



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**

**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО**

**Марина Деянова Христова**

**ВЛИЯНИЕ НА ПРОЦЕСА НА КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ВЪРХУ ЕКСПРЕСИЯТА НА  
СПЕЦИФИЧКИ МАРКЕРИ И ПОТЕНЦИАЛА ЗА СПОНТАННА И ИНДУЦИРАНА  
ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ НА СТВОЛОВИ КЛЕТКИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен  
„Доктор”  
Специалност „ Физиология на животните и човека”, шифър 01.06.17

Научен ръководител: доц. Пламен Тодоров, дб

София  
2017г.

Дисертационният труд е написан на 125 страници и включва 34 фигури и 10 таблици. В библиографския списък са цитирани 192 литературни източника.

Научно жури:

Вътрешни членове:

Доц. Пламен Тодоров  
Доц. Бойко Георгиев

Външни членове:

Акад. Богдан Петрунов  
Проф. Росица Конакчиева  
Проф. Бойчо Биволарски

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 програма „Подпомагане на младите учени в БАН”, проект ДФНП-173.

*Забележка: Номерата на фигурите и таблиците не съответстват на тези в дисертационния труд.*



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**

**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО**

Марина Деянова Христова

**ВЛИЯНИЕ НА ПРОЦЕСА НА КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ВЪРХУ  
ЕКСПРЕСИЯТА НА СПЕЦИФИЧКИ МАРКЕРИ И ПОТЕНЦИАЛА ЗА  
СПОНТАННА И ИНДУЦИРАНА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ НА СТВОЛОВИ  
КЛЕТКИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен  
„Доктор”  
Специалност „ Физиология на животните и човека”, шифър 01.06.17

Научен ръководител: доц. Пламен Тодоров, дб

София  
2017г.

## СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

ВКМ – вътрешна клетъчна маса

ЕЦМ – екстрацелуларен матрикс

КМ- костен мозък

МСК – мезенхимни стволови клетки

МТ – мастна тъкан

ПМ – плазмена мембрана

СК – стволови клетки

УК- умбиликална кръв

ХСК – хемопоеични стволови клетки

чЕСК – човешки ембрионални стволови клетки

чМТ-МСК – човешки мезенхимн стволови клетки от мастна тъкан

чФЧК – човешки фетални чернодробни клетки

ЯСК – ядросъдържащи клетки

CD (Cluster of Differentiation) – клъстер на диференциация

CFU (Colony Forming Unit) - Колоно-формираща единица

CPAs (Cryoprotectants) - криопротектанти

DMSO (Dymethyl sulfoxid) – диметил сулфоксид

EG (Ethylen glycol)- етилен гликол

ES (Equilbration Solution) – разтвор за еквилибрация

FBS (Fetal Bovine Serum)– фетален телешки серум

FITC (Fluorescein IsoThioCyanate) – флуоресцин изотиоцианат

Gly (Glycerol) - глицерол

HES (Hydroxyethyl Starch )– хидроксиетил нишесте

PE (PhycoErythrin) – фикоеритрин

PerCP (Peridinin-Chlorophyll Protein) – перидинин хлорофил протеин

VS (Vitrification Solution) – разтвор за витрификация

## **ВЪВЕДЕНИЕ**

През последните години все по-голям интерес предизвикват въпросите относно значението и ролята на стволовите клетки (СК). Най-общо СК се разглеждат като недиференцирани или ниско диференцирани прогенитори, способни да се самообновяват, а при определени условия имат възможността да се диференцират в различни клетъчни типове. Те са основен инструмент за възобновяване, възстановяване или изграждане отново на увредени органи и тъкани в човешко тяло. Поради тези качества, СК са в основата на регенеративната медицина и клетъчната терапия. Към момента са разработени техники за изолиране, култивиране и характеризирание на различни видове СК: ембрионални (получени от предимплантационни ембриони); възрастни, получени от тъкани на фетус или възрастен организъм; индуцирани плурипотентни клетки (иПСК). Разработването и внедряването на ефективни методи за тяхното замразяване са от изключителна важност както за медицинската практика (създаване на банки с материал за трансплантация), така и за нуждите на научния обмен между лабораториите, съхраняването на ценни клетъчни линии и др. Чрез криоконсервацията клетките запазват ценните си свойства с години и се превръщат във важен ресурс за бъдещо лечение. Въпреки това, има данни, че процесът на криоконсервация оказва и някои негативни въздействия върху клетките. Липсва точна информация как влияе замразяването/размразяването върху характеристиките на СК по отношение на тяхната пролиферативна активност, експерията на специфични за тях маркери и потенциала им за диференциация. Това предполага провеждането на по-задълбочен анализ, както и сравнителни изследвания относно ефективността на различните методи за замразяване на СК.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящата работа е да се изследва влиянието на процеса на криоконсервация върху експресията на специфични маркери и потенциала за спонтанна и индуцирана диференциация на мезенхимни и хематопоеични стволови клетки с оглед оптимизиране технологиите за замразяване и съхраняване на този вид биообекти.

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

1. Получаване, размножаване и стокиране на хематопоеични и мезенхимни стволови клетки;
2. Характеризиране на мезенхимни стволови клетки, изолирани от различни източници; Опити за насочена диференциация в остеогенно, адипогенно и невrogenно направление;
3. Изследване на възможността за използване на чФЧК като фидерен слой при култивиране на клетки, изолирани от вътреклетъчната маса на предимплантационни ембриони .
4. Характеризиране на хематопоеични стволови клетки, получени от умбиликална кръв;
5. Изследване влиянието на нискодозирани физични въздействия (микровибрации) върху потенциала за диференциация на ХСК.
6. Сравнителни изследвания на токсичността и криозащитния ефект на проникващи и непроникващи криопротектори върху мезенхимни стволови клетки;
7. Изследване токсичността и криозащитния ефект на криопротектори върху хематопоеични стволови клетки;

8. Изследване влиянието на процеса на криоконсервация върху морфологичните, имунофенотипните и функционалните показатели на стволовите клетки;
9. Сравнителни проучвания върху ефективността на различни методи за криоконсервация (включително витрификация) на МСК и ХСК.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследванията бяха проведени през периода януари 2015 – октомври 2017г. Като опитен материал използвахме умбиликална кръв (получена при физиологично раждане и секцио в СБАЛАГ „Майчин дом”), мастна тъкан (получена при липосукция в МБАЛ „Вита”) и ембриони (получени в Ин витро АГ Медицински център „Димитров”), както и МСК, изолирани от фетален черен дроб (абортен материал). Експериментите бяха извършени с разрешение на комисията по медицинска етика и след получаване на информирано съгласие от пациентите. Използвани бяха следните методики:

1. Изолиране на СК – мезенхимни и хематопоеични СК
2. Клетъчни култури и ко-култивиране
3. *Ин-витро* оплождане и култивиране на предимплантационни ембриони
4. Имунофенотипен анализ
5. Морфологичен анализ
6. Методи за диференциация на СК
7. Криобиологични изследвания:
  - Токсично действие и криопротективен ефект на различни криопротектори;
  - Конвенционално, програмно замразяване и витрификация
8. Тестове за виталност:
  - Оцветяване с Трипаново синьо;
  - Annexin-5-FITC Apoptosis Kit (флоуцитометричен анализ)



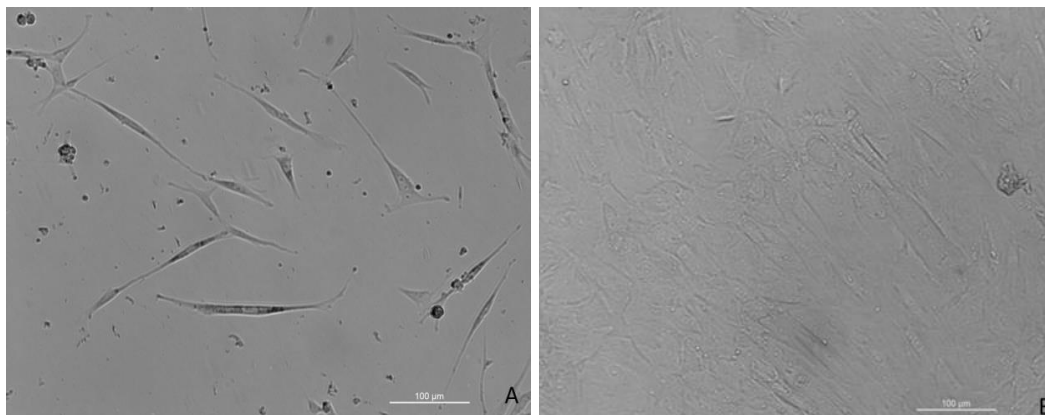
## РЕЗУЛТАТИ

Представените в настоящия дисертационен труд резултати условно могат да се разделят на две групи. Първата обхваща изследванията насочени към характеризиране на изолираните клетъчни култури. Втората група включва крибиологични изследвания с цел оптимизиране протоколите за замразяване и предлагане на подходящ метод за съхранение на изолираните от нас клетки.

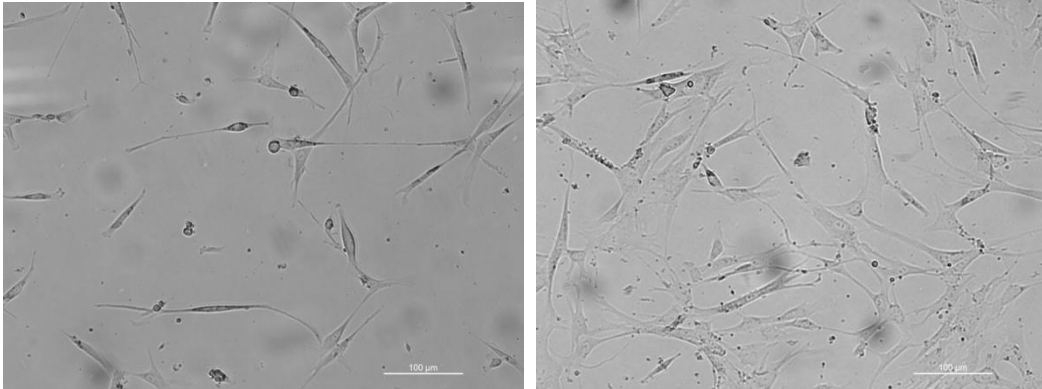
### 1. Мезенхимни стволови клетки (от мастна тъкан и фетален черен дроб)

#### 1.1 Изолиране и култивиране на МСК

За провеждане на експериментите бяха използвани липоаспирати от 21 пациента между 29-48 години и 2 фетуса (абортен материал) на 7<sup>ма</sup> и 11<sup>та</sup> гестационна седмица. Получените първични култури от чМТ-МСК и чФЧК притежаваха фибробластоподобна морфология (Фиг. 1, 2 и 3В) и добра пролиферативна активност. Конфлуентен монослой се образуваше на 8<sup>ми</sup>-10<sup>ти</sup> ден. След пасажирание бе наблюдавано намаляване на времето за удвояване, като достигаша конфлуентност за приблизително 5-6 дни. При плътен монослой бяха наблюдавани характерни класообразни завихрения (Фиг. 3А).

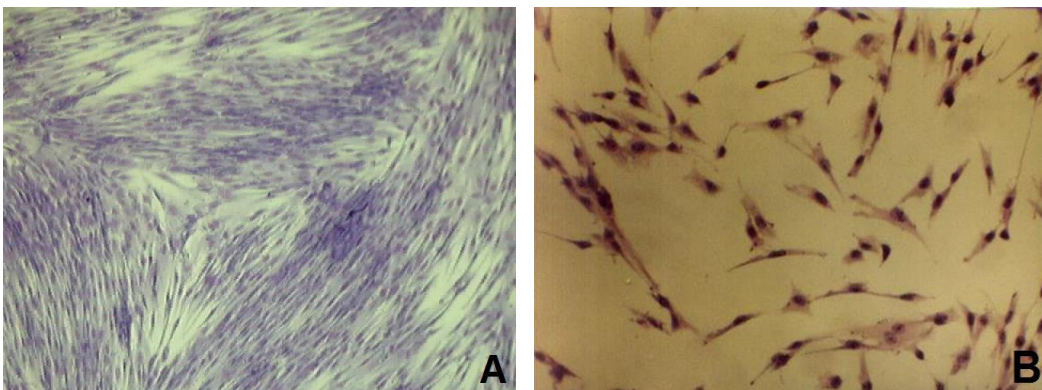


**Фигура 1:** Нативна култура от чМТ-МСК при различна плътност на монослоя (100x).



**Фигура 2:** Нативна култура от чФЧК при различна плътност на монослоя (100x).

След проведен морфологичен анализ бе установено, че клетките имат удължена, предимно биполярна форма без ясно изразени междуклетъчни контакти. Наблюдавахме амфилофилна цитоплазма и сравнително големи ядра с овална форма и 1-3 нуклеоли (Фиг.3).



**Фигура 3:** Морфологичен анализ на МСК при различна конфлуентност на монослоя. А: оцветяване по МГТ (чМТ-МСК, 50x); В: оцветяване с ХЕ (чФЧК, 100x).

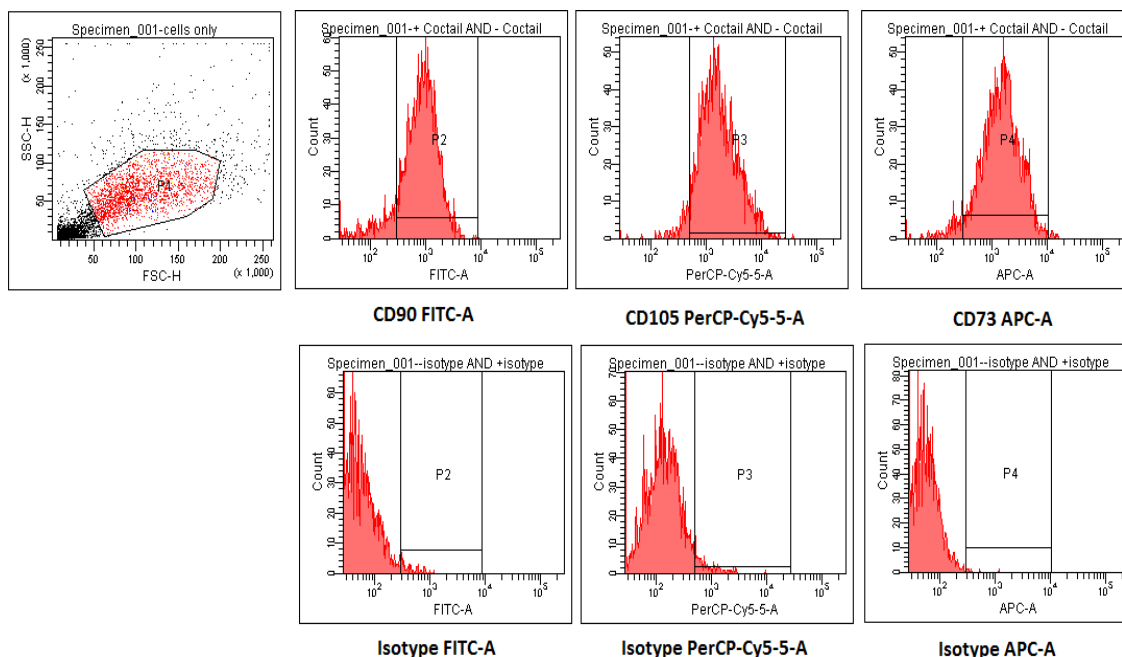
## 1.2. Характеризиране (имунофенотипизиране и диференциация) на МСК

Според стандартите на Международната асоциация по клетъчна терапия, мезенхимните стволови клетки трябва да отговарят на определени минимални критерии: да адхезират към повърхността на лабораторния съд при култивиране; да експресират CD73, CD90 и CD105 и да не притежават повърхностни антигени на хематопоеичната линия CD45 и CD34, а също

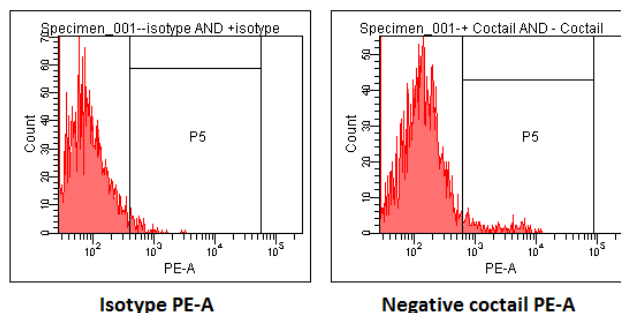
така CD14, CD11b, CD79 $\alpha$ , CD19 и HLA-DR; да се диференцират *ин-витро* в поне две от следните три клетъчни линии - остеобластна, адипоцитна и хондробластна (*Dominici et al, 2006*).

При имунофенотипния анализ на чМТ-МСК бе установена положителна експресия на CD73, CD90 и CD105 (Фиг.4) и негативни сигнали за маркерите CD34, CD11b, CD45, HLA-DR (Фиг.5). Не наблюдавахме значителни различия в експресията на съответните маркери след процес на криоконсервация (Таб. 1). HLA-DR (Human Leukocyte Antigen - antigen D Related) е МНС клас II клетъчноповърхностен рецептор, отговорен в повечето случаи за имунологичното отхвърляне при трансплантация. Също така е причина за някои автоимунни заболявания. Липсата на експресия на HLA-DR антигена при МСК обуславя тяхната ниска имуногенност, което определя високия им потенциал за прилагането им за алогенна трансплантация, както и за лечение на автоимунни заболявания.

При чФЧК бе отчетен сходен резултат. Наблюдавана бе положителна експресия за CD90, CD73, CD105 и CD13 (Фиг.6) и негативни сигнали за CD34, CD45, HLA-DR, CD11b, CD14, CD10, CD56, CD63, CD62L, CD61 и CD38 (Фиг. 7). Важно е да се отбележи, че данните за повърхностните антигени са подобни при свежи и замразени клетки и показват, че процесът на криоконсервация не влияе върху нивото на експресия на изследваните маркери (Таб. 2).



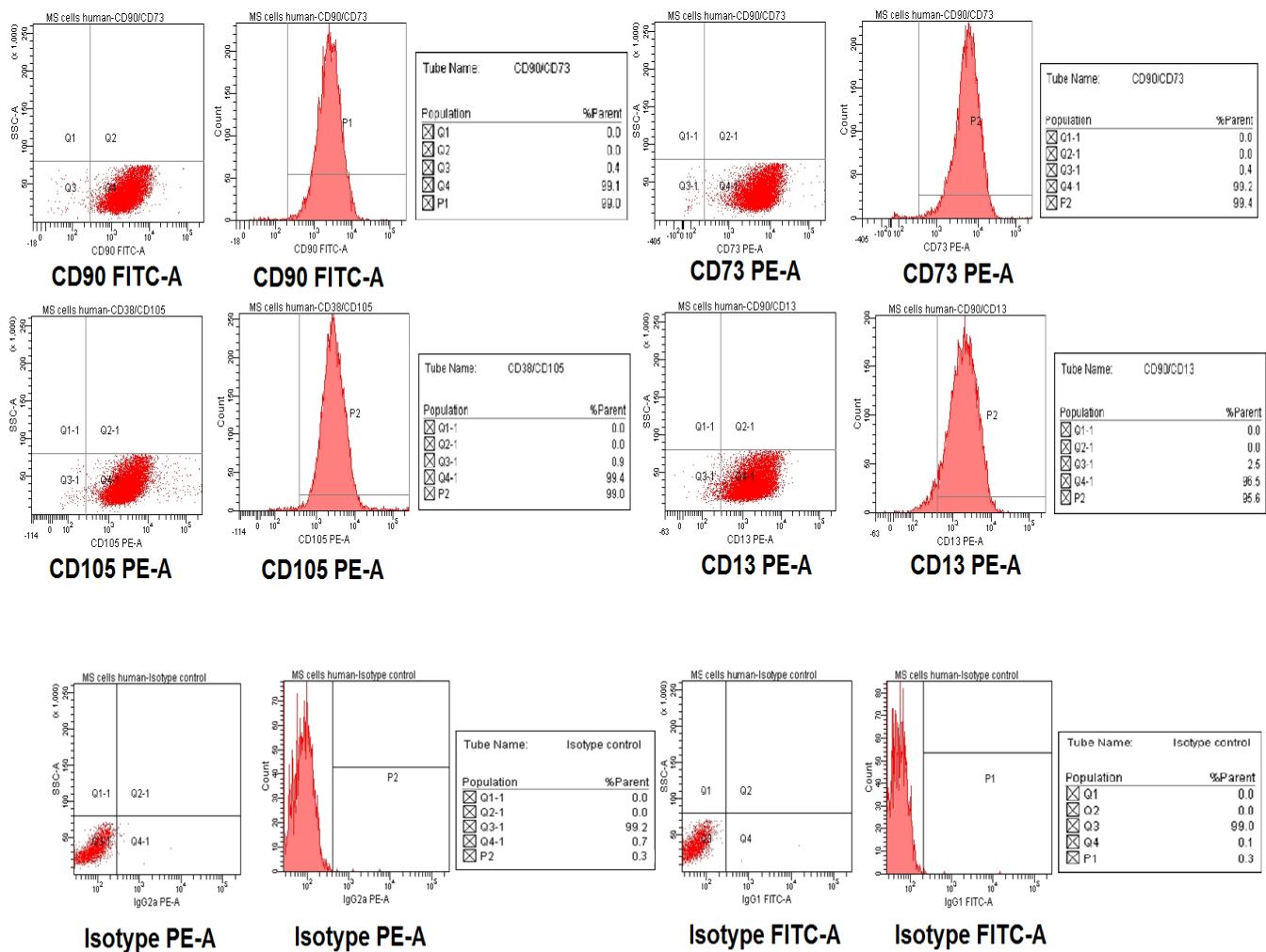
**Фигура 4:** Положителна експресия на повърхностни антигени от чМТ-МСК и съответните изотипни контроли за FITS, PerCP-Cy5-5, APC.



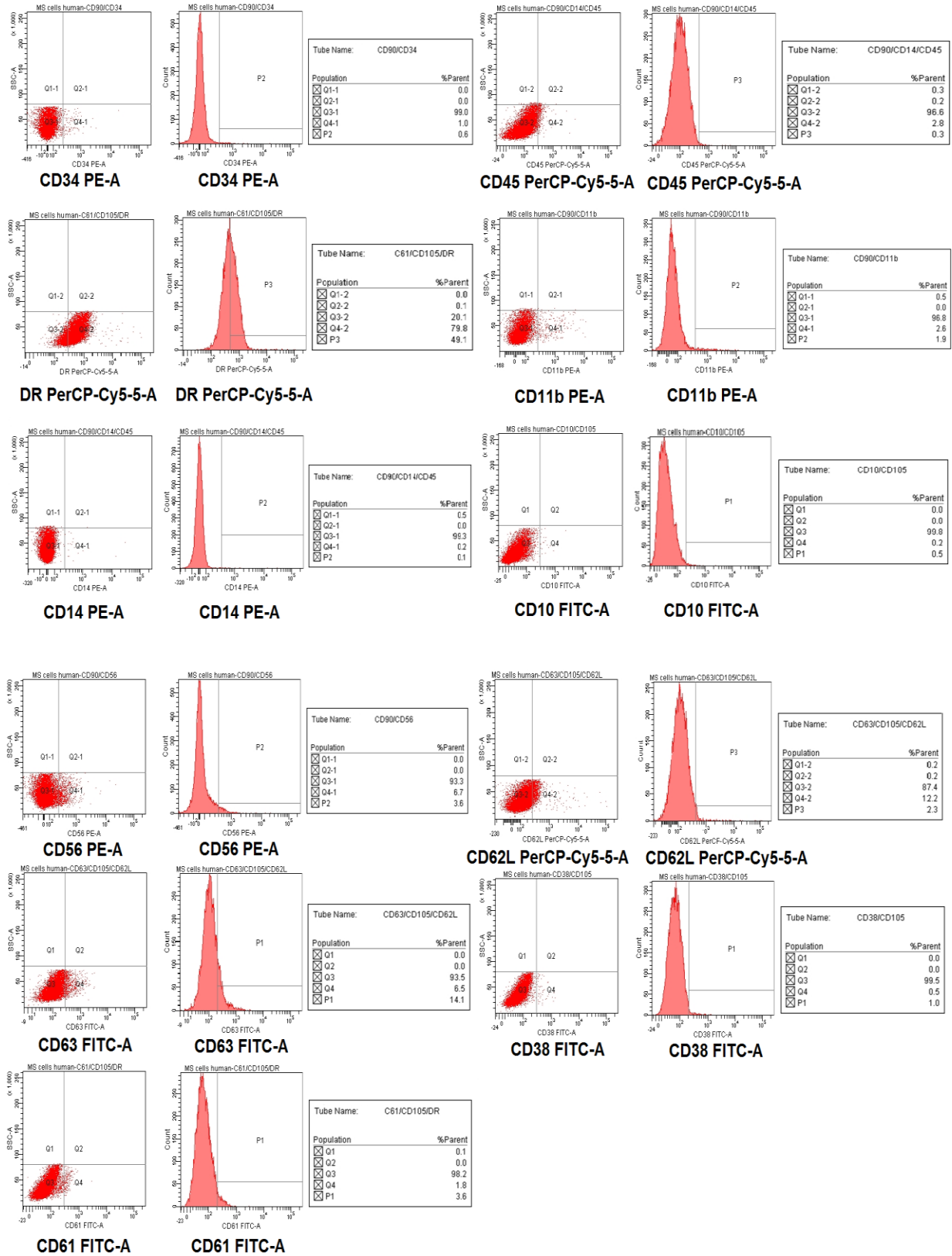
**Фигура 5:** Отрицателна експресия на повърхностни маркери от чМТ-МСК и съответната изотипна контрола за PE.

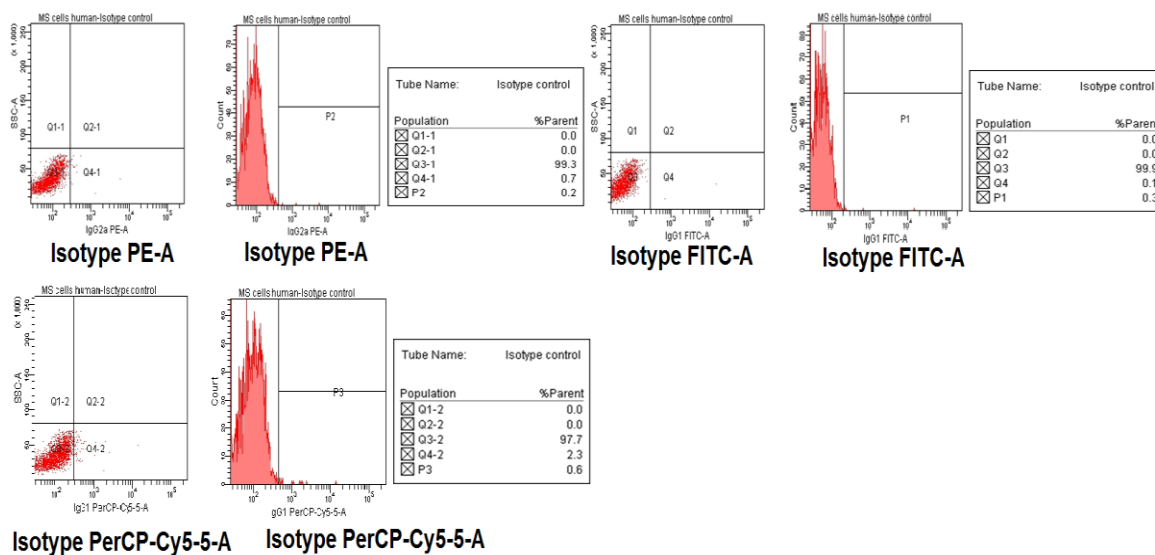
**Таблица 1:** Експресия на CD90, CD105 и CD73 преди и след криоконсервация на чМТ-МСК.

МСК маркери	Свежи чМТ-МСК	Размразени чМТ-МСК
CD90	89.0%	87.1%
CD105	94.8%	95.3
CD73	94.6	92.4



**Фигура 6:** Положителна експресия на повърхностни антигени от чФЧК и съответните изотипни контроли за PE и FITC.





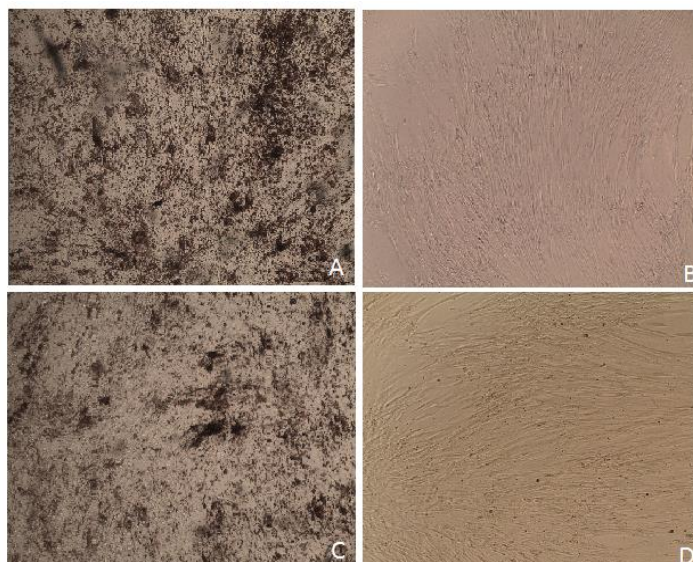
**Фигура 7:** Отрицателна експресия на повърхностни маркери от ЧФЧК и съответните изотипни контроли за PE, FITC и PerCP.

**Таблица 2:** Експресия на CD90, CD105, CD73 и CD13 преди и след криоконсервация на чФЧК.

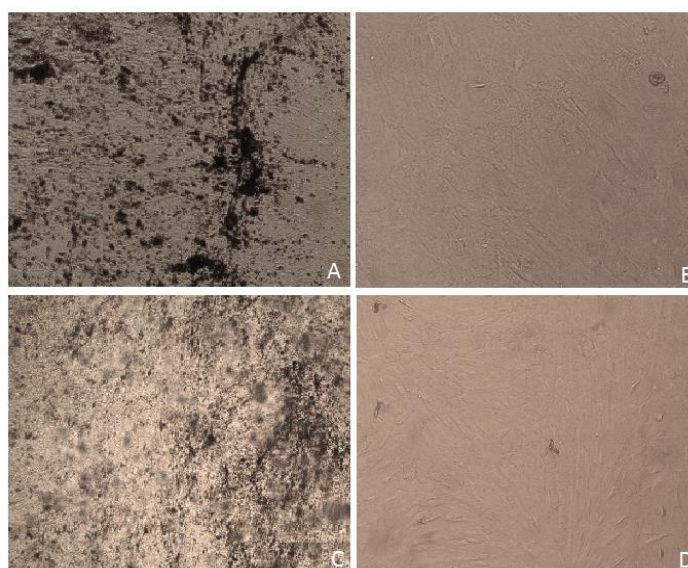
МСК маркери	Свежи чФЧК	Размразени чФЧК
<b>CD90</b>	<b>99.4%</b>	<b>98.5%</b>
<b>CD105</b>	<b>99.2%</b>	<b>99.0%</b>
<b>CD73</b>	<b>98.2%</b>	<b>96.5%</b>
<b>CD13</b>	<b>93.6%</b>	<b>91.9%</b>

Нашите изследвания показаха, че получените чМТ-МСК и чФЧК успешно се диференцират в остеогенно, адипогенно и невrogenно направление преди и след криоконсервация. Остеогенната диференциация бе детектирана чрез визуализиране на минералните отлагания в клетките - Von Kossa оцветяване (Фиг. 8 и 9). Натрупването на липидни капки при адипогенезата бе установено чрез оцветяване с Oil Red O (Фиг. 10 и 11). Нислова грануляция, характерна за клетки с невropодобен фенотип, бе наблюдавана след оцветяване с Cresyl violet (Фиг. 12 и 13).



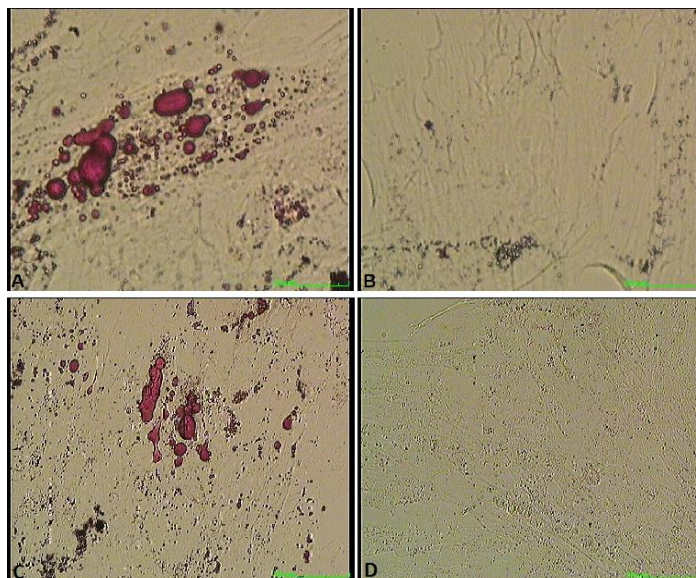


**Фигура 8:** Остеогенна диференциация на чМТ-МСК и чФЧК. Оцветяване по Von Kossa. А: чМТ-МСК след остеогенна индукция (50x); В: отрицателна контролам за остеогенна диференциация (50x); С: остеогенна индукция на чФЧК (50x); D: отрицателна контрола за остеогенна диференциация.

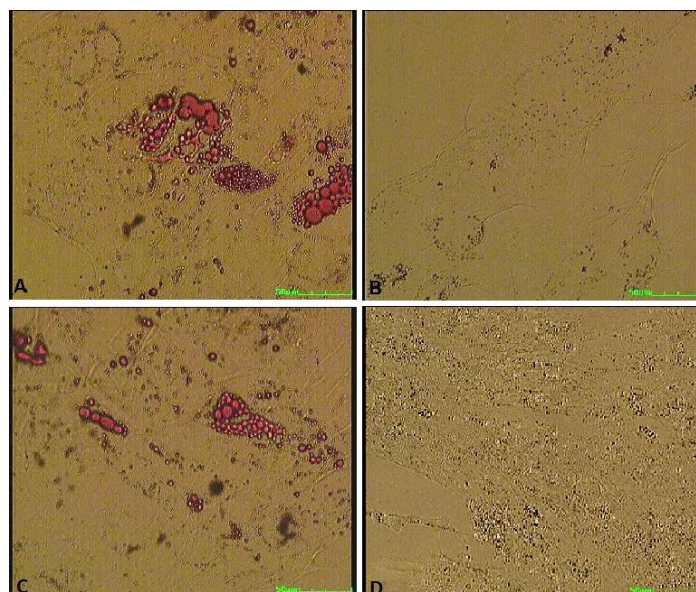


**Фигура 9:** Остеогенна диференциация на чФЧК. Оцветяване по Von Kossa. А: остеогенна индукция на свежи чФЧК (50x); В: отрицателна контрола за остеогенна диференциация – свежи клетки (50x); С: остеогенна индукция на чФЧК след криоконсервация (50x); D: отрицателна контрола за остеогенна диференциация – размразени клетки (50x).

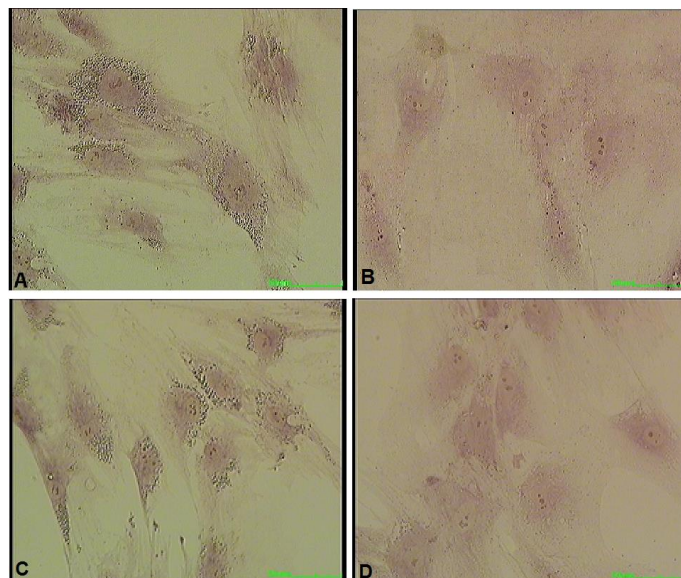




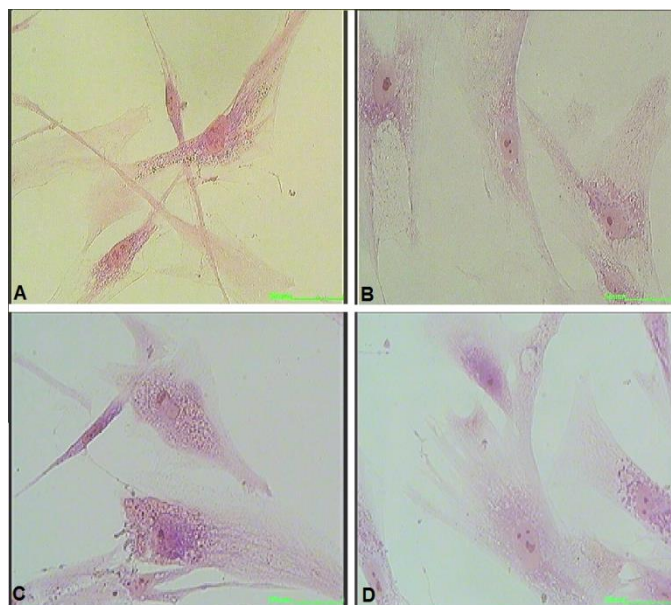
**Фигура 10:** Адипогенна диференциация на чМТ-МСК. Оцветяване с Oil Red O. А: свежи чМТ-МСК след адипогенна индукция (400x); В: отрицателна контрола (свежи клетки)(400x); С: адипогенна диференциация на чМТ-МСК след криоконсервация (200x); D: отрицателна контрола (размразени клетки) (200x).



**Фигура 11:** Адипогенна диференциация на чФЧК. Оцветяване с Oil Red O. А: адипогенна индукция на свежи чФЧК (200x); В: отрицателна контрола (свежи клетки) (200x). С: адипогенна диференциация на чФЧК след криоконсервация (200x); D: отрицателна контрола (размразени клетки) (200x).



**Фигура 12:** Неврогенна диференциация на чМТ-МСК. Оцветяване с Cresyl violet. А: свежи чМТ-МСК след неврогенна индукция (200x); В: отрицателна контрола (свежи клетки) (200x); С: неврогенна диференциация на чМТ-МСК след криоконсервация (200x); D: отрицателна контрола (размразени клетки) (200x).

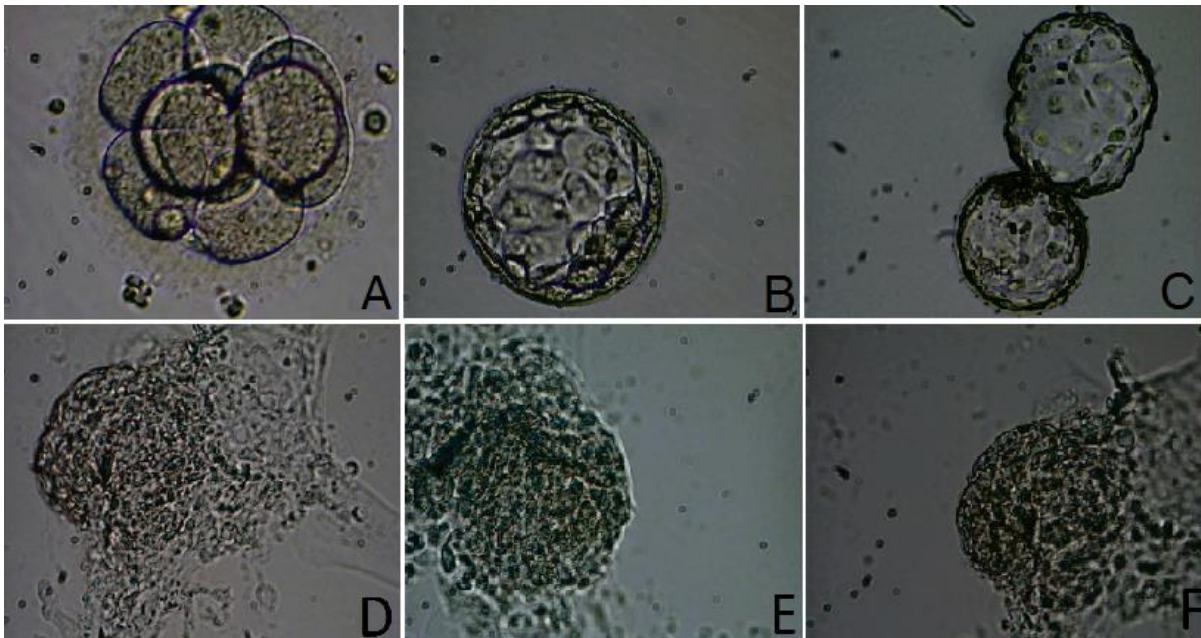


**Фигура 13:** Неврогенна диференциация на чФЧК. Оцветяване с Cresyl violet. А: свежи чФЧК след неврогенна индукция (200x); В: отрицателна контрола (свежи клетки) (200x); С: неврогенна индукция на чФЧК след криоконсервация (200x); D: отрицателна контрола (размразени клетки) (200x).



При двата типа клетки (чМТ-МСК и чФЧК) бяха отчетени сходни резултати преди и след криоконсервация. Важно е да отбележим, че не бе установена спонтанна диференциация на клетките в следствие на процес на замразяване.

Феталните чернодробни клетки бяха допълнително изследвани за възможността за използването им като фидерен слой при култивиране на клетки, изолирани от вътреклетъчната маса на предимплантационни ембриони. Извършено бе ко-култивиране на клетки от ВКМ върху предварително инактивиран (с митомицин С) фидерен слой от чФЧК (Фиг. 14). Морфологията и характера на растеж на изолираните от ВКМ клетки ни даде основание да предположим, че това са ЕСК.

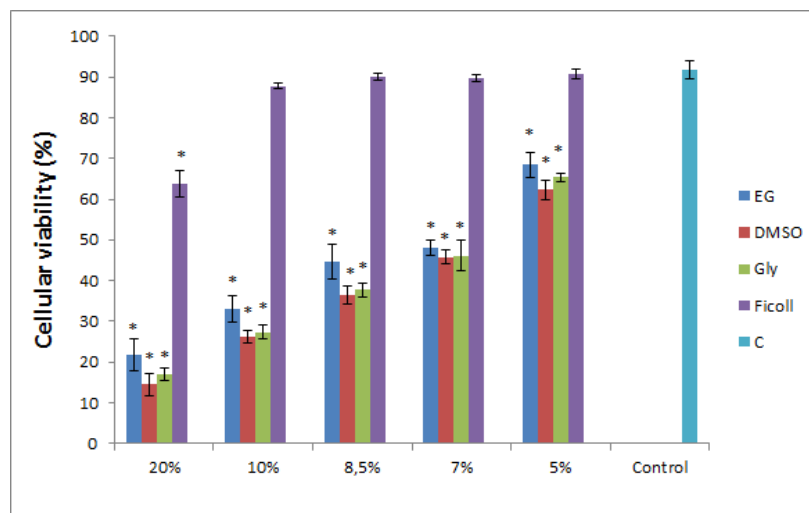


**Фигура 14:** Получаване на клетки от ВКМ: А: Ембрион (3-ти ден)-50x; В: Бластицист (5-ти ден)- 50x; С: Излюпен бластоцист -50x; D /E /F: първична култура от клетки на ВКМ (100x)

### 1.3.Криобиологични изследвания върху МСК

Характерно за технологиите за криоконсервация е използването на криопротективни среди. Желателно е те да са нетоксични, химически инертни, неимуногенни и да осигуряват висока преживяемост на клетките след размразяване. Независимо от силно изразената криозащитна активност, повечето ендоцелуларни криопротектори имат цитотоксичен ефект, който зависи главно от тяхната концентрация, температура и време на експозиция (*Best BP, 2015*). Всеки клетъчен тип се характеризира с определена пропускливост на плазмената мембрана (ПМ), което води до клетъчноспецифичен отговор към различните скорости на охлаждане и към действието на отделните криопротектори.

Това ни даде основание да изследваме токсичността и криозащитното действие на някои широко използвани в практиката CPAс върху виталитета на СК. Като показател за жизнеспособността проследихме и времето за достигане на плътен монослой на чМТ-МСК. За целта извършихме 30 минутна инкубация (37C°) на клетките с различни концентрации (20%, 10%, 8.5%, 7%, 5%) на глицерол (Gly), DMSO, етиленгликол (EG) - проникващи CPAс и Ficoll-70 (непроникващ криопротектор). Най-висок цитотоксичен ефект наблюдавахме при пробите, третирани с DMSO. Статистически значима по-ниска клетъчна жизнеспособност бе установена дори след третиране с 5%-я разтвор ( $p < 0.001$ , в сравнение с контролите). Сходни резултати бяха отчетени при културите инкубирани с глицерол (Фиг.15).



**Фигура 15:** Виталитет на МСК след третиране с различни криопротектори (Оцветяване с Трипаново синьо). Контрола (К); Диметилсулфоксид (DMSO); Етиленгликил (EG); Глицерол (Gly). \* статистически достоверна разлика спрямо (p<0,001).

Най-високата използвана от нас концентрация (20%) на EG, DMSO, Gly, доведе до значително намаляване на пролиферативната активност на чМТ-МСК, в резултат на което плътен монослой не бе формиран в продължение на 14 дни. Виталността на клетките при 20% Ficoll-70 бе редуцирана (63.8% ± 3.1), но при всички останали концентрации не бяха отчетени значителни разлики в сравнение с контролите (Фиг. 15). Изследван бе и криозащитния ефект на съответните вещества (в същите концентрации при различни режими на охлаждане). Получените резултати показаха, че независимо от токсичното въздействие на DMSO той проявява най-добър криозащитен ефект, като процентът витални клетки при всички от тестваните концентрации на DMSO бе значително по-висок в сравнение с останалите изследвани вещества. Това ни даде основание в по-нататъшните си изследвания да използваме DMSO в протоколите за бавно замразяване.

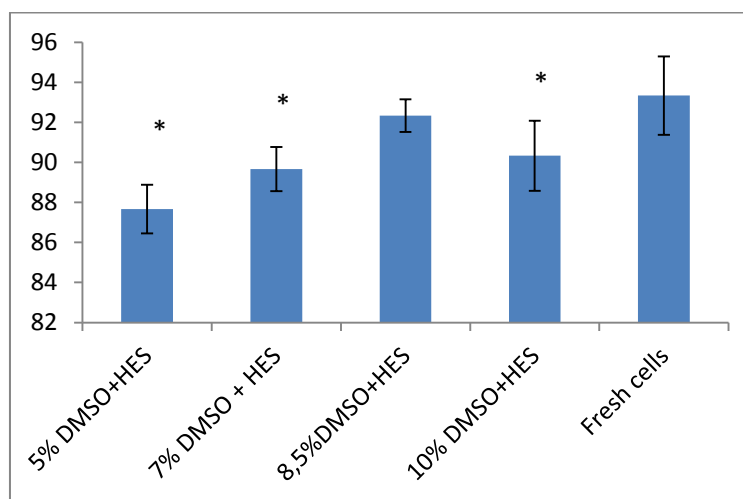
С цел оптимизиране на протоколите за криоконсервация на чМТ-МСК тествахме различни среди за замразяване (Таб.3). За намаляване на токсичния

ефект на проникващите криопротектори се препоръчва към средата да се добавят и непроникващи CPAs (*Lawson A et al, 2011*). Тъй като Ficoll-70 не е одобрен за медицинска употреба и поради гореизложените причини, използвахме криопротективна среда, съдържаща комбинация от DMSO и хидроксиетил нишесте (HES)(непроникващ криопротектор) (Таб. 3).

Средата с 8.5% DMSO+HES се оказва най-благоприятна и процента виталност след размразяване бе  $92.3 \pm 0.8\%$  (Фиг.16).

**Таблица 3:** Видове среди за криоконсервация и процент виталност при МСК след програмно замразяване.

Криопротективна среда	Виталитет МСК%
5% DMSO+HES	87.7±1.2
7% DMSO+HES	89.7±1.1
8,5% DMSO+HES	92.3±0.8
10% DMSO+HES	90.3±1.7
Fresh cells	93.3±1.3



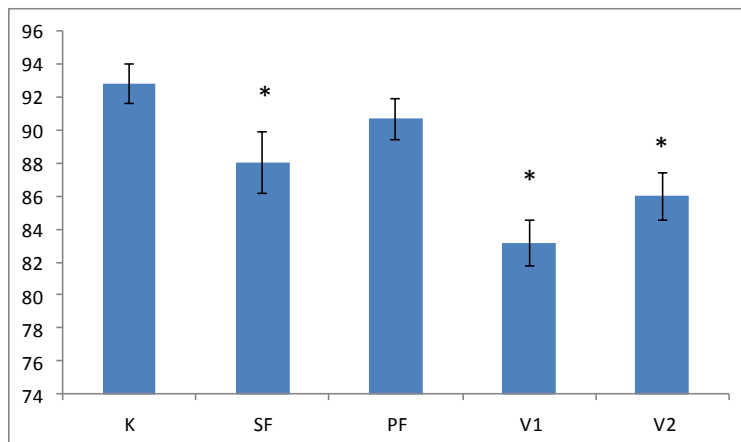
**Фигура 16.** Виталитет на чMT-МСК след програмно замразяване под защитата на криопротективна среда, съдържаща различна концентрация на DMSO в комбинация с HES (оцветяване с трипаново синьо). \* статистически достоверна разлика спрямо контролата: 5% и 7% DMSO+HES ( $p < 0.001$ ); 10% DMSO+HES ( $p < 0.05$ ).

Най-ниската концентрация на DMSO доведе до намалена преживяемост на клетките, което доказва, че балансът между токсичния ефект на CPAs и техните криозащитни свойства определя оптималната им концентрация в средите за замразяване.

Към момента за криоконсервация в практиката се прилагат два принципно различни подхода – бавно замразяване и витрификация. Към първия спадат конвенционалното, при което се използва стъпково намаляване на температурата и програмното замразяване. Преимущество на конвенционалното е, че е сравнително евтино и не се изисква специализирана апаратура. Като недостатък следва да се отбележи слабата ефективност при някои биообекти (напр. ооцити, ембриони и др). Замразяването с помощта на програмен замразител е прецизен метод, при който стриктно се следи скоростта на охлаждане на клетъчната суспензия, спрямо зададената му програма. Витрификацията е метод, при който системата „обект-среда“ замръзва в аморфно (безкристално) състояние. Това се постига чрез свръхвисоки скорости на охлаждане и/или използването на високи концентрации криопротектори.

С цел подбор на подходящ подход за замразяване на чМТ-МСК бяха проведени сравнителни изследвания относно влиянието на различните методи за криоконсервация (конвенционално замразяване, програмно замразяване и витрификация) върху виталитета на клетките.

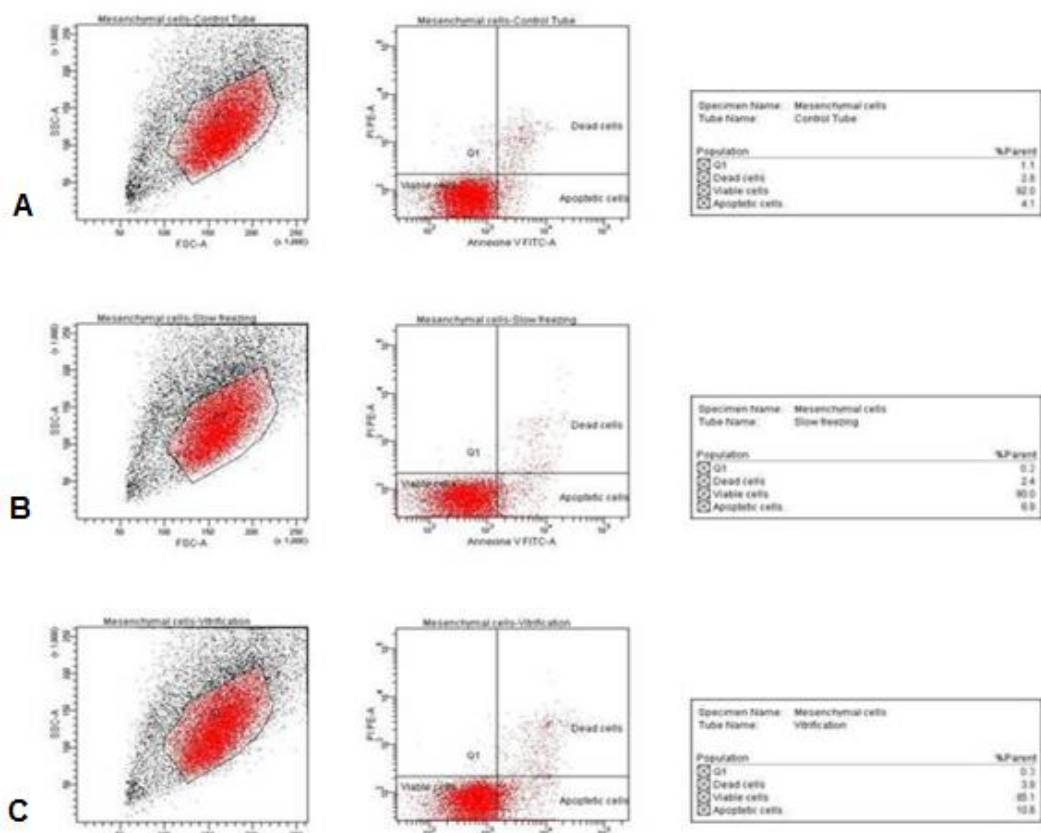
От получените резултати установихме, че чМТ-МСК са криотолерантни и запазват сравнително висок процент преживяемост след всички изпитани методи за криоконсервация (Фиг. 17).



**Фигура 17:** Виталитет на чMT-MCK след различни методи за криоконсервация (оцветяване с трипаново синьо). К: контрола; SF: конвенционално замразяване; PF: програмно замразяване; V1: първи протокол за витрификация; V2: витрификация втори протокол. \* статистически достоверна разлика спрямо контролата ( $p < 0.001$ ).

Флуоцитометричния анализ също показва по-висок процент на витални клетки след програмно замразяване – 90.0% (отрицателни за анексин V-FITC и пропидиев йодид), 6.9% апоптотични (положителни за анексин V-FITC и негативни за пропидиев йодид) и 2.4% мъртви или клетки в крайна фаза на апоптоза (положителни за анексин V-FITC и пропидиев йодид). При използване на витрификация като метод за криоконсервация 85.1% от клетките запазиха виталността си, 10.8% бяха апоптотични и 3.9% мъртви. Резултатите от контролната проба (свежи клетки) бяха , 92.0% витални, 4.1% апоптотични и 2.8% мъртви (Фиг. 18 и Таб. 4).





**Фигура 18:** Виталност на чМТ-МСК след различни методи за криоконсервация – флоуцитометричен анализ. А: контролна проба; В: след програмно замразяване; С: след витрификация (втори протокол).

**Таблица 4:** Сравнителен анализ на влиянието на различни методи за замразяване върху виталитета на МСК.

	<b>Контрола</b>	<b>Бавно замразяване</b>	<b>Витрификация</b>
<b>Витални клетки</b>	<b>92.0%</b>	<b>90.0%</b>	<b>85.1%</b>
<b>Мъртви клетки</b>	<b>2.8%</b>	<b>2.4%</b>	<b>3.9%</b>
<b>Апоптични клетки</b>	<b>4.1%</b>	<b>6.9%</b>	<b>10.8%</b>

МТ-МСК показаха стабилност в морфологично отношение и запазиха свойствата и имунофенотипните си характеристики след размразяване.

*Shivakumar SB et al (2015)* съобщават за сходни резултати при МСК от пъпна връв, които не променят основните си характеристики и потенциала за диференциация преди и след замразяване/размразяване. От използваните от нас техники за криоконсервация на чМТ-МСК бе установено, че програмното замразяване е най-ефективният метод за тяхното дългосрочно съхранение.

Същите криобиологични изследвания проведохме с чФЧК. Получените резултати бяха сходни с тези при чМТ-МСК. Отново бе наблюдавано по-слабо токсичното действие на етиленгликола в сравнение с DMSO и глицерол. Независимо от това DMSO оказва най-добър криопротективен ефект при замразяване. При сравнителни изследвания на различни методи за замразяване (конвенционално, програмно, витрификация) най-удовлетворяващи резултати бяха получени при програмно замразяване под защитата на DMSO.

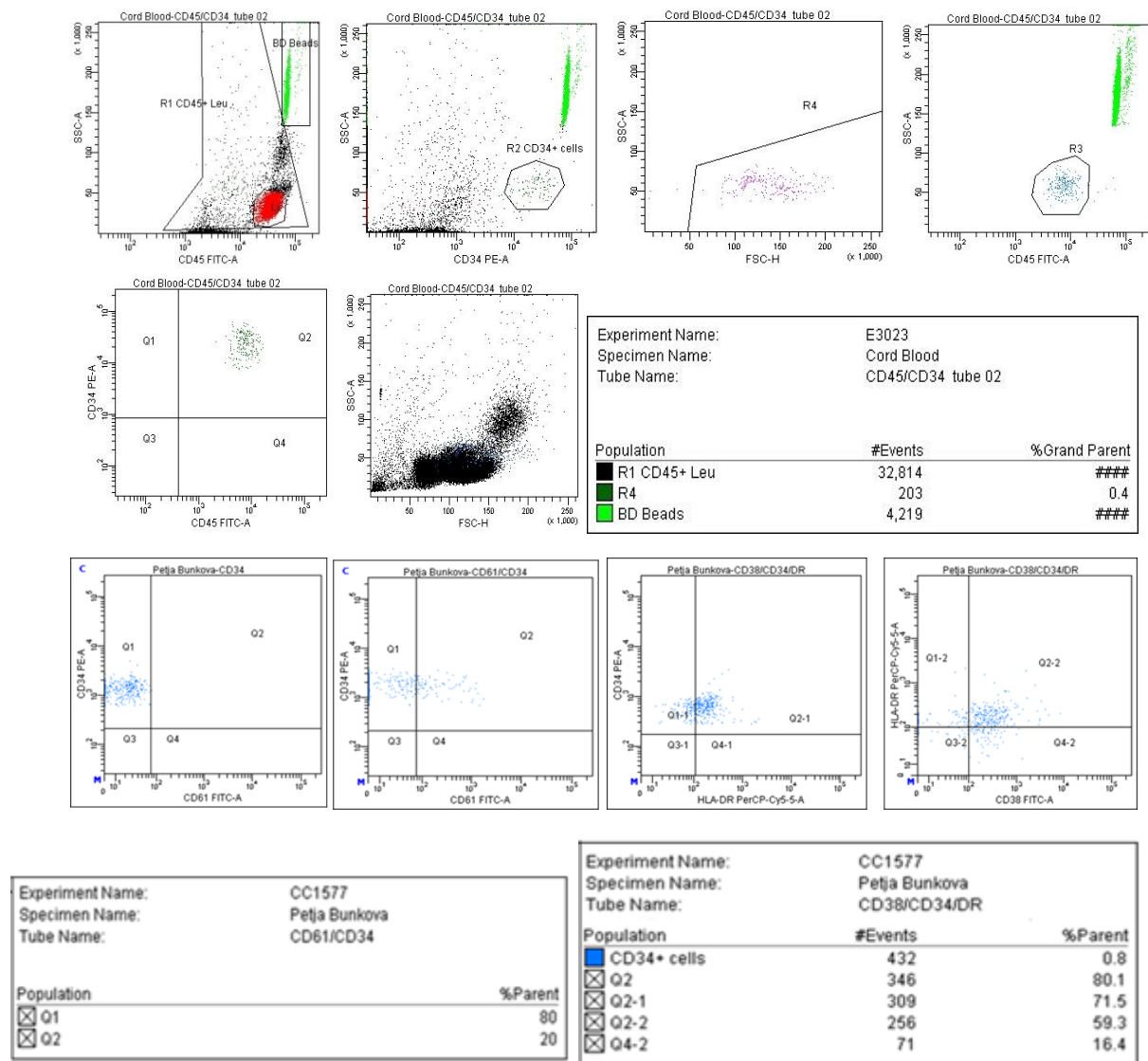
## **2. Хемопоетични стволови клетки**

### **2.1. Изолиране на ХСК от умбиликална кръв**

За нашите проучвания бяха получени 43 единици умбиликална кръв, като средната възраст на родилките бе 31 г. (22-41г). Хемопоетичните СК бяха изолирани на базата на тяхната миграционна способност при центрофугиране през *Ficoll-Paque PLUS*. След обработка на УК средното количество ядросъдържащи клетки (ЯСК) бе  $21.06 \times 10^9/l$ , от тях  $CD34^+$  клетките бяха средно 0.6%. Не бе отчетена разлика в процента  $CD34^+$  клетки при естествено раждане (средно 0.40%, n=24) и секцио (средно 0.41%, n=19).

## 2.2. Характеризиране (имунофенотипизиране и диференциация) на ХСК

Чрез флоуцитометричен анализ бяха отчетени процентното съдържание на CD34<sup>+</sup> клетки в пробите, както и процентното съдържание на различните субпопулации CD34 клетки: CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>DR<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>DR<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>DR<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>DR<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD61<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup> (Фиг.19).



Фигура 19: Флоуцитометричен анализ на обработена кръв

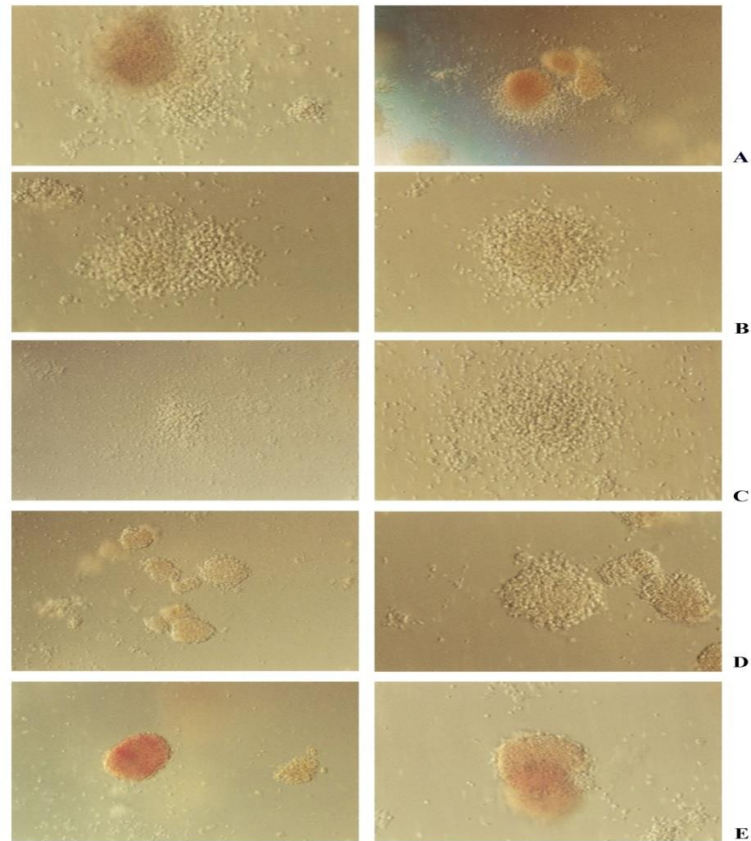
Сподед изискванията за хематопоеични стволови клетки, имунофенотипният им профил трябва да съответства на CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> и DR<sup>-</sup>. Първите стъпки на хематопоеична диференциация се свързват с появата на експресия на DR маркера (*Huss R, 2000*). Средният процент CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> и CD34<sup>+</sup> DR<sup>-</sup>, в изследваните от нас проби бе 13.90% (7%- 49%) и 56.71% (26%- 94%) съответно. За CD34<sup>+</sup> CD61<sup>-</sup> и CD34<sup>+</sup> CD61<sup>+</sup> популациите бяха отчетени следните стойности – 51.6% (32%-87%) и 32.6% (17% - 43%) съответно. Процентното съдържание на останалите популации са представени в Таблица 5.

**Таблица 5:** Средни стойности на процентното съдържание на различните CD34<sup>+</sup> субпопулации.

CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup>	13.90% (7-49%)
CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>	58.35%(51-94%)
CD34+DR-	56.71% (26-94%)
CD34 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup>	35.72% (6-74%)
CD34 <sup>+</sup> CD61 <sup>-</sup>	51.6% (32-87%)
CD34 <sup>+</sup> CD61 <sup>+</sup>	32.6% (17-43%)
CD38 <sup>-</sup> DR <sup>+</sup>	8.8% (0-22%)
CD38 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup>	42.8 (7-74%)
CD38 <sup>+</sup> DR <sup>-</sup>	10.1% (3-21%)

След изолиране и характеризиране част от ядросъдържащата фракция клетки бе замразена, а останалата използвахме за допълнителни изследвания. С цел изследване на колоноформираща активност ХСК те бяха култивирани в среда MethoCult™ medium (*Methylcellulose-based media*). След 12-14-дневно култивиране наблюдавахме получените колонии в резултат на диференциация на ХСК (Фиг.20):

- *CFU-E (Colony-forming unit-erythroid)* - Колонообразуваща еритроидна единица, продуцираща един до два кълстера, съдържащи от 8 до 200 еритробласти. Тя представлява зрял еритроиден предшественик, който се диференцира в присъствието на еритропоетин.
- *BFU-E (Burst-forming unit-erythroid)* - образува колонии, съдържащи повече от 200 еритробласти. BFU-E са по-слабо диференцирани прогенитори в сравнение с CFU-E.
- *CFU-G (Colony-forming unit-granulocyte)* - продуцира по 40 или повече гранулоцити.
- *CFU-M (Colony-forming unit- macrophage)* - продуцира по 40 или повече макрофаги.
- *CFU-GM (Colony-forming unit-granulocyte, macrophage)* - Колонообразуваща единица, продуцираща гранулоцити и макрофаги. Колониите съдържат по 40 или повече гранулоцити и макрофаги. Колониите CFU-GM, произхождат от единични прогенитори, които могат да съдържат хиляди клетки, организирани в единични или множествени кълстери.
- *CFU-GEMM (Colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte)* - Колонообразуваща единица, продуцираща гранулоцити, еритроцити, макрофаги и мегакариоцити. Поради примитивната си природа CFU-GEMM образуват големи колонии, съдържащи повече от 500 клетки.

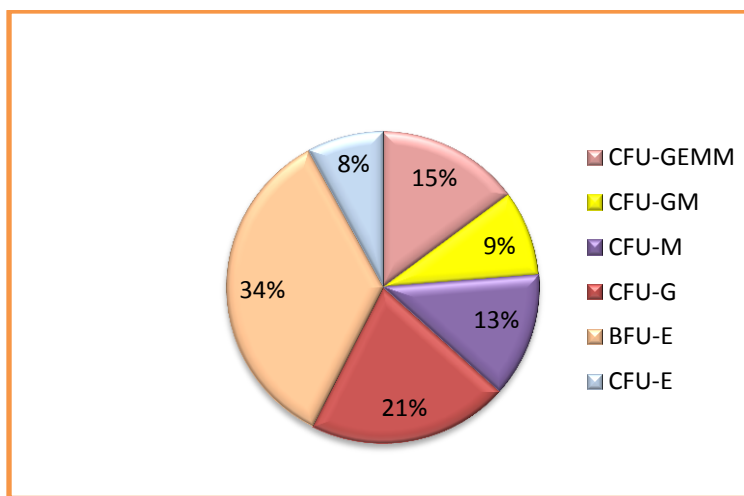


**Фигура 20:** Клоногенна активност на ХСК: А: CFU-GEMM; В: CFU-GM; С: CFU-M; D: CFU-G; Е: CFU-E.

Съществуват данни, според които микровибрациите водят до повишаване на потенциала за диференциация и регенерация на МСК и иПСК (*Dalby MJ et al, 2014; Kosawada T et al, 2016*) и подпомагат ремоделирането на тъканите (*Paul NE et al, 2017*), но няма публикувани данни за ХСК. Това ни провокира да проследим влиянието и ефекта на нискодозирани физични въздействия върху колоноформиращата активност на ХСК при *ин-витро* култивиране. За целта използвахме апарат Viboviduct 1500 (*SimSoTec GmbH, Germany*) с честота на трептене 35Hz за 5 сек. през 30-минутни интервали.

От получените резултати бе установено, че изследваните клетки проявяват добра колоноформираща активност. Наблюдавахме формиране на всички видове колонии: CFU-E, BFU-E, CFU-GM, CFU-G CFU-M и CFU-

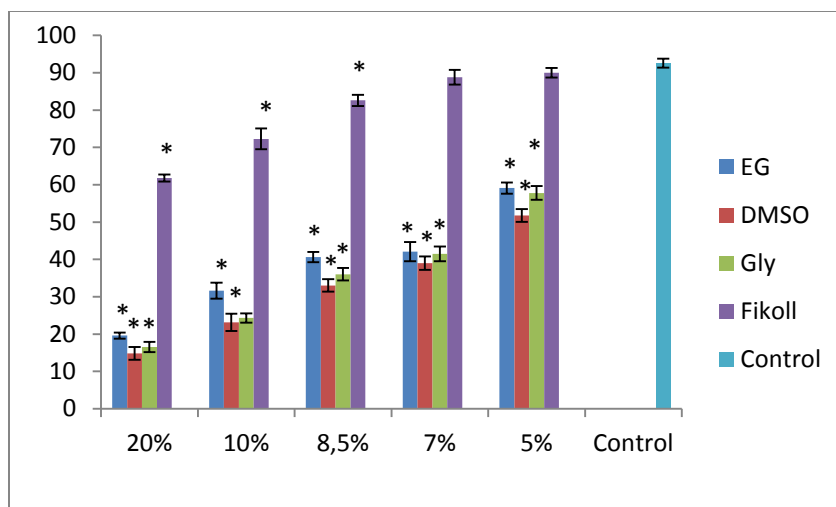
СЕММ, както в контролната, така и в експерименталната група (Фиг.20). В хода на изследването не открихме съществени различия в съотношението на видовете CFU в двете групи (Фиг. 21). Въпреки това, наблюдавахме, че колонии на клетките в условия на микровибрации се образуват и растат по-бързо, отколкото в контролата.



**Фигура 21:** Съотношение на различните типове колонии.

### 2.1. Криобиологични изследвания върху ХСК

Сравнен бе цитотоксичния ефект на различни криопротектори (глицерол, етилен гликол, ДМСО и Ficoll-70) върху ХСК. Тествани бяха 20%, 10%, 8.5%, 7% и 5% разтвори от съответните вещества (Фиг. 22). Най-слаб ефект върху виталитета и колонофирмиращата активност на ХСК бе наблюдаван след инкубирането им с Ficoll-70. Под действие на глицерола бе отчетено значително понижаване на жизнеспособността на клетките. Инкубирането на клетките с DMSO оказва най-негативно влияние, както върху техния виталитет, така и върху пролиферативната и CFU им активност.



**Фигура 22:** Виталитет на ХСК след третиране с различни криопротектори (Оцветяване с Трипаново синьо). Диметилсулфоксид (DMSO); Етиленгликил (EG); Глицерол (Gly). \* статистически достоверна разлика спрямо контролата ( $p < 0.001$ ).

Проследен бе и криозащитният ефект на дадените криопротектори. Тествани бяха същите концентрации от съответните вещества при различни скорости на охлаждане. Интерес представлява констатираният от нас факт, че както при МСК, така и при ХСК независимо, че етиленгликолят има по-слабо токсично действие от DMSO и глицерол, не оказва добър криозащитният ефект при този вид клетки. В сравнение с останалите изследвани криопротектори DMSO доведе до запазване на най-висок процент преживяемост на клетките след размразяване, поради което го използвахме в по-нататъшните си експерименти в средите за криоконсервация.

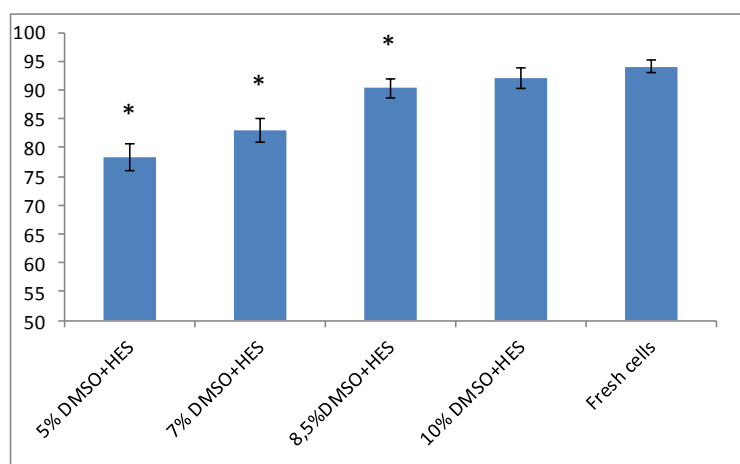
За подбор на подходяща криопротективна среда за ХСК тествахме различни концентрации на DMSO в комбинация с HES-непроникващ криопротектор (Таб.6). За целта използвахме програмно замразяване, тъй като този метод се прилага рутинно за замразяване на СК в практиката.



**Таблица 6:** Видове среди за криоконсервация и процент виталност при ХСК след програмно замразяване.

Криопротективна среда	Виталитет ХСК %
5% DMSO+HES	78.3±2.33
7% DMSO+HES	83.3±2.06
8,5% DMSO+HES	90.3±1.75
10% DMSO+HES	92.1±1.72
Fresh cells	94.1±1.16

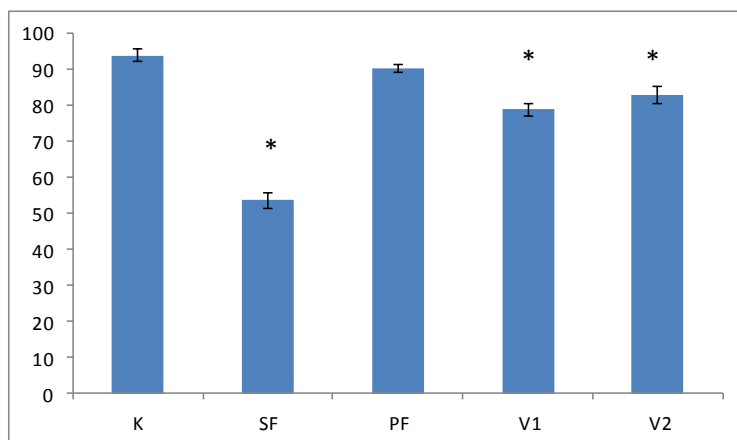
Най-добри резултати наблюдавахме при използване на средата съдържаща 10% DMSO и 6% HES (Фиг.23). Клетките притежаваха по-висока жизнеспособност (% виталност) и колоноформираща активност след размразяване в сравнение с останалите тествани криопротективни разтвори. Подобни данни са публикувани от *Chen et al (2015)* и *Martinetti D et al (2017)*, които сравняват влиянието на различни среди за замразяване на ХСК от периферна и умбиликална кръв и установяват, че комбинацията между DMSO и трахелоза води до запазване на най-висока преживяемост на клетките.



**Фигура 23:** Виталитет на ХСК след програмно замразяване (оцветяване с трипаново синьо). \* статистически достоверна разлика спрямо контролата ( $p \leq 0,001$ ).

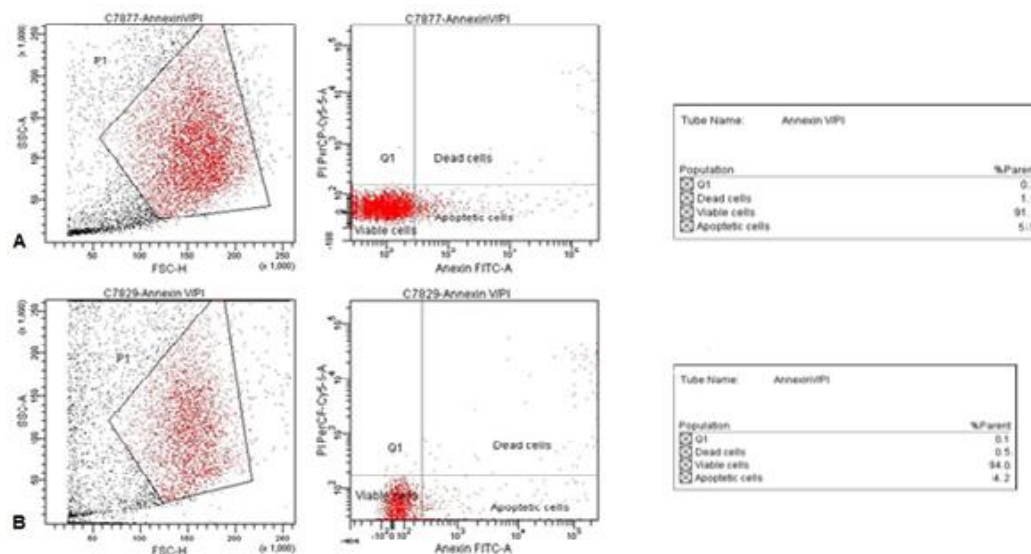
В медицината ХСК се прилагат за лечение на редица заболявания (*Wang and Rivière, 2017*). Това налага използването на подходящ метод за тяхното съхранение. Все още съществуват противоречиви данни относно оптималната скорост на охлаждане при процеса на замразяване на ХСК. Това ни даде основание да изследваме влиянието на различните методи за криоконсервация върху виталитета и колонообразуващата активност на ХСК, изолирани от умбиликална кръв.

Получените резултати показаха, че конвенционалният протокол за криоконсервация води до най-неудовлетворяващи резултати –  $54 \pm 2.4\%$  виталност след размразяване, стойност достоверно по-ниска от контролната проба ( $94 \pm 1.4\%$ ). При програмно замразяване и витрификация (V1, V2) бе наблюдаван висок процент преживяемост, съответно  $90 \pm 1.4\%$ ,  $79.2\% \pm 1.6$  и  $83 \pm 2.1\%$  (Фиг.24). Недостатък на методът витрификация е, че използването му е подходящо само за проби с малки обеми. Поради това е необходимо по-нататъшно изследване на възможностите за криоконсервация чрез тази техника, на по-големи по обем проби.



**Фигура 24:** Виталитет на ХСК след различни методи за криоконсервация: К: контрола; SF: конвенционално замразяване; PF: програмно замразяване; V1 и V2: първи и втори протокол за витрификация. \* статистически достоверна разлика спрямо контролата ( $p < 0.001$ ).

Размразените проби след програмно замразяване бяха изследвани флуцитометрично (Фиг. 25).



**Фигура 25:** Флуцитометричен анализ за определяне виталитета на ХСК: А: контрола; В: след програмно замразяване.

Наблюдаван бе висок процент жизнеспособни клетки – 91.1% (отрицателни за анексин V-FITC и пропидиев йодид). Апоптотични бяха 5.9% от клетките (положителни за анексин V-FITC и негативни за пропидиев йодид) и 1.5% мъртви или в крайна фаза на апоптоза (положителни за анексин V-FITC и пропидиев йодид). В контролната проба бе отчетено 94.0% витални клетки (Фиг.25).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изследванията в областта на стволовите клетки, техните биологични свойства и възможностите за използването им в клиничната практика предизвикват нарастващ интерес през последните години. Независимо от някои преимущества на ембрионалните и индуцираните плурипотентни СК, към момента в медицината приложение при лечение на редица заболявания намират единствено ХСК, като големи надежди се възлагат и на МСК (доказателство за което е големият брой клинични проучвания, течащи в момента). Стокирането им е от изключителна важност както за медицината (създаване на криобанки с материал за трансплантация) и фармакологията (тестване на нови лекарствени препарати), така и за нуждите на научния обмен между лабораториите, съхраняването на ценни клетъчни линии и други.

Към момента в световен мащаб усилията са насочени основно върху разработването на нови методи за получаване, характеризирани на СК, както и върху факторите, повлияващи тяхната диференциация. Криобиологичните изследвания върху човешки СК са ограничени. Недостатъчни са данните относно влиянието на процеса на криоконсервация върху спонтанната и индуцирана диференциация на стволовите клетки. Липсва информация за подробни сравнителни изследвания относно ефективността на различни методи за замразяване. Това ни мотивира да проведем настоящите изследвания.

На първия етап отработихме методи за получаване на стволови клетки от различни източници. Изолираните клетки бяха детайлно характеризирани и достатъчен брой проби бяха стокирани за бъдещи изследвания.

По отношение на използваната от нас адхезивна фракция клетки от мастна тъкан (чМТ-МСК) и фетален черен дроб (чФЧК) (абортен материал)

установихме, че и двата типа клетки съответстват на всички критерии на Международната асоциация по клетъчна терапия за МСК. След провеждане на имунофенотипен анализ бе установено, че чМТ-МСК и чФЧК експресират CD73, CD90, CD105 и са негативни за антигените на хемопоеичната клетъчна линия. Морфологията и растежът им в култура бяха характерни за МСК, като при достигане на плътен монослой формираха характерни класообразни завихряния. Успешно успяхме да диференцираме клетките в остеогенно, адипогенно и невrogenно направление, което е още едно доказателство за стволово-клетъчния им характер.

Хемопоеичните стволови клетки присъстват в ниска концентрация в умбиликалната кръв (около 1%) от всички ядросъдържащи клетки, което не ни позволи да ги изолираме в чист вид и да им направим детайлен морфологичен анализ. За наличието и свойствата им съдехме по експресията на имунофенотипни маркери и способността им за диференциация (възможност да образуват колонии от клетки от кръвния ред). На базата на достатъчно голям брой експерименти бе показано, че средното количество ядросъдържащи клетки след обработка на умбиликалната кръв бе  $33.06 \times 10^9/l$ , като средно 0.6% от тях бяха CD34+. При култивиране на клетките в обогатена с цитокини полутечна среда бе наблюдавано, че формират всички видове колонии, като относително големият процент на GFU-GM и GFU-GEMM свидетелства за високия прогениторен потенциал на клетките. Опитите ни за оптимизиране на условията за култивиране чрез използване на нискодозирани физични въздействия показаха, че в резултат на микровибрациите се ускорява растежът на колониите, но не се повлиява процентното им съотношение.

С цел оптимизиране на методите за криоконсервация сравнихме цитотоксичното действие и криозащитния ефект на някои широко

използвани в практиката криопротектори и техни комбинации. Установено бе, че етиленгликолят и глицеролът са по-слабо токсични от DMSO и за двата вида клетки (ХСК и МСК), но за съжаление не оказаха нужния криопротективен ефект и не са подходящи за криоконсервация на този вид биообекти. Най-добра преживемост бе наблюдавана след програмно замразяване под защитата на ДМСО.

При използваните от нас техники за витрификация също получихме добри резултати, но следва да се отбележи, че малкият обем на витрифицираните проби не позволява широкото използване на метода в практиката. Като цяло, на базата на получените от нас данни може да се направи заключението, че стволовите клетки се отличават с добра криотолерантност и при използване на щадящи режими на охлаждане могат успешно да бъдат замразени и съхранени. Процесът на криоконсервация не влияе върху експресията на специфични за СК маркери, както и върху потенциала им за спонтанна и индуцирана диференциация.

Надяваме се, че проведените от нас изследвания и получени резултати ще допринесат за задълбочаване на проучванията в тази област и по-пълното разкриване на влиянието на процеса на криоконсервация върху характеристиките и свойствата на различните видове стволови клетки.

## ИЗВОДИ

1. Адхезивната фракция клетки, изолирани от фетален черен дроб и от мастна тъкан, притежават морфологични белези, експресират имунофенотипни маркери характерни за мезенхимните стволови клетки, и могат успешно да бъдат диференцирани в остеогенно, адипогенно и невrogenно направление.
2. Фетални чернодробни клетки биха могли да бъдат използвани като фидерен слой при култивиране на чЕСК.
3. ХСК, изолирани от умбиликална кръв, се отличават с добра колоноформираща активност, като при култивиране *ин-витро* образуват следните типове колонии - CFU-E, BFU-E, CFU-G, CFU-M, CFU-GM и CFU-GEMM.
4. Култивирането на ХСК в условия на микровибрации не влияе върху процентното съотношение на различните типове колонии, но ускорява растежа им.
5. Етиленгликолът оказва по-слаб токсичен ефект върху МСК и ХСК в сравнение с глицерол и ДМСО.
6. ДМСО оказва по-добър криозащитен ефект при МСК и ХСК в сравнение с етиленгликол и глицерол.
7. МСК и ХСК се отличават с добра криотолерантност. Сравнителните изследвания върху методите за криоконсервация показват, че програмното замразяване е по-ефективен метод за консервация на този вид биообекти.
8. Витрификацията е ефективен метод за криоконсервация на стволови клетки, но са необходими допълнителни изследвания преди внедряването му в клиничната практика.

9. Процесът на криоконсервация не влияе върху морфологичните, имунофенотипните и функционалните показатели на мезенхимните и хематопоетичните стволовите клетки;

### **ПРИНОСИ:**

1. За първи път са проведени комплексни криобиологични изследвания върху човешки ХСК и МСК. Изследвани са токсичността и криозащитният ефект на използвани в практиката проникващи и непроникващи криопротектори и техни комбинации.
2. Показано е, че процесът на криоконсервация не влияе върху имунофенотипните показатели и способността за диференциация на МСК.
3. Предложен е метод за култивиране на ХСК в условията на микровибрации.



## Публикации свързани с темата на дисертационния труд:

1. **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 (special edition/online)*, 2017, p.5-10.
2. Petrova N, Hristova E, **Hristova M**, Dimitrov J, Todorov P. Differentiation of stem cells, isolated from follicular fluid. *Aging, Health, Geriatric care*, 2017, pp.567-571.
3. **Hristova M**, Hristova E, Petrova N, Todorov P. Comparative studies of cryopreservation methods for human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Aging, Health, Geriatric care*, 2017, in press.
4. **Hristova M**, Todorov P, Petrova N, Gulenova D, Hristova E. Clonogenic activity of human haematopoietic stem cells cultured under micro-vibrations. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 2017, in press, IF=0,251
5. 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'Academie bulgare des Sciences*, 2017, in press, IF=0,251

## Научни форуми:

1. **Hristova M**, Hristova E, Todorov P. Osteogenic, adipogenic and neurogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells before and after cryopreservation. *World BioDiscovery Congress, Sofia, 17-19.07, 2017*.
2. **Hristova M**, Hristova E, Petrova N, Todorov P. Comparative studies of cryopreservation methods for human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Aging, Health, Geriatric care, Stara Zagora, 18-19.05, 2017*.
3. Petrova N, E. Hristova, **M. Hristova**, J. Dimitrov, P. Todorov. Differentiation of stem cells, isolated from follicular fluid. *Aging, Health, Geriatric care, Stara Zagora, 18-19.05, 2017*.

4. **Hristova M**, Petrova N, Hristova E, Todorov P. Cytotoxic and cryopreservation effect of different cryoprotectants on human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *National PhD Conference on Biology, Plovdiv, 01.11,2016.*
5. **Hristova M**, Petrova N, Hristova E, Nikolova M, Dimitrov J, Todorov P. Immunophenotypic analysis of nuclear cells from umbilical cord blood. *XVII National Congress of Infertility and Reproductive Health, Borovec, 10-13.03,2016.*
6. **Hristova M**, Hristova E, Petrova N, Todorov P. Effect of different cryopreservation methods on hematopoietic stem cells. *XIV International Symposium for Immunology of Reproduction, Varna, 22-24.05, 2015.*