларни аспирати експресират процентно по-голямо количество CD73 (94±1,4%), идентични стойности с MSC от мастна тъкан, в сравнение със смесената овариална култура (72,9%±2,1). От друга страна срещнахме публикации, според които гранулозни стволови клетки са отрицателни за този маркер (*Kossowska-Tomaszczuk K. et al., 2009*). Други автори наблюдават, че при MSC, изолирани от миша перикардиална адипозна тъкан, има две различни популации клетки в зависимост от нивото на експресия на CD73 (CD73^{low} и CD73^{high}). Те установяват, че при трансплантация на обогатена на тази молекула субпопулация стволови клетки при миокарден инфаркт се наблюдават по-добри резултати в сравнение с терапия с CD73^{low}. Предполага се, че това е причината за разликите в успеваемостта при клетъчната терапия (*Tan K. et al., 2019*). CD73 е екто-5-нуклеотидаза. Има данни, че може да функционира като ко-рецептор и фактор на адхезия. Експресира се върху някои лимфоцитни подтипове, фоликуларни дендритни клетки, епителни и ендотелни клетки.

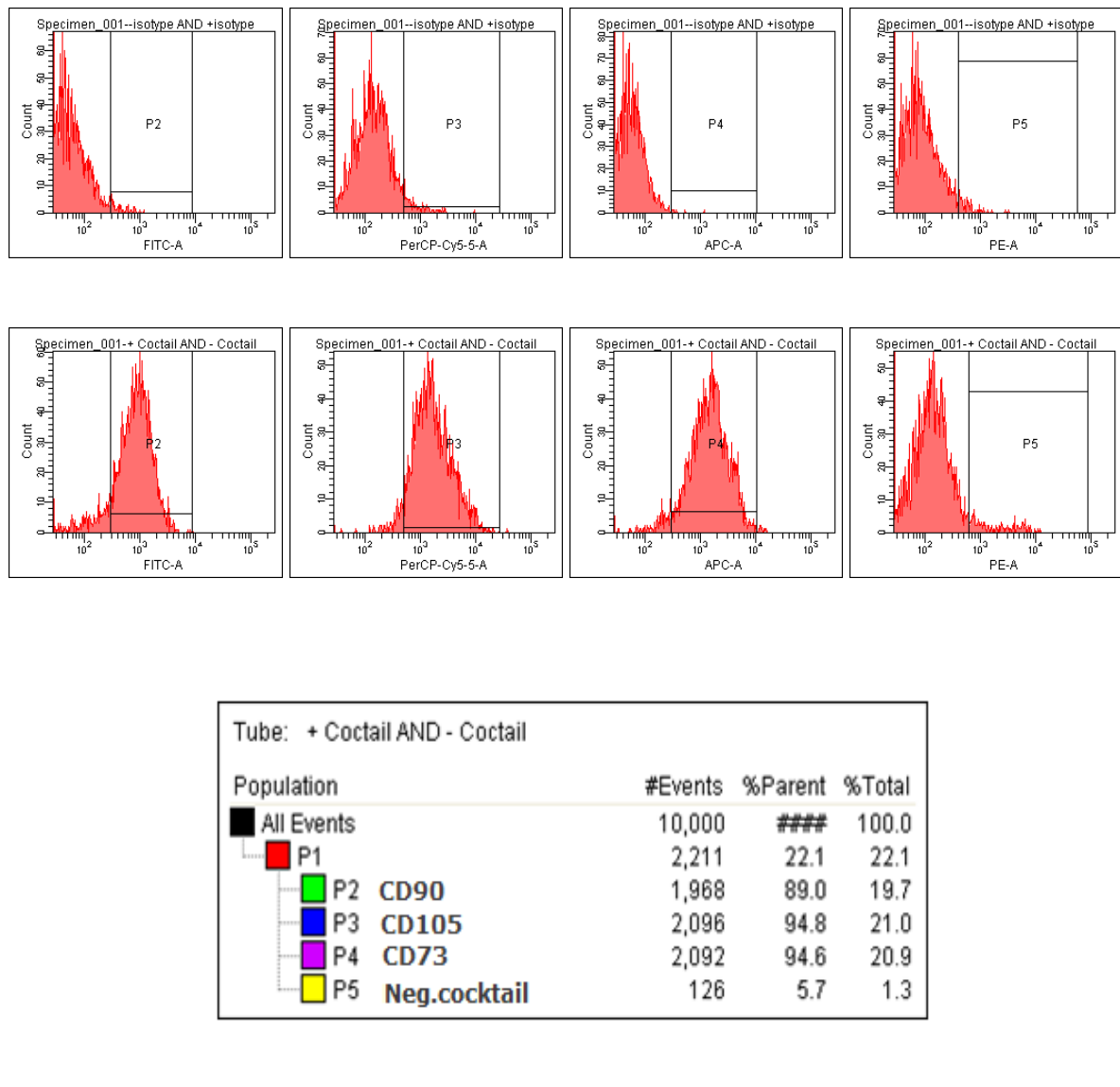
A)



Tube: + Coctail AND - Coctail

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
P1	2,426	24.3	24.3
P2	1,479	61.0	14.8
P3	2,017	83.1	20.2
P4	2,343	96.6	23.4
P5	193	8.0	1.9

B)



Фиг.17 Експресия на мезенхимни стволовоклетъчни маркери на трети пасаж (репрезентативни данни от експеримент).

A) Овариални клетки (смесена култура)

B) MSK от мастна тъкан

2.2. Индуцирана диференциация на овариални клетки (смесена и гранулозна култура)

Според критериите MSC трябва да могат да се диференцират в остеоцити, адипоцити и хондроцити. За да проверим мултипотентния характер на овариалните стволови клетки, ние направихме опити да ги диференцираме и до нервни клетки.

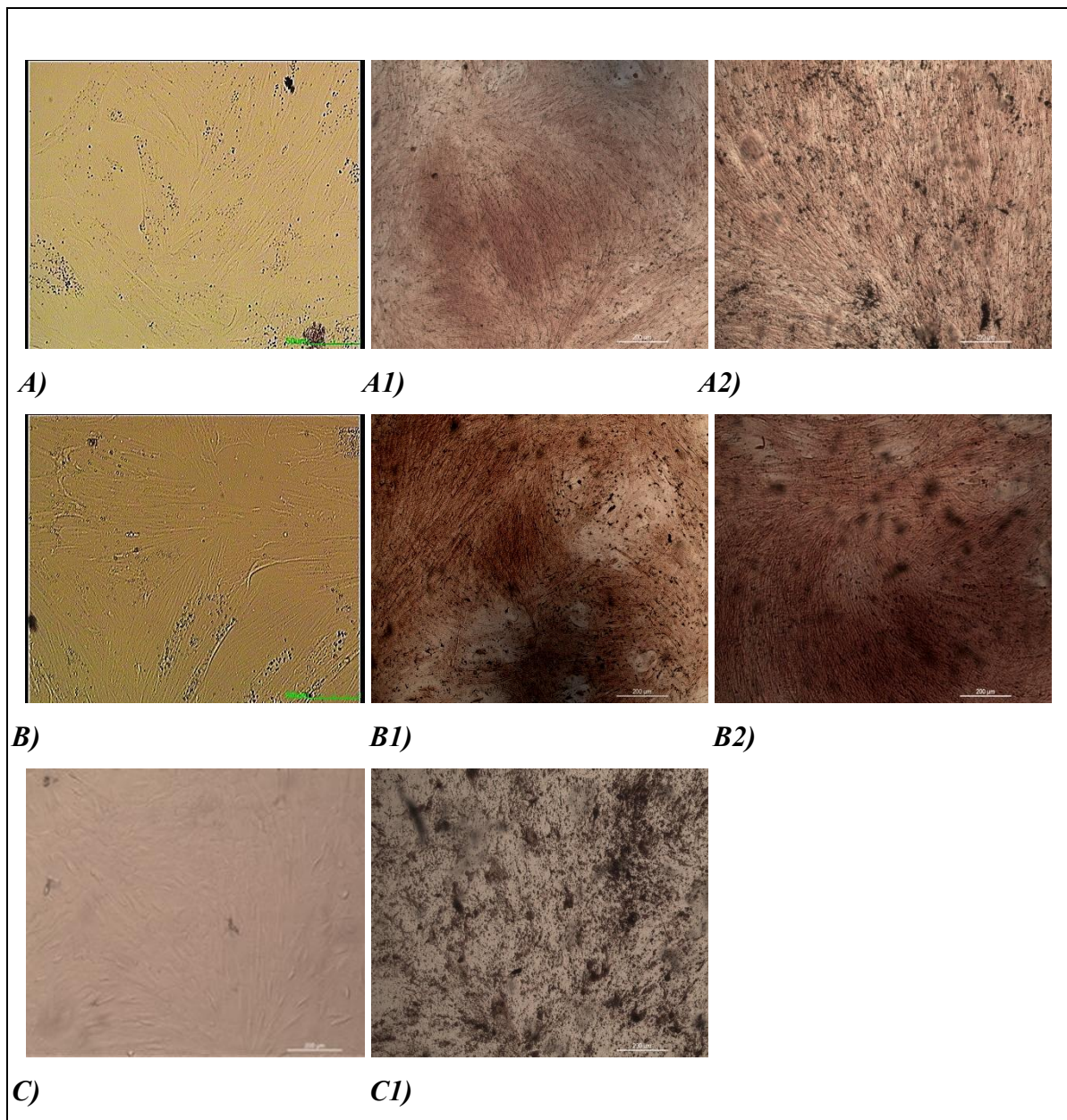
2.2.1. Остеогенна диференциация

Остеобластите са еднонуклеарни кубоидални клетки, които изграждат костната тъкан. Те произвеждат хидроксиапатит, който се отлага и образува минерализирана матрица.

Остеогенната диференциация се регулира от мрежа от регулаторни механизми, като ключова роля се отрежда на BMPs. Известно е, че Notch- сигналният път координира BMP9-индуцираната остеогенеза *in vivo* и *in vitro* (Cui J. et al., 2019).

При индуциране на остеогенна диференциация някои от клетките промениха морфологията като загубваха удължената си форма. След оцветяване по Von Kossa наблюдавахме характерни минерални отлагания в екстрацелуларния матрикс в тъмно кафяв цвят както при фоликуларни (фиг. 18, B1 и B2), така и при смесени овариални култури (фиг. 18, A1 и A2), които липсваха в отрицателните контроли (Фиг. 18, A, B и C). Регистрирахме количествени разлики в сравнение с положителната контрола от MSC от мастна тъкан (Фиг. 18, C1).

Насочената остеогенна диференциация беше осъществена чрез култивиране на овариалните клетки в среда, обогатена с дексаметазон (Dex), глицерофосфат (Gly) и аскорбинова киселина (Asc). Добавянето на Dex подпомага остеогенния и митогенен потенциал на културалната среда. Неговата роля е да регулира експресията на Runx2-ключов транскрипционен фактор в остеобластната диференциация. Dex принадлежи към групата на глюкокортикоидите- съединения, които координират клетъчния растеж и диференциация (Jaiswal R. K. et al., 2000). Втората добавка (Gly) е източник на фосфат, който от една страна служи като субстрат, необходим за производството на костния минерал хидроксиапатит ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), от друга страна участва в редица вътреклетъчни сигнални пътища и така регулира гените, необходими за остеогенната диференциация. Аскорбиновата киселина играе важна роля като кофактор, участващ в хидроксилиране на пролиновите и лизиновите остатъци на колагена (основна съставка на извънклетъчния матрикс) (Langenbach F. and Handschel J., 2013). Препоръчва се да се използва дериват на витамин С (аскорбинова киселина-2 фосфат), който е по-стабилен и с по-продължително действие.



Фиг.18 *Остеогенна диференциация; Von Kossa*

A) Смесена овариална култура - контрола (нетретирани) клетки;

A1, A2) Смесена овариална култура - остеогенна диференциация (различни увеличения)

B) Гранулозни клетки от фоликуларна течност - контрола (нетретирани) клетки

B1, B2) Гранулозни клетки от фоликуларна течност - остеогенна диференциация

C) MSK от мастна тъкан- контрола (нетретирани) клетки

C1) MSK от мастна тъкан- остеогенна диференциация

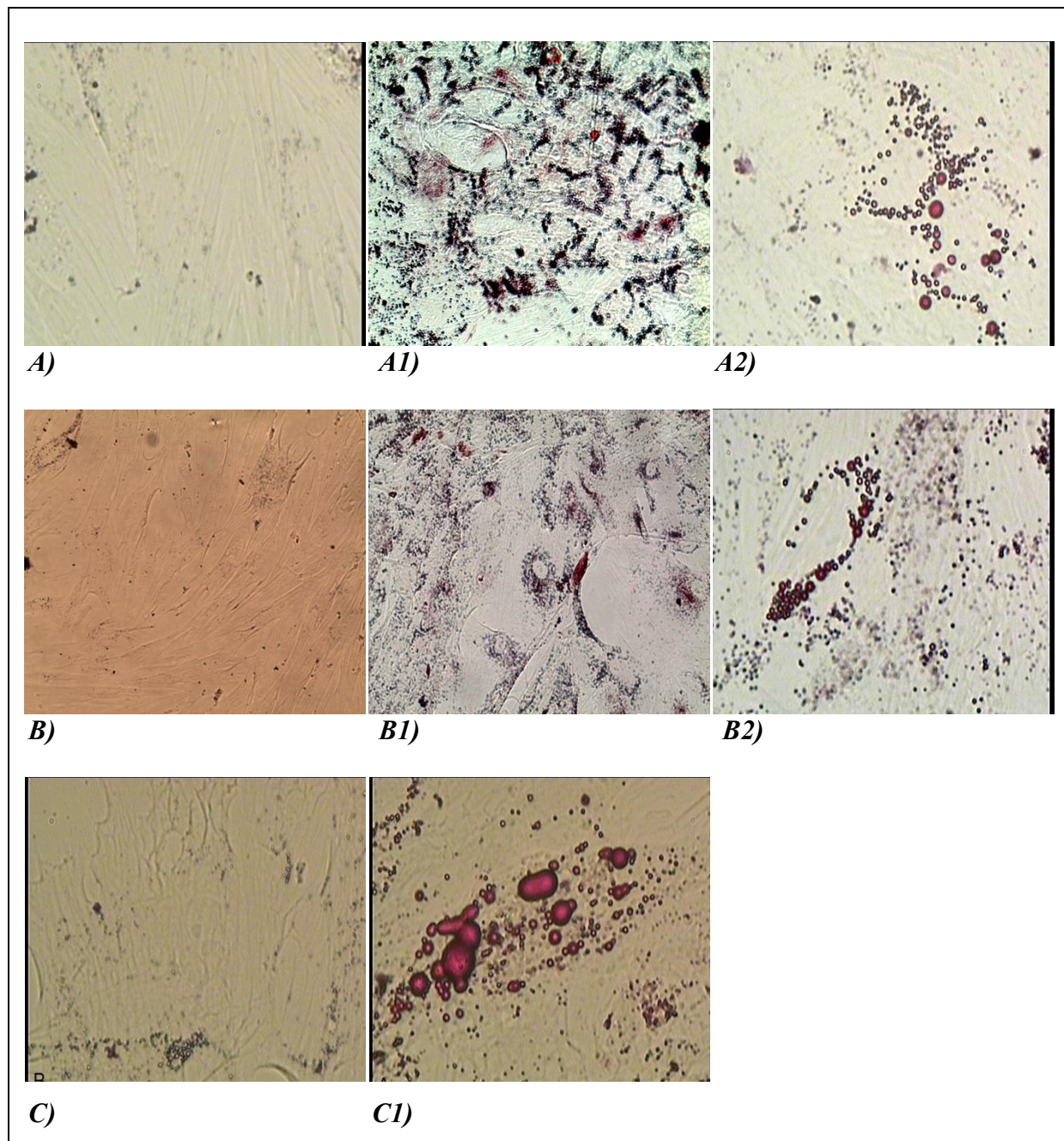
2.2.2. Адипогенна диференциация

Адипоцитите са клетки, изграждащи мастната тъкан, които произлизат основно от ембрионалната мезодерма. Съществуват проучвания, според които част от тях имат невроектодермален произход. Характерно за тези клетки е наличието на голяма липидна капка (капки), която заема по-голямата част от интрацелуларното пространство и измества ядрото ексцентрално.

Физиологично, адипогенезата е строго контролирана от хормони, цитокини, хранителни вещества, промени в експресията и/или активността на транскрипционните фактори (C/EBP- α , - β , - δ ; PPAR γ ; SREBP1) (Shah B. S. et al., 2017). Известно е, че различни сигнални пътища, като Wnt, bone morphogenetic protein (BMP) и Hedgehog (Hh), регулират процеса (Fan C. et al., 2018). Така, например, деметилирането на гена *bmp4* отключва адипогенезата. В хода на диференциране на мезенхимните стволови клетки в адипоцитни се наблюдава, че гените, които кодират ключовите за процеса транскрипционни фактори C/EBP- α и PPAR γ , се репозиционират от периферията на ядрото във вътрешността му.

След култивиране в среда, насочваща към адипогенна диференциация, наблюдавахме, че клетките придобиваха по-сферична форма. При последващо оцветяване с Oil-Red, в цитоплазмата на някои от тях установихме наличието на липидни вакуолки в червен цвят (както при смесената овариална култура- *фиг. 18, A1 и A2*, така и в гранулозните култури от фоликуларни аспирати- *фиг. 19, B1 и B2*), които липсваха в отрицателните контроли (*фиг. 19, A, B и C*). Наблюдавахме, че мастни капчици са с по-малки размери и по-малко като количество в сравнение с положителната ни контрола от MSC от мастна тъкан (*фиг. 19, C1*).

Има данни за успешна адипогенна и остеогенна диференциация в *in vitro* условия на овариални тека клетки от овца и прасе (Adib S. and Valojerdi M.R., 2017; Lee Y.M. et al., 2013).



Фиг.19 Адипогенна диференциация Oil-RedO

A) Смесена овариална култура - контрола (нетретирани) клетки (100x)

A1, A2) Смесена овариална култура - адипогенна диференциация (100x, 400x)

B) Гранулозни клетки от фоликуларна течност - контрола (нетретирани) клетки (100x)

B1, B2) Гранулозни клетки от фоликуларна течност - адипогенна диференциация (100x, 400x)

C) MSK от мастна тъкан- контрола (нетретирани) клетки (100x)

C1) MSK от мастна тъкан- адипогенна диференциация (400x)

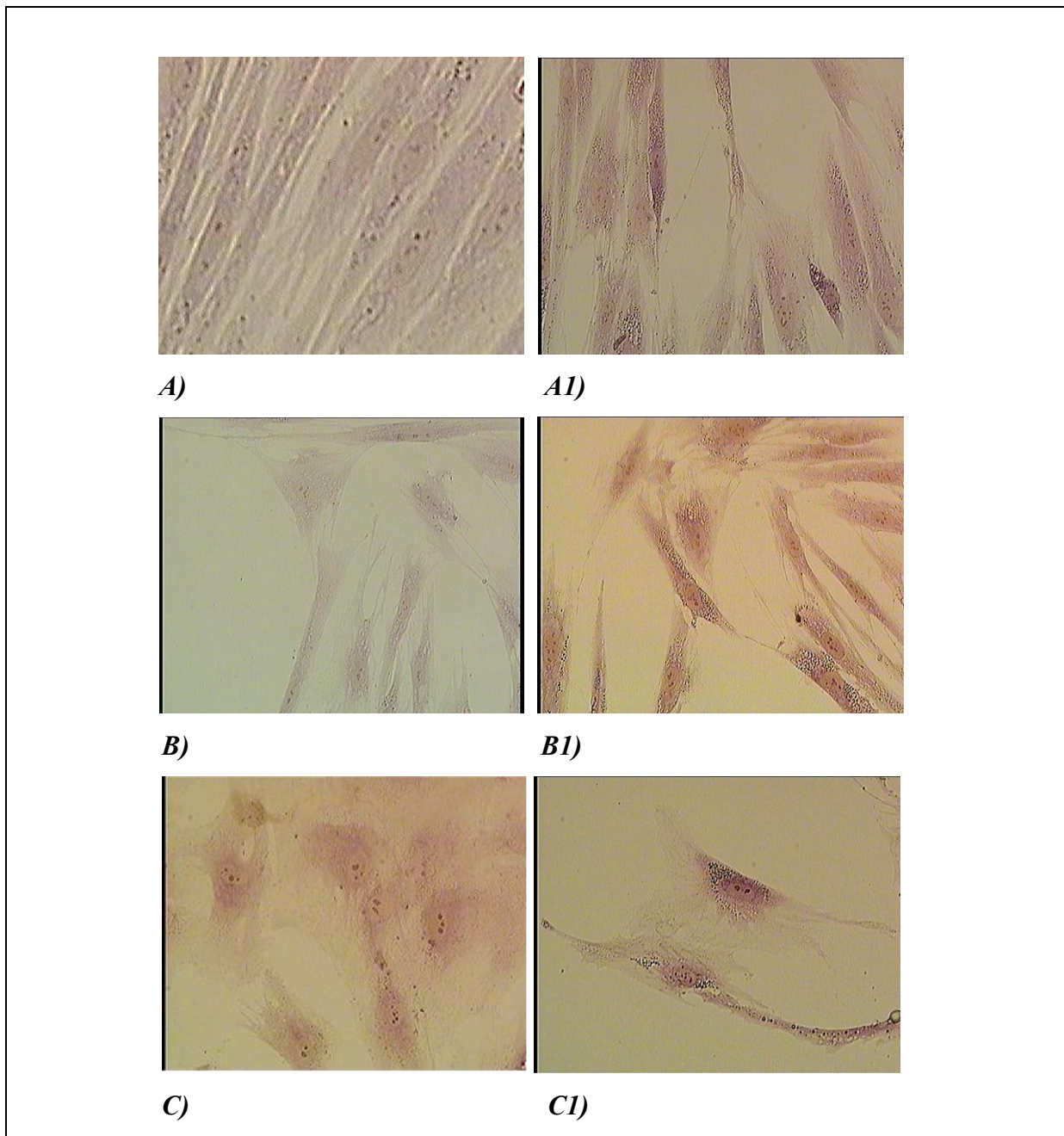
2.2.3. Неврогенна диференциация

След едноседмична инкубация с Neurogenic Differentiation Medium (Promo Cell), клетките бяха оцветени с Cresyl violet и бе установено наличие на нислова грануляция, която е характерна за клетки с невроподобен фенотип. Нисловите телца (кръстени на Франц Нисъл) представляват плътно опакован зърнест ендоплазматичен ретикулум, гъсто обсипан с рибозоми и заобиколен от множество полирибозоми. Те обезпечават интензивния белтъчен синтез, който протича в нервната клетка и който е свързан с производството на нейните сигнални молекули – невромедиаторите.

В процеса на диференциация отчетохме, че някои от клетките промениха своята морфология. В началото присъстваха само плоски вретенообразни популации, като към края на култивирането наблюдавахме нервно-подобни клетки с няколко цитоплазмени израстъка. На фигурите се виждат ядра, оцветени в светлосин / виолетов цвят, и Nissl тела- в тъмно черно-виолетово (*фиг. 20*). Подобна грануляция липсваше в отрицателните контроли (*фиг. 20, А, В и С*). Необходими са допълнителни изследвания, за да се потвърдят тези резултати, тъй като наличието на голям брой рибозоми би могло да е свързано и с протичане на други процеси.

Има публикации за успешна неврогенна диференциация на стволови клетки, получени от миши яйчници (*Esmailian Y. et al., 2017*). Друг екип от учени наблюдават спонтанна диференциация на овчи клетки от овариалния кортекс до подобни на неврони линии (*Sánchez-Maldonado B. et al., 2018*).

При проведените изследвания установихме, че овариалните стволови клетки могат да се диференцират както в клетки с мезодермален произход (остеоцити и адипоцити), така и в такива с ектодермален произход (нервни клетки), което е белег за тяхната пластичност. Различни публикации също съобщават за успешно диференциране на клетки от овариалния фоликул в различни линии- хепатоцити, остеоцити, адипоцити, хондроцити и др. (*Lai D. et al., 2015; Riva F. et al., 2014*).



Фиг.20 Неврогенна диференциация; cresyl violet (200x)

A) Смесена овариална култура - контрола (нетретирани) клетки;

A1) Смесена овариална култура - неврогенна диференциация

B) Гранулозни клетки от фоликуларна течност - контрола (нетретирани) клетки

B1) Гранулозни клетки от фоликуларна течност - неврогенна диференциация

C) MSK от мастна тъкан- контрола (нетретирани) клетки

C1) MSK от мастна тъкан- неврогенна диференциация

3. Изследване на експресията на плурипотентни маркери от овариални клетки (смесена култура)

Чрез флоуцитометричен анализ с Human and Mouse Pluripotent Stem Cell Analysis Kit (*Becton Dickinson*) и Human Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis Kit (*Becton Dickinson*) изследвахме експресията на плурипотентни маркери от овариални клетки (Oct3/4, Nanog, Sox2, SSEA-1, SSEA-4). Тези молекули участват в сложни сигнални пътища, които са отговорни за клетъчната пролиферация и самообновяване, и наличието им в клетката е белег за ниската ѝ диференциация. Известно е също така, че те работят в тясна взаимовръзка помежду си. Изследвания при миши и човешки ESC доказват, че Oct3/4 и Sox2 се свързват с промотора на Nanog. Така трите гена се саморегулират и поддържат плурипотентното състояние на клетката (*Lam C. S. et al., 2012*).

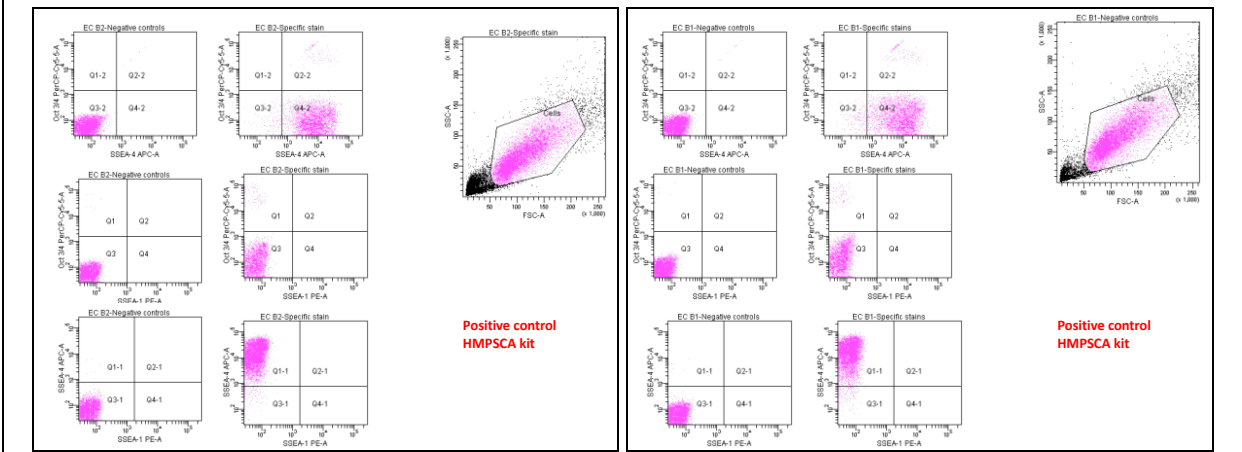
Резултатите от проведените от нас експерименти показаха, че някои от клетките на яйчника са позитивни, макар и в различна степен, за Oct3/4, Nanog, Sox2, SSEA-1, SSEA-4. За контрола използвахме човешки ESC, любезно предоставени ни от колеги. (фиг. 21)

Работихме както със свежи, така и с предварително замразени и след това размразени клетки, като не наблюдавахме разлика в нивата на изследваните молекули. (табл. 3)

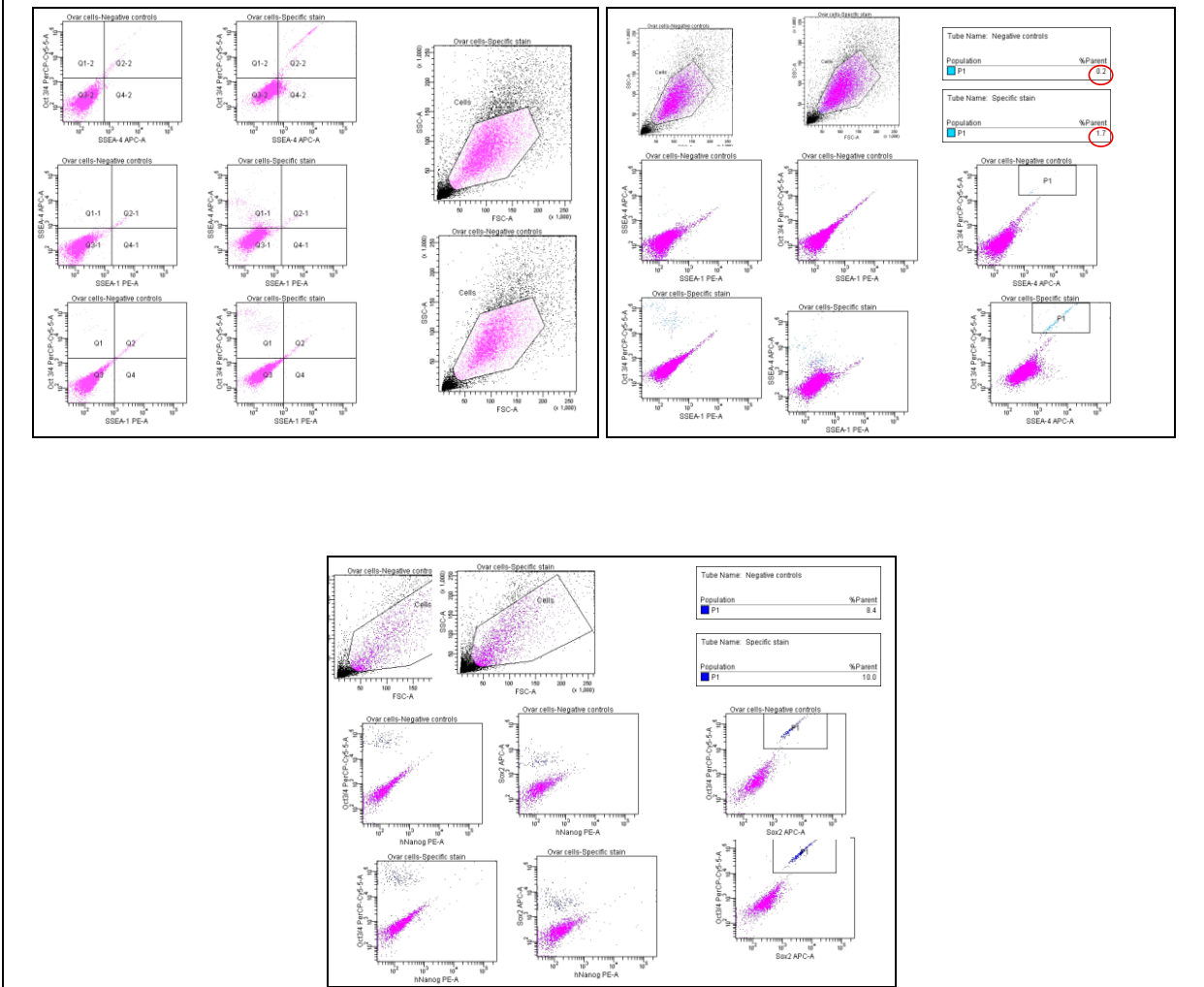
	Свежи овариални клетки	Замразени овариални клетки
SSEA-1	1,4%±0,4	1,3%±0,6
SSEA-4	3,2%±1,2	3,2%±0,9
Oct3/4	2,3%±0,8	2,2%±1,1
NANOG	2,9%±1,2	2,9%±1,5
SOX2	2,4%±0,7	2,3%±0,9

Таблица.3 Експресия на плурипотентни стволовоклетъчни маркери при свежи и замразени овариални клетки (смесена култура)

A)



B)



Фиг.21 Експресија на плурипотентни стволочетни маркери од ESC (A) и овариални клетки (B)- репрезентативни данни од експеримент

Известно е, че след имплантиране на бластоциста Oct4 се инактивира необратимо в соматичните, но не и в герминативните клетки (Чакъров С., 2014). Според някои учени в зависимост от експресията на този маркер в яйчника съществуват два вида стволови клетки- много малки ембрионално подобни стволови клетки (VSELs) и оогонални (овариални) герминативни стволови клетки. VSELs са с по-малки размери (1–3 μm) и с ядрена експресия на плурипотентния маркер (Oct 4A). Овариалните герминативни стволови клетки са с по-големи размери (4–7 μm) и цитоплазмена експресия на Oct 4 (Oct 4B) (Parte S. et al., 2014; Virant-Klun I. et al., 2013).

Интересна беше положителната експресия на SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1), тъй като това е маркер, характерен за миши ембрионални стволови клетки, но не се среща при човешки. От друга страна PGC на човешки ембриони, които мигрират към недиферентните гонади, са позитивни за SSEA-1, като пикът му на експресия е 8,5 седмица след оплождането, когато клетките мигрират към кортекса на органа (Hummitzsch K. et al., 2015). SSEA-1 е въглехидратен епитоп и се свързва с клетъчната адхезия, миграция и регулиране на клетъчната диференциация. Има данни, че всичките популации PGC, позитивни за SSEA-1, експресират още и SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen-4), но обратна зависимост не се наблюдава (Kerr C. L. et al., 2008). Последният е гликолипид, който е характерен за ранните стадии на ембрионалното развитие и може да бъде повърхностно открит при човешки ESC (Tolosa L. et al., 2015).

В литературата срещнахме оскъдни данни относно факторите, които повлияват експресията на плурипотентни маркери при овариални клетки. Възникна и въпросът защо след като в постнаталния яйчник има стволови клетки, все пак настъпва менопауза. Това ни накара да проведем по-задълбочени изследвания, за да проверим, дали съществува разлика в нивата на експресия на плурипотентни маркери в зависимост от възрастта на пациентките, от които е получена тъканта. За целта с помощта на флоуцитометричен анализ бяха изследвани 19 проби (смесени култури-кортекс и медула), разделени в три групи: I-ва група – клетъчни култури, изолирани от жени между 21-35 г. (брой пациентки- 9), II-ра група - 35-48 г. (брой пациентки-8), III-та група- 49-50 г. (брой пациентки-6).

Резултатите от експериментите ни показаха, че в културите, получени от първите две групи (I и II), има клетки, които експресират в различна степен всички изследвани от нас плурипотентни маркери (Oct3/4, Nanog, Sox2, SSEA-1, SSEA-4), като наблюдавахме значителен спад в нивата на петте молекули във втората в сравнение с

първата група, т.е. с напредване на възрастта. Клетките, получени от менопаузалните пациентки, бяха положителни само за SSEA-4 и Sox2.

Резултатите са обобщени в табличен вид (**табл.4**).

<i>Маркер</i>	<i>SSEA-1</i>	<i>SSEA-4</i>	<i>Oct3/4</i>	<i>Nanog</i>	<i>Sox2</i>
<i>Група</i>					
<i>Група I</i>	1,70±0,17%	4,10±0,45%	2,90±0,49%	3,90±0,69%	2,90±0,41%
<i>Група II</i>	1,10±0,31%***	3,70±0,54%*	1,60±0,32%***	1,80±0,3%***	2,30±0,46%**
<i>Група III</i>	-	1,50±0,23%***	-	-	1,60±0,50%***
*Група I (21-35 г.)- n=9; Група II (35-48 г.)- n=8; Група III (49-50 г.)- n=6					

Таблица.4 Нива на експресия на плюрипотентните маркери SSEA-1, SSEA-4, Oct3/4, Nanog и Sox2 от овариални клетки, получени от пациентки в различни възрастови групи. (***) $p < 0.001$; (**) $p < 0.01$; (*) $p < 0.05$)

Подобни на нашите данни срещнахме и в други публикации. Така например Novella-Maestre и сътрудници също получават различия в нивата на генна експресия на Oct3/4, Nanog и Sox2 в зависимост от възрастта на пациентките, като те провеждат своите изследвания на базата на RT-PCR. (Novella-Maestre D. E. et al., 2009)

При гризачи също е установено намаляване на нивата на експресия на Oct3/4, Nanog при 8-седмични мишки в сравнение с 2-седмични. За разлика от нашите изследвания, тази зависимост не се потвърждава за Sox2 (Esmaeilian Y. et al., 2012).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Безплодието е социалнозначим проблем, който засяга все по-голям процент от съвременното общество. Все още медицината не може да осигури решение на много от проблемите, водещи до инфертилитет и стерилитет. Големи надежди се възлагат на стволовите клетки като нов подход. Освен за производството на гамети, те биха могли да се използват в фармацията за тестване на медикаменти, както и като експериментални модели за изследване различни неизяснени процеси в организма.

През последните години бяха открити стволови/ прогениторни клетки в почти всички органи на възрастния организъм. Доскоро репродуктивната биология се позоваваше на догмата, че овариалният резерв се формира само в пренаталния период, но през последните десетина години в научните среди възникна дискусия за достоверността на това твърдение. Липсата на достатъчно яснота по въпроса ни мотивира да проведем настоящите изследвания.

В хода на експериментите бе установено, че овариалните клетки се характеризират с умерена пролиферативна активност. Първичните култури са силно хетерогенни, като присъстват звездовидни клетки с дълги цитоплазмени израстъци, както и епителоидни и вретеновидни популации. След по-продължително култивиране наблюдавахме промяна по отношение на морфологията като клетките ставаха фибробластоподобни. В литературата липсваше еднозначна информация по отношение на най-подходящите културални условия. Това наложи провеждане на експерименти за оптимизирането им. За целта тествахме влиянието на различни хранителни среди и суплементирането им с FBS и FSH. Установихме, че DMEM/F-12 обогатена с 10% FBS и 1 IU/ml FSH дава най-добри резултати по отношение на пролиферацията и виталитета на човешки и животински OCs. Функционалната активност на клетките бе тествана чрез ко-култивирането им със сперматозоиди, като установихме, че те модифицират хранителната среда.

С цел стокиране на проби за бъдещи изследвания бяха оптимизирани и техниките за замразяване на OCs. Тествани бяха различни методи за криоконсервация. Най-добри резултати по отношение виталитета на клетките след размразяване бяха получени при витрификацията и програмното замразяване.

Оптимизиран беше метод за *in vivo* култивиране на овариална тъкан. Фрагментите бяха трансплантирани на имунодефицитни SCID мишки. Наблюдавахме реваскуларизация на транспланта. Изолираните от него клетки запазваха своята жизнениост в голям процент.

След по-задълбочени анализи установихме, че в яйчиците присъства субпопулация от клетки, които имат характеристики на MSC. Те експресират типични маркери (CD90, CD105 и CD73). Диференциацията им в клетки с мезодермален (остеоцити, адипоцити) и ектодермален произход (нервни клетки) е белег за тяхната пластичност и мултипотентност. Сравнени с MSC от мастна тъкан не показаха качествени различия.

Установихме още, че малък процент от OCs са позитивни за плюрипотентни маркери (Oct3/4, Nanog, Sox2, SSEA-1, SSEA-4), като нивата на експресия намаляват с възрастта.

ИЗВОДИ

1. Овариалните клетки при *in vitro* култивиране в монослой се характеризират с умерена пролиферативна активност. Отличават се с хетерогенна морфология. При продължително култивиране се дедиференцират, като придобиват фибробластоподобна форма.
2. Овариалните клетки се отличават с добра криотолерантност. Програмното замразяване и витрификацията дават по-добри резултати в сравнение с конвенционалното (на парите на азота).
3. В човешкия яйчник има субпопулация от клетки, които притежават характеристики на мултипотентни MSC. При достигане на плътен монослой се наблюдават класообразни завихряния. Клетките експресират мезенхимни стволовоклетъчни маркери (CD90, CD105, CD73) и са способни да се диференцират в адипоцити, остеоцити, нервни клетки.
4. Сравнителни изследвания с MSC от мастна тъкан показват количествени различия в експресията на CD90, CD105, CD73.
5. Малък процент от човешките овариални клетки са позитивни за плюрипотентни стволовоклетъчни маркери (SSEA-1, SSEA-4, Oct3/4, Nanog, Sox2), като тази експресия намалява с напредване на възрастта на жените, от които е получен материалът.

ПРИНОСИ

Потвърдителни:

1. Ко-култивирането със сперматозоиди може да се използва за оценка на функционалната активност на овариалните клетки.
2. Разработена е подходяща методика за криоконсервация на овариални клетки, която позволява запазване на висок процент на виталност на клетките.

Оригинални:

1. На базата на сравнителни изследвания на различни хранителни среди са оптимизирани условията за култивиране на овариалните клетки. Като подходящ за практиката метод е предложено култивирането им в хранителна среда DMEM/F-12 или Leibovitz, суплементирана с 10% FBS и 1 IU/ml FSH.
2. Подвърдено е, че в яйчника има субпопулация от стволови клетки, които експресират маркери, характерни за MSC, и могат да се диференцират в различни клетъчни линии.

Публикации, свързани с темата на дисертационния труд:

1. Todorov P., **Petrova N.**, Mihova A., Guenova M., Arabadzhiev B., Hristova E. The Female Age Influences the Expression of Pluripotent Stem Cells Markers in Human Ovarian Cells. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*. 2015; 68(1): 65-70. **SJR:0.21, ISI IF:0.284- 1 цитиране**
2. Hristova E., Hristova M., **Petrova N.** Successful induction of mesenchymal stem cells to neural phenotype is associated with loss of pluripotency markers. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*. 2018; 71(12):1645-1651. **ISI IF:0.27**
3. **Петрова Н.**, Христова Е. Овариалните стволови клетки- мит или реалност?. *Акушерство и гинекология*. 2014; 53(7): 27-31
4. **Петрова Н.**, Христова Е., Христова М., Димитров Й., Тодоров П. Диференциация на стволови клетки, изолирани от фоликуларна течност. "СТАРЕЕНЕ, ЗДРАВЕ, ГЕРИАТРИЧНИ ГРИЖИ", Тракийски университет - Стара Загора. 2017:566-572
5. Христова М., Христова Е., **Петрова Н.**, Тодоров П. Сравнителни изследвания на методи за криоконсервация на човешки мезенхимни стволови клетки, изолирани от мастна тъкан. "СТАРЕЕНЕ, ЗДРАВЕ, ГЕРИАТРИЧНИ ГРИЖИ", Тракийски университет - Стара Загора. 2017:483-489
6. Hristova M., **Petrova N.**, Hristova E., Daskalova D., Todorov P. Cytotoxic and cryopreservation effect of different cryoprotectants on human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Journal of BioScience and Biotechnology, Plovdiv University Press "Paisii Hilendarski"*. 2017:5-10
7. Petrushko M., Yurchuk T., Piniayev V., **Petrova N.**, Hristova E. In Vitro Co-Culture of Human Pre-Implantation Embryos on Monolayer of Cumulus and Granulosa Cells. *Ембриология*. 2019; 9(1)20-23

Участия на научни форуми, свързани с темата на дисертационния труд:

1. Христова М., **Петрова Н.**, Христова Е., Тодоров П. Влияние на различни среди за култивиране върху функционалните параметри на човешки овариални клетки. Ежегодна научна сесия „Дни на науката 2018“, 2-3.11.2018- постер
2. Hristova E., Todorov P., **Petrova N.**, Hristova M. The pluripotent stem cells markers expression profile on human ovarian cell cultures depends on the donor's age. 15th International Symposium for Immunology of Reproduction, 15-17.06.2018- постер
3. Hristova M., Todorov P., **Petrova N.**, Gulenova D., Hristova E. Influence of microvibrations on the colony-forming ability of human umbilical cord blood-derived haematopoietic stem cells. 15th International Symposium for Immunology of Reproduction, 15-17.06.2018- постер

4. **Petrova N.**, Hristova E., Hristova M, Dimitrov J., Todorov P. Differentiation of Stem Cells, Izolated from Follicular Fluid. Scientific Conference with International "Participation Ageing, Health, Geriatric Care", 18-19.05.2017-постер
5. Hristova M, Hristova E., **Petrova N.**, Todorov P. Comparative Studies of Cryopreservation Methods for Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells. Scientific Conference with International Participation "Ageing, Health, Geriatric Care", 18-19.05.2017-постер
6. **Petrova N.**, Hristova E., Hristova M, Mihailova N., Dimitrov J., Todorov P. Follicular fluid as a source of mesenchymal stem cells. 18th National Congress of Infertility and Reproductive Health with International Participation, 09-12.03.2017- доклад
7. Hristova M, **Petrova N.**, Hristova E., Todorov P. Cytotoxic and Cryopreservation Effect of Different Cryoprotectants on Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells. Първа национална докторантска конференция по биология, 01.11.2016- постер
8. Hristova M, **Petrova N.**, Hristova E., Nikolova M., Dimitrov J., Todorov P. Immunophenotypic analysis of nuclear cells from umbilical cord blood. 17th National Congress of Infertility and Reproductive Health with International Participation, 10-13.03.2016- доклад
9. Todorov P., Hristova E., **Petrova N.**, Tchorbantov A., Dimitrov J. Xenotransplantation as a method to examine human ovarian tissue after cryopreservation. 17th National Congress of Infertility and Reproductive Health with International Participation, 10-13.03.2016- доклад
10. Hristova M., Hristova E., **Petrova N.**, Todorov P. Effect of different cryopreservation methods on hematopoietic stem cells *14th International Symposium for Immunology of Reproduction, 22-24 May, 2015*- постер
11. **Петрова Н.**, Христова Е., Михова А., Генова М., Арабаджиев Б., Тодоров П. Експресия на плурипотентни маркери от овариални клетки на жени от различни възрастови групи. *Докторантски Симпозиум „Молекулярната биология- отблизо. Предизвикателства и перспективи“*, 1-2 декември 2014- доклад
12. Тодоров П., **Петрова Н.**, Христова Е., Биволарски Б. Криоконсервация на овариална тъкан. *Международна научна конференция, 30-31 Май 2013, Стара Загора*- доклад

Благодаря на научния ми ръководител доц. Пламен Тодоров, на д-р Йосиф Димитров, на всички колеги и на семейството ми за оказаната подкрепа!