



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”

Биологически факултет
катедра “Цитология, хистология и ембриология”

Борислав Емилов Арабаджиев

**Изолиране и характеризиране на линии от
човешки ембрионални стволови клетки**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертация за присъждане на научна и образователна степен
„доктор”**

професионално направление 4.3. Биологически науки,
научна специалност 01.06.18 Клетъчна биология

**София,
2016 г.**

Дисертационния труд съдържа 113 страници, 11 схеми, 1 таблица и 45 фигури.
Цитирани са 229 литературни източника.

Докторантът е зачислен в редовна докторантура към катедра „Цитология, хистология и ембриология” при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски.

Част от изследванията в дисертационния труд са извършени с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“ по договор финансиран по проект.

Научно жури:

Вътрешни членове:

Чл. кор. проф. дбн Румен Панков

Проф. дбн Росица Конакчиева

Външни членове:

Проф. дмн Елисавета Наумова

Доц. д-р Милена Мурджева

Доц. д-р Пламен Тодоров

Защитата на дисертационния труд ще се състои на
от часа в зала на Биологически факултет при Софийски университет
„Св. Климент Охридски“ на открито заседание.

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”

Биологически факултет
катедра “Цитология, хистология и ембриология”

Борислав Емилов Арабаджиев

**Изолиране и характеризиране на линии от
човешки ембрионални стволови клетки**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертация за присъждане на научна и образователна степен
„доктор”**

професионално направление 4.3. Биологически науки,
научна специалност 01.06.18 Клетъчна биология

Научен ръководител: чл. кор. проф. Румен Панков дбн

**София,
2016 г.**

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AP	alkaline phosphatase
AT	Acid Tyrode
BMP4	bone morphogenetic protein 4
BSA	bovine serum albumin
DMSO	dimethyl sulfoxide
EGF	epidermal growth factor
FBS	fetal bovine serum
FGF2	fibroblast growth factor 2
FGF4	fibroblast growth factor 4
FGF7	fibroblast growth factor 7
HLA	human leukocyte antigen
IGF-1	insulin-like growth factor-1
LIF	leukemia inhibitory factor
MEFs	mouse embryonic fibroblasts
MHC	major histocompatibility complex
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
RA	retinoic acid
Rho	Ras homolog gene family members
ROCK	Rho-associated protein kinase
SCF	stem cell factor
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
SSEA-1	stage specific embryonic antigen-1
SSEA-3	stage specific embryonic antigen-3
SSEA-4	stage specific embryonic antigen 4
TGFβ	transforming growth factor beta
TRA-1-60	tumor rejection antigen-1-60
TRA-1-81	tumor rejection antigen-1-81
ZP	zona pellucida
ВКМ	вътрешна клетъчна маса
Е	ембрионален ден
ЕС	ембрионални стволови
ЕТ	ембрионидни тела
МКА	моноклонални антитела
ПГК	примордиални герминативни клетки
ТЕ	трофоектодерма

ВЪВЕДЕНИЕ

Човешките ембрионални стволови (ЕС) клетки най-често се изолират от вътрешната клетъчна маса (ВКМ) на ранни ембриони в стадий бластоцист. Те са плурипотентни самообновяващи се клетки, които при подходящи условия са способни да се диференцират към всички производни на трите ембрионални зародишни пласта (ектодерма, мезодерм и ендодерма), както и към производни на герминативната линия. Потенциалът им за неограничена пролиферация *in vitro* и способността им да се диференцират във всички клетъчни типове, изграждащи човешкия организъм, правят тези клетки изключително ценни, както за целите на регенеративната медицина и клетъчната терапия, така и като експериментални моделни системи за изследвания в областта на биологията на развитието, клетъчната диференциация, трансдиференциацията и др. Вече са натрупани достатъчно данни, показващи способността на човешките ЕС клетки да се диференцират до неврони, кардиомиоцити, панкреатични клетки и още ред други представители на диференцираните клетъчни типове. Тези резултати засилват очакванията за скорошно разработване на терапии за лечение на нелечими засега заболявания, като болестта на Паркинсон, болестта на Алцхаймер, диабет тип I, инфаркт на миокарда и др. Задълбочените изследвания на множеството изолирани вече линии от човешки ЕС клетки обаче, демонстрират и съществени различия в диференциационния им потенциал, независимо от сходните им характеристики в недиференцирано състояние. Тези данни са основа и на налагащото се схващане, че различията в техниките на изолиране и култивиране на линиите от човешки ЕС клетки, както и присъщите генетични вариации, определят съществуващите разлики в наличните вече линии от човешки ЕС клетки. Този факт налага апробирането на различни техники за изолиране и поддържане на човешки ЕС клетки, както и подбор на стандартизирани протоколи, които да обезпечат условия за максимално съхранение на плурипотентността им. Едновременно с това е необходимо и създаване на достатъчно нови и качествени линии от човешки ЕС клетки, които да „попълнят“ диференциационния потенциал на съществуващите и по такъв начин да обезпечат успешното развитие и приложение на бъдещите клетъчни терапии и регенеративната медицина.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Общо, проучването на натрупаните в литературата данни показва, че всяка от създадените досега линии от човешки ЕС клетки има специфични особености, независимо от факта, че всички те притежават основните общи характеристики, определящи ги като стволови и плурипотентни. Тези специфични особености определят и възможностите за използване на всяка от линиите за определени научни и/или практически цели. Наличието на такава специфичност показва, че пълното използване на възможностите, които предоставят стволовите клетки може да бъде постигнато само ако бъдат създадени достатъчно голям брой такива линии. Това определи и целта на настоящия дисертационен труд, а именно:

Да създадем български линии от човешки ембрионални стволови клетки и да проучим възможностите им за диференциация.

За реализиране на поставената цел беше необходимо изпълнението на следните експериментални задачи:

1. Да се изолират клетките от вътрешната клетъчна маса на човешки ембриони, като се апробират методите на имунохирургия и механично изолиране.
2. Да се установят линии от човешки ембрионални стволови клетки, като се приложат методите на механично и ензимно пасажиране и отглеждане върху подхранващ слой от фибробласти.
3. Да се подбере подходящ протокол за криопрезервация на изолираните линии от човешки ембрионални стволови клетки.
4. Да се характеризира плурипотентността на клетките от изолираните линии от човешки ЕС клетки, чрез изследване експресията на основни маркери за плурипотентност.
5. Да се проучи възможността на изолираните човешки ЕС клетки за диференциация до производни на ектодермата.
6. Да се установи способността на изолираните човешки ЕС клетки за диференциация до производни на мезодермата.
7. Да се изследва възможността на изолираните човешки ЕС клетки за диференциация до герминативни клетки.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За изпълнение на поставените в дисертационния труд цел и задачи бяха използвани следните методи:

1. Изолиране и култивиране на клетки от вътрешната клетъчна маса
2. Конвенционално клетъчно култивиране
3. Кондициониране на среда за клетъчно култивиране
4. Коатиране на плаки за отглеждане на клетки
5. Пасажирене на човешки ембрионални стволови клетки
6. Формиране на ембрионидни тела от човешки ембрионални стволови клетки
7. Криопрезервация на човешки ембрионални стволови клетки
8. Хистохимичен анализ
9. Имунофлуоресцентен анализ
10. Полиакриламидна гел електрофореза и имуноблотинг
11. PCR анализ
12. Цитогенетичен анализ
13. Проточна цитометрия
14. Насочена диференциация на човешки ембрионални стволови клетки към невроектодерма и неврони
15. Насочена диференциация на човешки ембрионални стволови клетки към мезодерма и кардиомиоцити
16. Насочена диференциация на човешки ембрионални стволови клетки към примордиални герминативни клетки

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Набавяне и оценка на остатъчни ембриони получени при процедури по асистирана репродукция *in vitro*

Етика

За получаването на линии от човешки ЕС клетки с български произход беше необходимо намирането на донори (семейни двойки), които доброволно да предоставят остатъчните (некачествени/неподходящи) ембриони, получени в процеса на асистирана репродукция *in vitro*, която тези двойки предварително и по медицински показания са избрали да преминат. За привличането на такива донори, беше разработен специален формуляр, разясняващ целите на настоящата работа, както и правата, ползите и рисковете от подобно даровство.

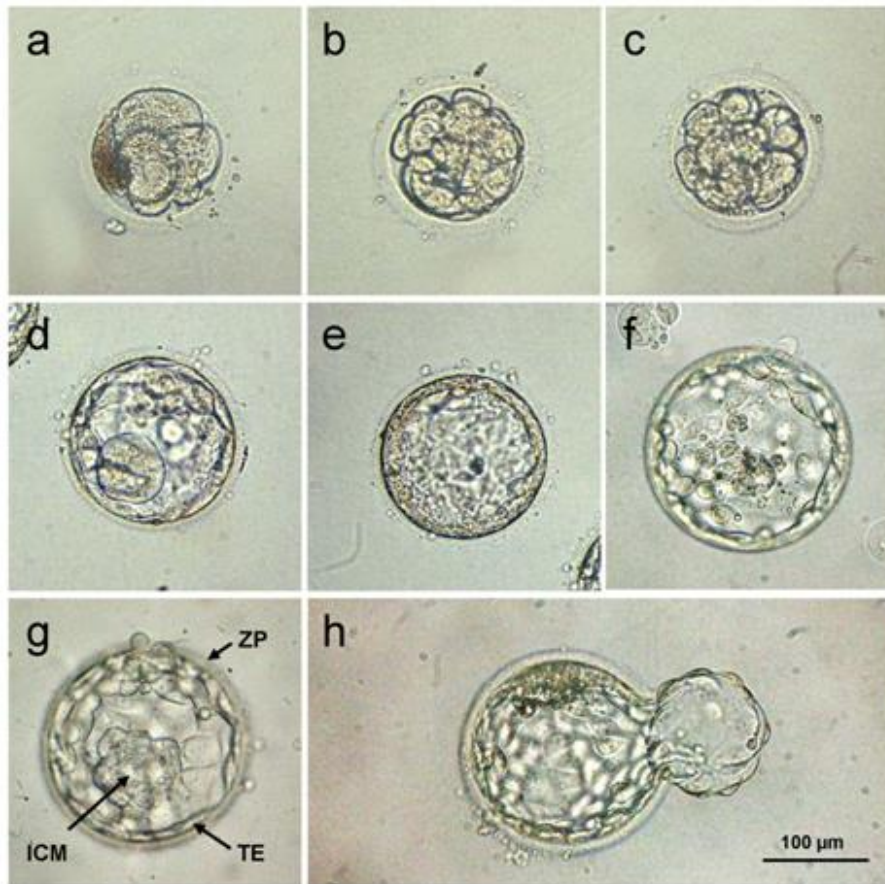
Набирането на донори и предоставянето на дарените излишни ембриони беше извършвано от колектива на Центъра за репродуктивно здраве „Надежда” към Клиника „Малинов”. Бяха получени осем съгласия за даровство. Спазвайки правилата за конфиденциалност, информираните съгласия се съхраняват в документацията на Центъра за репродуктивно здраве „Надежда”.

Процесиране и оценка на получените остатъчни ембриони

За целите на настоящата работа бяха предоставени общо 24 ембриона, намиращи се на различни стадии на развитие. След получаването, ембрионите бяха инкубирани за минимум едно денонощие, с цел извършване оценка на качеството им и способността им за развитие. Ембрионите с добро качество, отглеждани в *in vitro* условия се характеризират с еднакви по размер бластомери, липса на фрагментация, не показват забавено дробене и не спират развитието си. Категоризацията на предоставените ембриони беше извършена по морфологични признаци и в зависимост от отклоненията, които показваха от описаното нормално развитие, бяха разделени на няколко групи.

Първата група включваше 6 ембриона, които спряха своето развитие на стадий морула, или по-ранен и в продължение на едно денонощие не показаха склонност към по-нататъшно развитие. Примери за такива ембриони са представени на (Фиг.1 а, b и c). Втората група включваше 10 ембриона, които достигнаха стадий бластоцист, но имаха забавено развитие (Фиг.1 d и e), а третата група се състоеше от осем ембриона на стадий късен бластоцист (Фиг. 1 f и g), два от които показаха признаци на „излюпване” (Фиг.1 h). Повечето ембриони бяха с ниско качество – съдържаха фрагментирани, или различни

по големина бластомери (Фиг.1 а), не добре оформена вътрешна клетъчна маса (Фиг.1 е), или спираха своето развитие на различен стадий.



Фигура 1. Човешки ембриони на различни стадии на развитие, използвани за изолиране на човешки ембрионални стволови клетки. а) бластомери, b) и c) морула, d) и e) ранен бластоцист, f) и g) късен бластоцист и h) излюпващ се бластоцист. Основните компоненти на нормален късен бластоцист са означени на g) ZP- *zona pellucida*, ICM - inner cell mass (вътрешна клетъчна маса), TE – trophoblast (трофобласт).

От литературата е известно, че няма корелация между качеството на ембрионите и успеваемостта при изолиране на линии от човешки ЕС клетки от тях. Много изследвания показват, че човешки ЕС клетки могат да бъдат изолирани и от ембриони с ниско качество, каквито са остатъчните ембриони, получени при процедури за асистирана репродукция. По тези причини ние използвахме всичките 24 получени ембриони за експерименти по изолиране на линии от човешки ЕС клетки. От всички получени ембриони създадохме три линии от човешки ЕС клетки - BAM1, BAVE1 и BAVE2.

2. Изолиране на вътрешна клетъчна маса и култивиране върху подхранващ слой от фибробласти.

Класическата процедура по създаване на линии от човешки ЕС клетки, описана от Thomson et al., се състои в изолиране на ВКМ от 5-6 дневен бластоцист като първо се отстранява ZP, а после се премахва и трофоектодермата. В случаите, когато линии от ЕС клетки се изолират от ембриони на стадий морула, или по-ранен, се извършва само премахване на ZP, тъй като ТЕ все още не се е диференцирала.

В проведените експерименти по изолиране на ЕС клетки ние премахвахме ZP посредством третиране с кисел разтвор на Tugode. Това е широко използван метод, който обаче изисква контрол, тъй като продължителната обработка може да увреди ембриона. Нашият опит показва, че най-подходящо третиране, при което се получава премахване на ZP, и едновременно с това останалата част от ембриона остава незасегната е със свеж разтвор на Tugode за 20 секунди на 36°C.

В случаите, в които използвахме ембриони на стадий морула след премахване на ZP те бяха култивирани върху подхранващ слой от митотично инактивирани миши фибробласти в среда за ембрионални стволови клетки (виж раздел материали и методи).

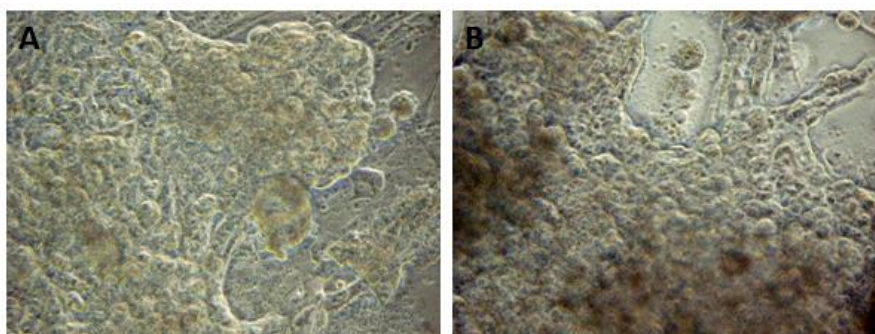
Тъй като в ембрионите на стадий бластоцист, бластомерите са преминали първия етап на диференциация и са формирали два клетъчни типа - ТЕ и ВКМ, е необходимо след премахването на ZP да бъде отстранена и ТЕ, за да бъде изолирана ВКМ, която при по-нататъшно култивиране може да се развие в линия от човешки ЕС клетки. Отделянето на ВКМ от ТЕ може да бъде извършено чрез т. нар. имунохирургия (с антитела срещу човешки серум или еритроцити и последващ комплемент-медиран лизис на трофобластите), или механично с помощта на източени стъклени микропипети. В нашите експерименти по изолиране на ВКМ от бластоцисти, ние прилагаме предимно имунохирургията (при 15 бластоциста от общо 18) като един от тях даде началото на линията VABE1. Механичното изолиране на ВКМ, който е предпочитан метод при създаване на хепо-free линии от човешки ЕС клетки, тъй като избягва обработката с антитела от други животински видове, ние приложихме при три от бластоцистите, като един от тях даде началото на линията VABE2.

Изолираните ВКМ бяха култивирани върху подхранващ слой от митотично инактивирани миши фибробласти в среда за ЕС клетки. Този подхранващ слой е необходим, за да осигури растежни фактори, които да позволят на клетките от ВКМ (или бластомерите, в случаите в които се използват ембриони на стадий морула), да се адаптират за растеж в условия *in-vitro* и да дадат началото на линии от ЕС клетки.

Разнообразието от подхранващи клетки, подходящи за култивиране на човешки ЕС клетки е голямо. Такива са мишите ембрионални фибробласти, мишите STO фибробласти, както и човешки клетки, напр. човешки ембрионални фибробласти, фибробласти от човешки препуциум, както и диференцирани от човешки ЕС клетки фибробластоподобни клетки и др. В нашите експерименти използвахме STO линия от миши фибробласти, закупени от ATCC, тъй като са трайна клетъчна линия и не налагат подновяването на културите, какъвто е случаят с ембрионалните миши фибробласти. За да се блокира пролиферацията на клетките от подхранващия слой, STO фибробластите бяха предварително митотично инактивирани. Проведените експерименти показаха, че подхранващия слой е най-ефективен, когато гъстотата му е 80%-90% конфлуентност, а средата за ЕС клетки е оставена за кондициониране с подхранващия слой за 24 часа.

3. Установяване и пасажирание на линии от човешки ембрионални стволови клетки.

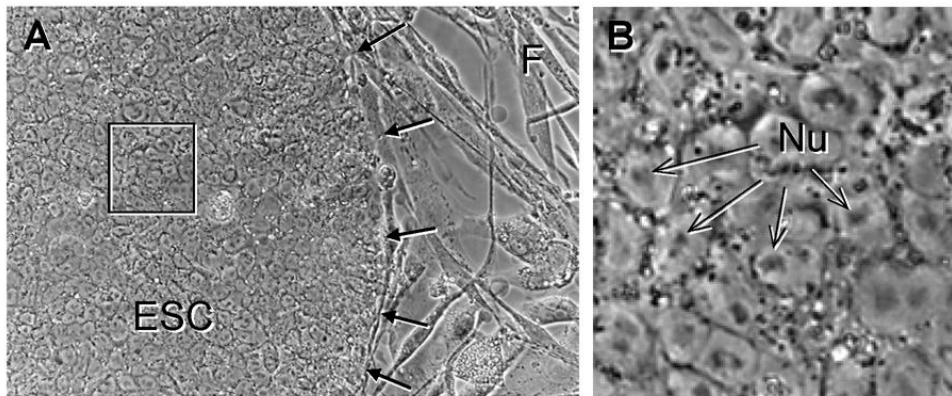
След засяването на морулите (предварително освободени от ZP), или изолираните ВКМ (когато източникът е бластоцист), те бяха оставяни в покой за 72 часа. Този период е необходим за адхезията на клетките върху съда за култивиране и адаптиране към условията *in vitro*. От обработените шест морули към съдовете адхезираха 3, а от изолираните 18 ВКМ – 10. Адхезираните клетки бяха култивирани в продължение на повече от две седмици. Примери за морфологията на културите през този период е показана на (Фиг. 2). Културите бяха внимателно наблюдавани за поява и растеж на клетки с типична за човешките ЕС клетки морфология.



Фигура 2. Примерни изображения, показващи общата морфология на 10 дневни пролифериращи първични култури получени от посяването на морула (А) и изолирана ВКМ (В) върху инактивирани STO фибробласти.

В три от случаите (един произхождащ от морула и два – произхождащи от ембриони на стадии късен бластоцист) в нарастващите адхезивни култури бяха наблюдавани групи от клетки, които нарастваха бързо и имаха специфична морфология. Клетките формирани тези групи имаха типичният за ЕС клетки изглед – високо

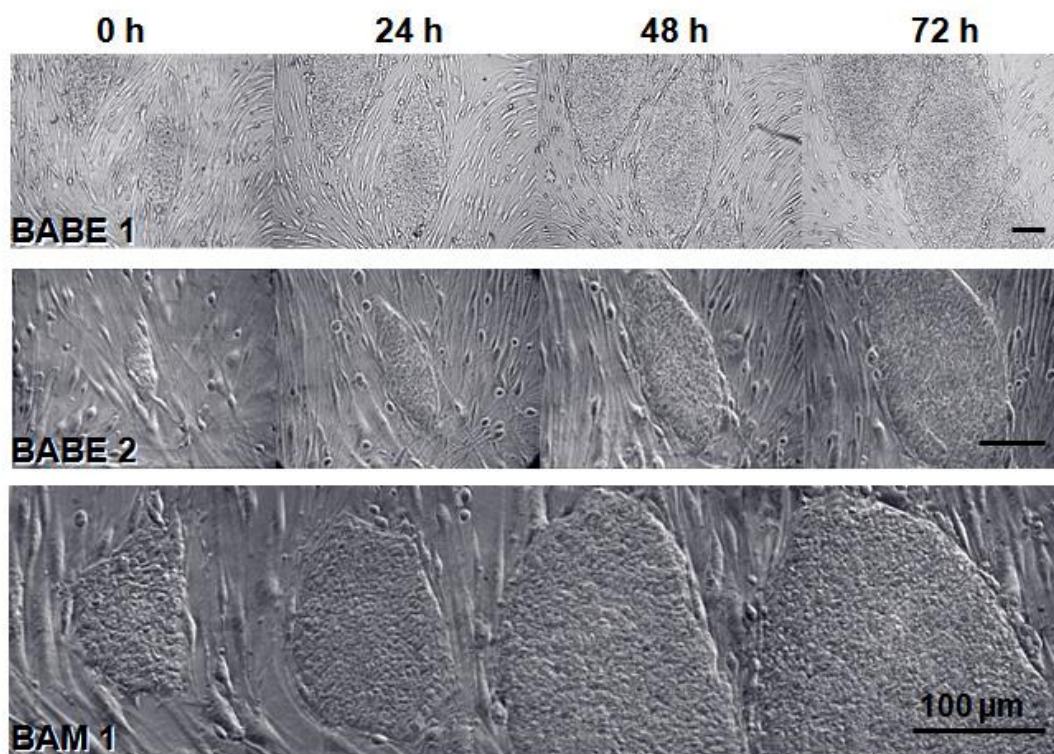
ядрено/цитоплазмено съотношение, добре видими ядръца и образуваха компактни колонии с ясно изразени, гладки граници (Фиг. 3). От тях, чрез последващо механично пасажирание, бяха установени линии от човешки ЕС клетки. Линията произхождаща от ембрион на стадий морула беше означена като ВАМ1, а линиите от ембриони на стадий късен бластоцист – съответно ВАВЕ1 и ВАВЕ2, като първата от тях беше получена чрез имунохирургия, а втората – чрез механично отделяне на ВКМ.



Фигура 3. Фазовоконтрастни образи на клетки от линия ВАВЕ1, показващи типичната морфология на ЕС клетки. Стрелките на панел А показват ясно очертаните граници на колонията от ЕС клетки (ESC), (F) – подхранващ слой от миши фибробласти. Част от образа от панел А (правоъгълник) е показан на по-високо увеличение на панел В, където ясно личат добре изразените ядръца (Nu) на стволовите клетки.

Така изолираните колонии от човешки ЕС клетки удвояваха своя размер за около 24 часа (Фиг. 4), което налагаше пасажирането им на всеки 4-6 дни. Бързата пролиферация на изолираните в нашата лаборатория нови линии от човешки ЕС клетки беше добра индикация, тъй като от литературата е известно, че това е една от характеристиките на ЕС клетки поради силно скъсения G1 период от клетъчния цикъл. Пасажирането на човешките ЕС клетки може да бъде извършено чрез ензимно третиране, за дисоцииране на компактните колонии до групи от по няколко десетки клетки или чрез механично разрязване с помощта на стъклени микропипети.

Тъй като в литературата има данни, че при ензимното пасажирание вероятността от възникване на хромозомни аномалии нараства, ние избрахме микродисекцията като основен метод за пасажирание.



Фигура 4. Серийни фазово-контрастни снимки на едни и същи колонии от изолираните линии от човешки ЕС клетки, заснети през 24 часови интервали.

Както беше отбелязано по-горе, в първите етапи до появяване на морфологично отличими колонии от човешки ЕС клетки, културите бяха отглеждани в среда, съдържаща 17% KO-Serum Replacement и 3% ES cell-tested fetal bovine serum (FBS). Прибавянето на малки количества FBS в тези начални етапи подпомага адхезията и повишава преживяемостта след отделяне на ВКМ от ембриона. От друга страна е известно, че серумът съдържа фактори, които стимулират диференциацията на човешките ЕС клетки. За да избегнем този нежелан ефект, при всяко пасажирание след първия пасаж концентрациите на FBS в средата за култивиране бяха намалявани съответно до 2%, 1% и 0%, като едновременно с това увеличавахме количествата на серумния заместител от 17% до 20%. След четвъртия пасаж, линиите от човешки ЕС клетки бяха отглеждани изцяло в безсерумна среда. През този период, част от клетките бяха отделени за криопрезервация за дългосрочно съхранение.

4. Криопрезервация на човешки ембрионални стволови клетки

Човешките ЕС клетки са много чувствителни към условията и методите на криопрезервация, което вероятно се дължи на факта, че те произхождат от ВКМ на ранни човешки бластоцисти, които също имат нужда от специални условия и техники на

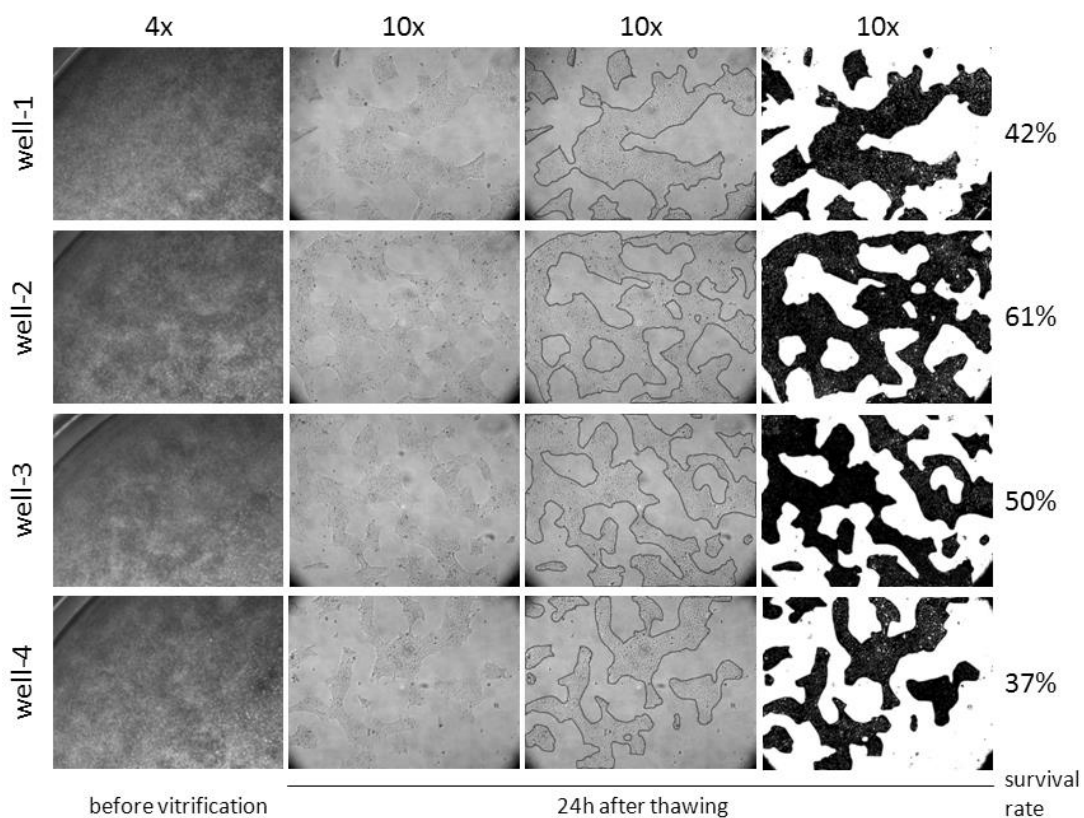
криопрезервация и размразяване. Стандартните методи за криопрезервация на човешки ЕС клетки, като бавното замразяване (температурата се понижава с $\sim 1\text{C}/\text{мин.}$) в суспензия, в повечето случаи имат слаба преживяемост при размразяване, варираща между 5% и 25%. При този метод често се наблюдават и по-високи нива на спонтанна диференциация в културите от човешки ЕС клетки след размразяване.

Въпреки тези недостатъци ние избрахме този метод на криопрезервация за най-ранните пасажи на изолираните от нас нови линии от човешки ЕС клетки, тъй като това е най-широко използваният класически метод за замразяване на клетки, а и в сравнение с други методи, имахме най-голям опит в прилагането му. При създаването и на трите линии от човешки ЕС клетки (BAM1, BAVE1, BAVE2), в интервала 5ти-8ми пасаж бяха отделени проби за криопрезервация, като използвахме стандартен протокол за бавно замразяване в суспензия в среда mFreSR (Stemcell technologies).

Впоследствие, след като вече бяхме подсилили наличието на замразени проби от тези ранни пасажи, ние се насочихме към търсене на алтернативни методи за криопрезервация, позволяващи по-добра преживяемост, по-ниски нива на спонтанна диференциация след размразяване, както и възможност за замразяване на по-големи количества клетки. Такъв метод за криопрезервация е *in situ* витрификацията на човешки ЕС клетки, описан от Baier et al. Този метод представлява витрификация на адхезирани колонии от човешки ЕС клетки директно в съдовете за култивиране и в много малък обем среда за замразяване, образуваща филм върху клетките. Минималния обем среда за замразяване е много важен, тъй като дава най-голямо отношение повърхност/обем, което е решаващо при замразяването чрез витрификация. За разлика от оригиналния протокол, при който се използват специални съдове за култивиране със стъклено дъно с дебелина 0.1mm и човешките ЕС клетки се отглеждат върху подхранващ слой от миши ембрионални фибробласти, ние адаптирахме и модифицирахме този метод. В разработения от нас протокол, използвахме стандартни 4-ямкови плаки, коатирани с човешки рекомбинантен Laminin-521 (BioLamina). Това създаде поне две предимства: Първо, не се налагаше закупуването и използването на специални съдове за клетъчно култивиране. Второ, култивирането на човешките ЕС клетки върху човешки рекомбинантен Laminin-521 създаде възможност за лесно адаптиране на метода към хепо-free условия на замразяване, чрез замяна на използваната от нас среда mTeSR1 с нейния хепо-free вариант mTeSR2.

При проведените експерименти по замразяване на човешки ЕС клетки по модифицирания от нас протокол за *in situ* витрификация беше отчетена преживяемост на

клетките средно 47.5%, оценена по площта на оцелелите клетки 24 часа след размразяване (Фиг. 5). Ние не успяхме да постигнем преживяемост от 99% ($\pm 1\%$), каквато са получили Veier et al. Това вероятно се дължи, както на ~ 10 пъти по-дебелото дъно на 4-ялковите плаки, над 1mm в сравнение с 0.1mm в оригиналния протокол на Veiere et al., така и на разликата в коефициента на топлопроводимост на стъклото ($1.15 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$) и този на полистирена ($0.033 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$). По-голямата дебелина на подложката, върху която се намираха клетките, както и ~ 35 пъти по ниския коефициент на топлопроводимост на материала, от който са изработени 4-ялковите плаки в сравнение със стъклото, доведе до по-бавното понижаване на температурата при контакта с течения азот. Това може да доведе до непълна витрификация и формиране на кристали, което е една от основните причини за клетъчна смърт при процедурите за замразяване. Важно е да се отбележи обаче, че постигнатата от нас преживяемост на клетките е 3-5 пъти по голяма от тази, постигната чрез класическото бавно замразяване.



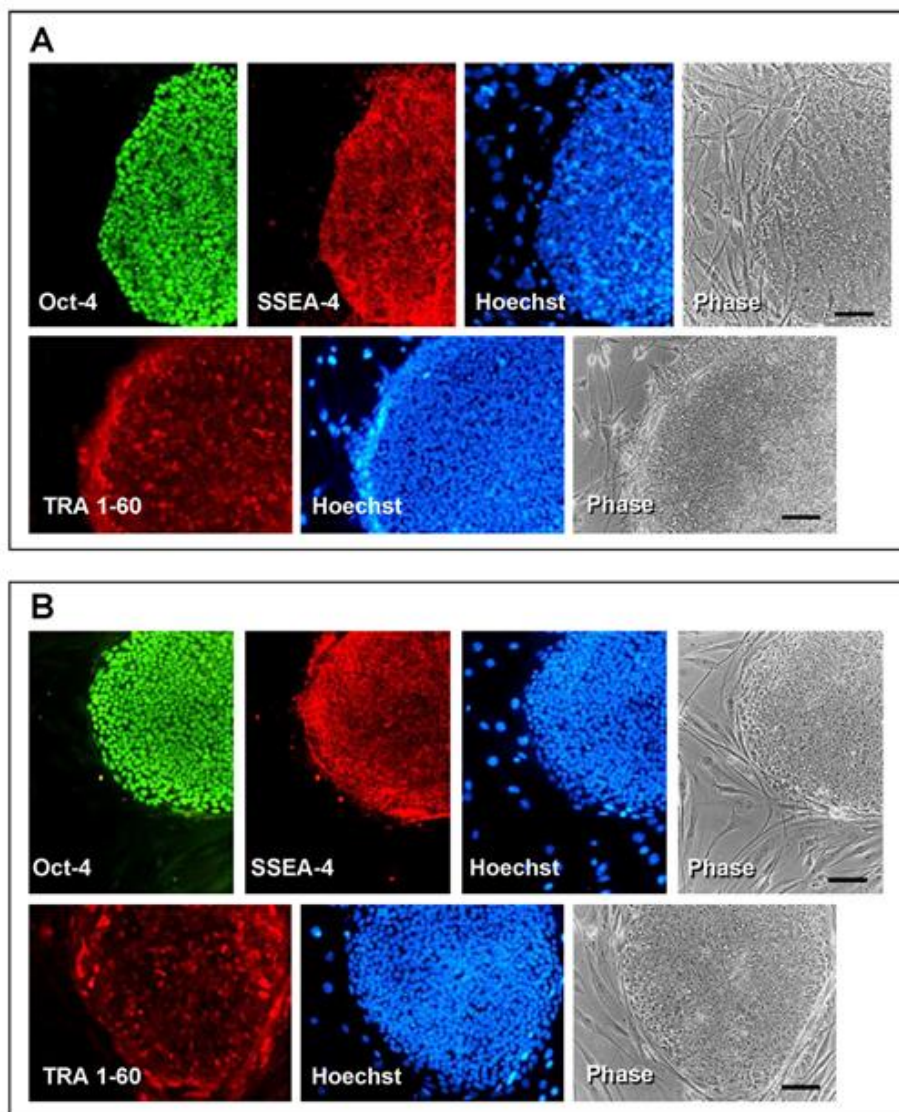
Фигура 5. Преживяемост на човешки ЕС клетки от линия VABE1, замразени чрез модифицирания от нас протокол за *in situ* витрификация върху човешки рекомбинантен Laminin-521, 24 часа след размразяване. Оценката е направена чрез измерване на площта на оцелелите клетки и сравнение с изходната им площ преди замразяване. Изходната площ е приета за 100%. Изображенията са обработени с Image J, като площта е изчислена по брой пиксели.

От голямо значение е и фактът, че времето за възстановяване на клетките след размразяване и достигане на изходната конfluентност (преди замразяване) беше само 72 часа, което при метода на бавно замразяване в нашите експерименти отнемаше 7-12 дни. Трябва да се отбележи още, че при проведените експерименти по *in situ* витрификация на човешки ЕС клетки по модифицирания от нас протокол, не наблюдавахме нито един инцидент на спонтанна диференциация на ЕС клетки след размразяване. Тези резултати ни дадоха основание да използваме модифицирания от нас вариант на протокола за *in situ* витрификация за криопрезервация на изолираните нови линии от човешки ЕС клетки.

5. Изследване на изолираните нови линии от човешки ембрионални стволови клетки за експресия на специфични маркери за плурипотентност.

5.1. Имунофлуоресцентен анализ

Човешките ЕС клетки се характеризират с набор от специфични маркери, определящи тяхната плурипотентност. Основен и възприет като задължителен маркер е експресията на транскрипционния фактор Oct-4. Този фактор е член на POU фамилията и е един от факторите отговорни за поддържането на ембрионалните стволови клетки в недиференцирано състояние. Експресията на Oct-4 в изолираните клетъчни линии беше изследвана чрез имунофлуоресценция. Позитивна реакция беше регистрирана само в ядрата на стволовите клетки, докато ядрата на STO клетките от подхранващия слой (идентифицирани чрез оцветяване на ДНК с Hoechst) бяха негативни (Фиг. 6 А и В). , което потвърждава специфичността на имунологичната реакция. Наличието само на експресия на Oct-4 не е достатъчен критерий за оценка на стволовостта, тъй като минава известен период от време, докато експресията на този транскрипционен фактор в диференциращите се човешки ЕС клетки се потисне напълно и поради това той може да бъде открит и в други клетъчни популации, които са навлезли в процес на диференциация - например ембрионални герминативни клетки, както и в някои фетални и възрастни стволови клетки. По тази причина, ние проучихме експресията и на други, характерни за ембрионалните стволови клетки молекулни маркери. Типични и широко използвани при характеризирането на тези клетки са два повърхностно клетъчни маркери - TRA-1-60 (tumor rejection antigen 1-60) и SSEA-4 (stage specific embryonic antigen 4). Имунофлуоресцентния анализ потвърди тяхната експресия по повърхността



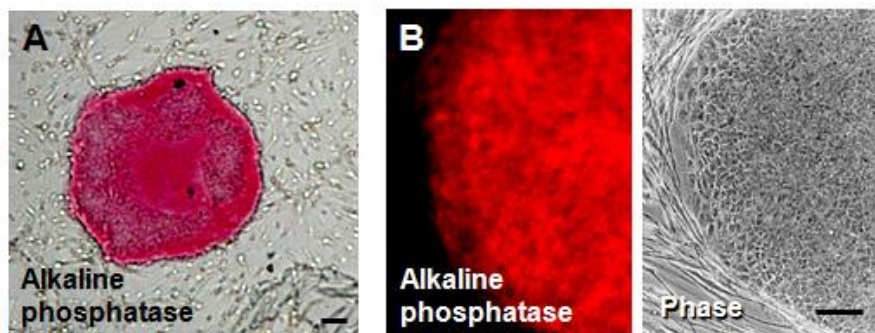
Фигура 6. Анализ на експресията на маркери за плурипотентност в клетки от линията VAM1 (A) и VABE1 (B). Имунофлуоресцентни образи получени след обработка с антитела срещу Oct-4, SSEA-4 и TRA 1-60. Оцветяването на ДНК с Hoechst (синьо на панели A и B) и фазовоконтрастните образи бяха използвани за определяне позицията на клетъчните ядра и общата морфология на клетките. Калибровъчната линия е с размер 50 μm .

на колониите от човешки ЕС клетки и както в случая с експресията на Oct-4, не се експресираха от подхранващите STO клетки (Фиг. 6 A и B). Експресията на Oct-4 и SSEA-4 беше потвърдена чрез имунофлуоресцентен анализ и в човешките ЕС клетки от линия VABE2.

5.2. Ензимен анализ

Друг широко използван маркер за охарактеризиране на човешките ЕС клетки е активността на експресираната от тях алкална фосфатаза. Това е ензим, който премахва

фосфатните групи от 5' края на ДНК и РНК, както и от различни белтъци при високо рН. За изследване на активността му в линиите от човешки ЕС клетки, които изолирахме, ние използвахме SIGMAFAST™ Fast Red TR/Naphthol AS-MX реагент (Sigma), с който инкубирахме фиксирани и непермеабилни препарати. В резултат от позитивната реакция се формираше малиново-червен, неразтворим продукт, който може да бъде наблюдаван под обикновен светлинен микроскоп. Поради това, че този продукт има и червена автофлуоресценция, позитивните колонии могат да бъдат регистрирани и при наблюдение под флуоресцентен микроскоп. Във всички изследвани



Фигура 7. Реакция за установяване активността на алкалната фосфатаза по повърхността на колонии от линиите VAM1 (A) и VABE1 (B). Образът на панел A е получен със светлинна, а на панел B - с флуоресцентна микроскопия. Фазовоконтрастният образ на панел B, съответства на флуоресцентния образ от същия панел. Калибровъчната линия е с размер 50 μm .

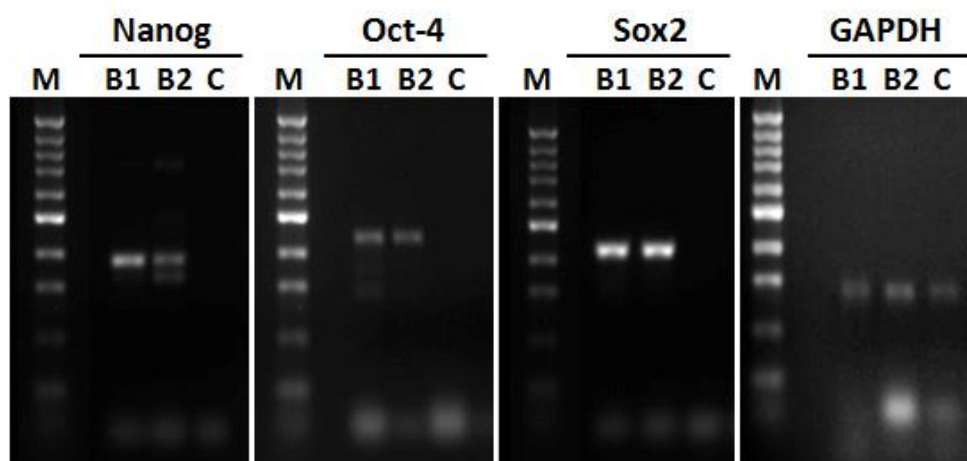
препарати установихме интензивна реакция, която беше локализирана само върху колонии от човешки ЕС клетки (Фиг. 7).

Известно е, че процесът на криопрезервация и последващото размразяване е стресиращ за стволовите клетки, като този стрес освен включване на механизмите на програмираната клетъчна смърт, може да доведе до стимулиране процесите на спонтанна диференциация и загуба на маркерите за плюрипотентност. За да проверим стабилността на изолираните от нас линии към криопрезервация, ние отново изследвахме експресията на описаните по-горе маркери в стволовите клетки след един цикъл на замразяване. Резултатите от тези експерименти демонстрираха високи нива на експресия и коректна клетъчна локализация на основните маркери за плюрипотентност Oct-4, SSEA-4 и TRA 1-60. Това показва, че възприетият от нас начин на култивиране, пасажирание и криопрезервация на изолираните нови линии от човешки ЕС клетки, обезпечават тяхната стабилност и запазването на тяхната плюрипотентност.

5.3. RT-PCR

Освен описаните по-горе маркери Nanog и Oct-4, важен и често използван за пълното охарактеризиране на линиите от човешки ЕС клетки е и транскрипционният фактор Sox2. Той работи синергично с Oct-4 и Nanog в поддържането на недиференцираното състояние на човешките ЕС клетки. Изследванията за експресия на тези маркери в новосъздадените линии от човешки ЕС клетки бяха извършени чрез RT-PCR (Фиг. 8). Подбраните за амплификация фрагменти варираха по дължина между 283 и 466 bp и са елементи от матричната РНК на маркерните белтъци. Дизайнът на праймерите и респективно, на фрагментите беше извършен така, че да се преминава през интрон-екзонна граница. В допълнение, бяха провеждани и контролни амплификации с конститутивно експресиращия се ген GAPDH.

Проведените изследвания показаха и наличие на транскрипти с различна дължина при експресията на Nanog в линия VABE2 (Фиг. 8 Nanog, сравни B1 с B2). От литературата е известно, че различните варианти на Nanog имат различен капацитет за поддържане на плюрипотентността в ЕС клетки. Също така има данни, че отношението между отделните варианти на Nanog е различно при плюрипотентните, мултипотентните и прогениторните клетки. Получените от нас резултати за наличие на транскрипти с различна дължина при експресията на Nanog в линия VABE2 може да обясни нейната нестабилност, изразяваща се във висока склонност към спонтанна диференциация. Поради тази причина в последващите експерименти използвахме основно линията VABE1.

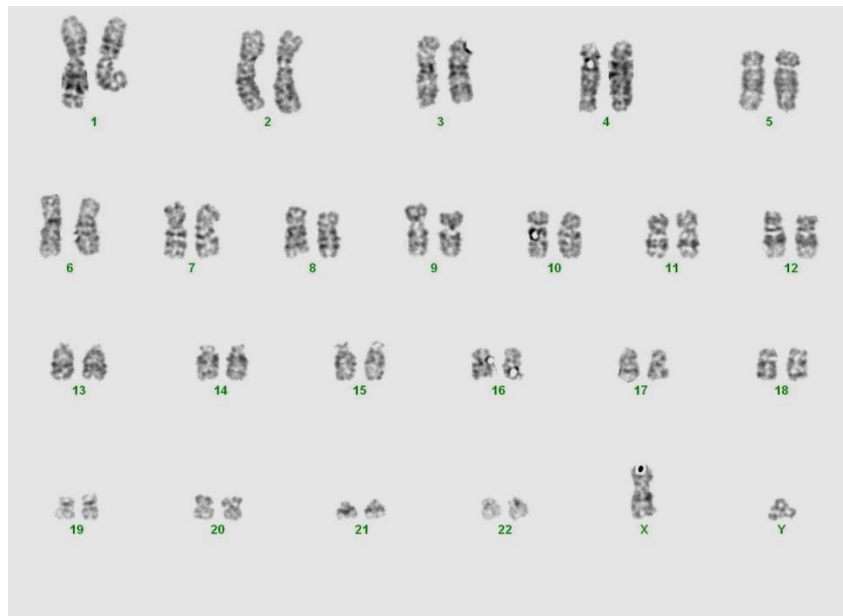


Фигура 8. Експресия на плюрипотентните маркери Nanog, Oct-4, и Sox 2 и контролния, конститутивно експресиран ген за глицералдехид-3 фосфат дехидрогеназа (GAPDH), демонстрирана чрез RT-PCR в клетки от линиите VABE1 (B1), VABE2 (B2) и контролната линия от човешки фибробласти MRC-5 (C). Дължината на амплифицираните продукти е определяна спрямо ДНК маркер (M).

5.4. Цитогенетичен анализ

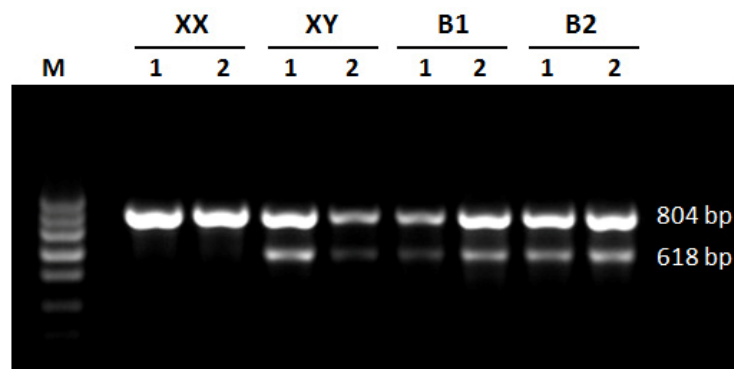
За разлика от обезсмъртените, трайни клетъчни линии, които често показват аномалии в хромозомния си набор, за ЕС клетки е установено, че са способни да поддържат геномния си интегритет дори и при много продължителен период на култивиране. Въпреки тази стабилност обаче е добре известно, че около 50% от човешките ембриони, получени чрез *in vitro* оплождане показват хромозомни аномалии като анеуплоидия, полиплоидия или хаплоидия. Като се има предвид и факта, че за изолирането на линии от човешки ЕС клетки използвахме и нискокачествени, остатъчни ембриони, за нас беше от особена важност да проверим кариотипа на изолираните линии от човешки ЕС клетки. За тази цел бе проведен цитогенетичен анализ, резултатите от който показаха, че линията VABE1 има нормален мъжки XY кариотип. Кариограма на клетки от линия VABE1 е представена на фигура 9.

Тъй като за следващите експерименти по насочена диференциация към герминативни клетки полът на линиите беше от значение, той беше потвърден и чрез PCR за Amelogenin. Разликите между X и Y хромозомните варианти на амелогениновия ген (AMELX и AMELY съответно) може да се използват в определяне на пола на неизвестни човешки проби, тъй като първият интрон на AMELY съдържа 6 bp делеция в сравнение с първи интрон на AMELX.



Фигура 9. Кариограма на линията VABE1, показваща нормален XY кариотип.

Това може да бъде детектирано чрез PCR на области от интрон 1, при което се наблюдават два амплификационни продукта, ако са налице и двете версии на гена AMELX и AMELY (т.е. пробата е от мъжки пол) или една ивица, ако присъства само AMELX, т.е. пробата е от женски пол. И двете изследвани линии VABE1 и VABE2 показаха наличие на два амплификационни продукта с дължина 804 и 618 bp, установени и при контролата от мъжки пол (Фиг. 10). По литературни данни 76% от изолираните линии от човешки ЕС клетки в световен мащаб към 2012г. са от женски пол (XX), като хипотезата на авторите на това изследване е, че недостатъчно добрите условия за изолиране на линии от човешки ЕС клетки, както и по голямата устойчивост на стрес при женските (XX) ембриони, са основните причини за това неравномерно разпределение между линиите с женски (XX) и мъжки (XY) генотип. На базата на тези литературни данни и факта, че две от изолираните в нашата лаборатория линии от човешки ЕС клетки са с мъжки (XY) генотип (линията VAM1 не е тествана за пол) можем да заключим, че условията подбрани от нас за изолиране на линии от човешки ЕС клетки са много добри.



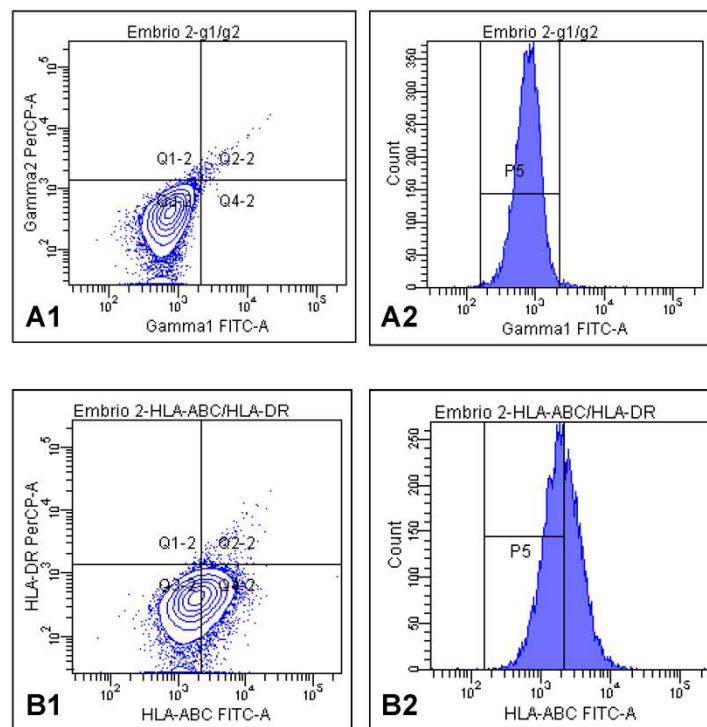
Фигура 10. Определяне на половата принадлежност на клетките от линиите VABE1 (B1) и VABE2 (B2) чрез PCR анализ на вариантите на амелогениновия ген. Контроли - ДНКи от лица от женски (XX) и мъжки (XY) пол. Дължината на амплифицираните продукти е определяна спрямо ДНК маркер (M).

5.5. HLA типизиране

Важна характеристика на човешките ЕС клетки, свързана с възможната им употреба като трансплантационен материал е ниското ниво на експресия на човешки левкоцитни антигени (human leukocyte antigen, HLA). Тези мембранно-свързани гликопротеини, кодирани от главния комплекс на тъканна съвместимост обуславят имунологичното разпознаване. Публикуваните в литературата резултати показват, че докато нивото на HLA клас I (HLA –A, -B и -C) в недиференцираните човешки ЕС клетки е ниско, като след *in vitro* или *in vivo* диференциация, то се повишава. В същото време

HLA клас II молекулите (HLA –DR, -DQ и -DP) и HLA-G въобще не се експресират в недиференцираните човешки ЕС клетки.

За да проверим какво е нивото на експресия на HLA клас I и II в клетките от линията VABE1, ние проведохме флоуцитометричен анализ при използване на античовешки моноклонални антитела за директна имунофлуоресценция (Фиг. 11). Хистограмните профили на отрицателната контрола (A2) и на пробата (B2) показват среден интензитет на флуоресценция (Geo mean) съответно Geo mean = 754 за отрицателната контрола (A2) и Geo mean= 1314 за пробата (B2), което е индикация за слаба експресия на HLA клас I антигени върху изследваните клетки. Получените резултати са в пълно съгласие с публикуваните данни за експресията на HLA в човешки ЕС клетки.



Фигура 11. Флоуцитометричен анализ: A1 и A2 – отрицателна контрола; B1 и B2 – маркирани с моноклонални антитела клетки от линията VABE1. Двувъзвешният флуоресцентен анализ (B1) показва слаба експресия на HLA клас I молекули и липса на HLA клас II експресия.

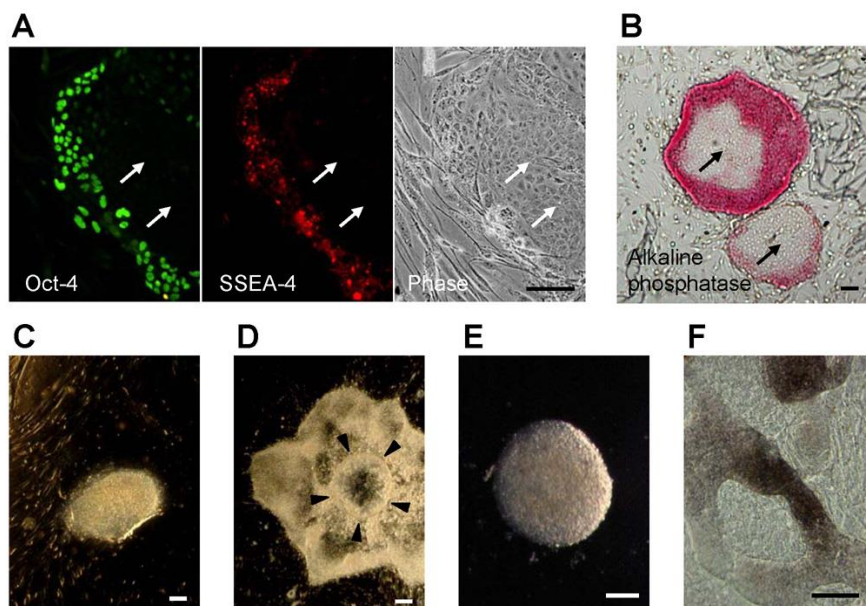
6. Изследване на плурипотентността на изолираните линии от човешки ембрионални стволови клетки.

Плурипотентността е уникална характеристика на ембрионалните стволови клетки и отразява факта, че за разлика от възрастните стволови клетки, които имат ограничен потенциал за диференциация (мултипотентни), ЕС клетките могат да

формират всички клетъчни типове, образуващи възрастния организъм. Тази способност е доказана експериментално при мишите ЕС клетки, от които многократно са създавани цели, нормално развиващи се организми. Тъй като подобен подход е недопустим при работа с човешки ЕС клетки, са разработени други методи за оценка на тяхната плурипотентност. Те включват изследване на възможността, както за спонтанна, така и за насочена диференциация в *in vitro* култура, а също така и способността за спонтанна диференциация *in vivo* чрез формиране на тератоми в имунодефицитни мишки. Диференциацията *in vitro* може да бъде осъществена, както на адхезивни култури (където колониите от ЕС клетки се диференцират без да се отделят от подложката), така и в суспензионни култури (при които ЕС клетки формират многоклетъчни агрегати, наречени ембрионидни тела).

Спонтанна диференциация в адхезивни култури от линия ВАМ1

За да изследваме способността за спонтанна диференциация на адхезивни култури от клетки от линията ВАМ1, ние оставихме колониите без пасажиране и без подмяна на хранителната среда за една седмица. В резултат наблюдавахме редица промени,



Фигура 12. Спонтанна *in vitro* диференциация на клетки от линията ВАМ1. (А) Диференциацията в центъра на колониите (стрелки) е съпроводена със загуба на експресия на Oct-4 (зелено) и SSEA-4 (червено). (В) Областите от диференцирани клетки не показват наличие на активна алкална фосфатаза. За разлика от недиференцираните (С), спонтанно диференцираните колонии (D) формират цистични структури (стрелки), а в някои случаи и свободно плаващи в културалната среда сфероиди (Е). Пигмент-съдържащи диференцирани клетки (F). Калибровъчната линия е с размер 50 μm .

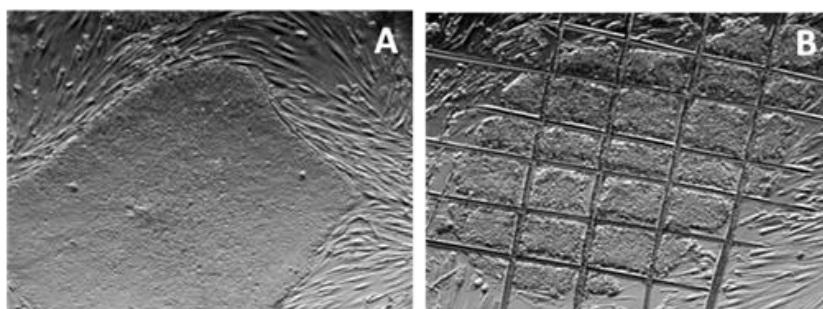
настъпващи с ЕС клетки, които започваха с поява на големи плоски клетки с нетипична за ЕС клетки морфология в средата на колониите. Тези клетки не експресираща

маркерите за плюрипотентност Oct-4 и SSEA-4 (Фиг. 12, А) и имаха много ниски нива на активност на алкална фосфатаза (Фиг. 12, В) за разлика от недиференцираните клетки по периферията на колониите. В някои случаи наблюдавахме формиране на цистични структури в центъра на спонтанно диференциращите се колонии от ЕС клетки (Фиг. 12, D). Понякога агрегати от клетки се отделяха от колониите под формата на свободно плаващи в средата сфероиди от диференциращи се клетки наподобяващи ембрионидни тела (Фиг. 12, E). В някои от случаите наблюдавахме и поява на пигментни клетки в диференциращите се колонии (Фиг. 12, F).

Формиране на ембрионидни тела от човешки ЕС клетки

Друг подход за индукция на спонтанна диференциация в ЕС клетки е формирането на ембрионидни тела (ЕТ). Те представляват многоклетъчни агрегати от ЕС клетки в суспензионна култура. В такива триизмерни агрегати, и при отсъствието на факторите поддържащи плюрипотентността на ЕС клетките като FGF2, и наличието на фактори индуциращи диференциация като FBS, те започват да се диференцират наподобявайки нормалния процес на гаструлация *in vivo*. Поради липса на трофектодерма и нормална ембрионална симетрия, диференциацията в ЕТ е дезорганизирана, но все пак довежда до развитие на клетъчни типове представители на трите зародишни пласта – ектодерма, ендодерма и мезодерма.

Процесът на формиране на ЕТ включва два основни момента, които имат съществено влияние върху качеството на получените ЕТ. Това са 1) техниките за отделяне на колониите от ембрионални стволови клетки от субстрата и 2) техниките за култивиране на отделените колонии в суспензия.

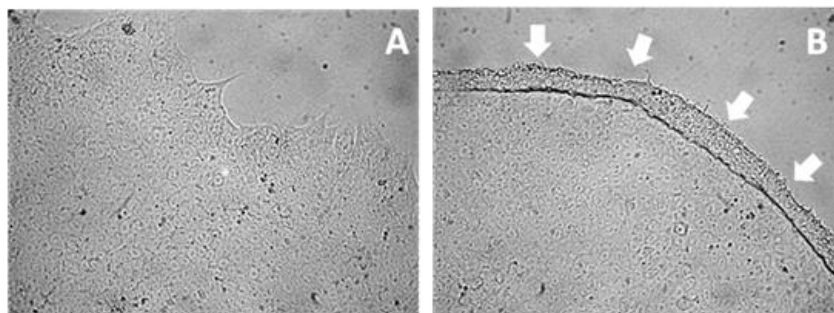


Фигура 13. Колония от човешки ембрионални стволови клетки преди (А) и след (В) нарязване със стъклена микропипета.

Отделянето от дъното на съда за култивиране може да бъде извършено по два начина – механично и ензимно, като и двата метода бяха тествани експериментално.

Механичното отделяне беше извършено чрез микроманипулация (нарязване и отделяне от субстрата) със стъклени микропипети под стереомикроскоп (Фиг. 13). Този метод дава възможност да се подберат най-добрите колонии, или да се вземат части от тях в случай, че колонията е хетерогенна и има спонтанно диференцирани участъци. Друго преимущество на този метод е, че той позволява в по-голяма степен да бъде контролиран размерът на ЕТ, като по-големите колонии могат да се нарежат на парченца с желан размер.

Вторият възможен начин за отделяне на клетките от субстрата е чрез ензимно третиране (Фиг. 14). За тези експерименти избрахме третиране с диспаза, която е широко използван ензим, поради по-мекото и действие. За разлика от трипсина или акутазата, при обработката с диспаза колонииите от ЕС клетки се откачат цели от субстрата. Това дава възможност за по-бързото им агрегиране в суспензионната култура. Методът е лесен, провежда се в инкубатор, чрез което се намалява стреса върху клетките, не изисква специфични умения и като следствие – има добра повторемост на резултатите.



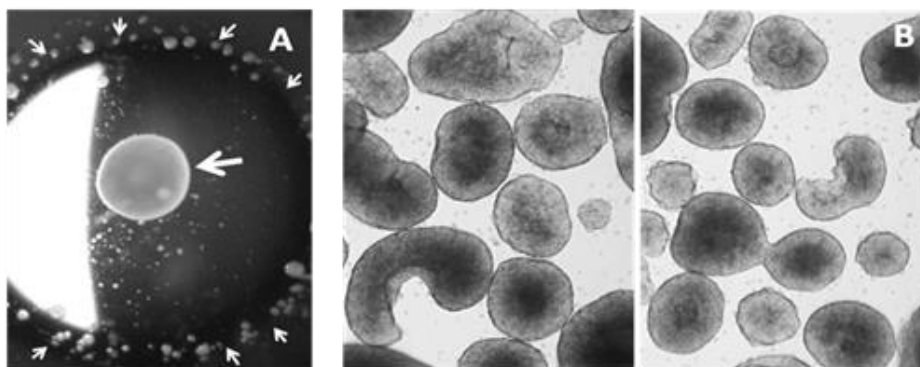
Фигура 14. Част от колония от човешки ембрионални стволови клетки преди (А) и след седем минутно третиране с диспаза (В). Стрелките показват равномерното отделяне на краищата на колонията от субстрата.

Като недостатък на тази процедура трябва да бъде посочено, че ако културата не е много качествена, тоест има много диференцирани колонии или части от тях, се налага механичното им почистване преди ензимното третиране.

Следващата стъпка, а именно начинът на отглеждане в условия на суспензия, също е от значение за формирането на ЕТ. Ние използвахме два от най-често прилаганите метода. Първият е класическият метод „висяща капка”. При него, отгледахме човешките ЕС клетки в капка хранителна среда, висяща от вътрешната страна на капачка на петри (Фиг. 15 А). Методът изключва възможността клетките да адхезират към твърдата подложка и допринася за по-бързото агрегиране на клетките в ЕТ. Този метод е много подходящ в случаите, когато ЕТ се формират от клетъчна суспензия от единични

клетки. Както е известно, човешките ЕС клетки са изключително чувствителни на дисоциационен стрес. Поради тази причина в експериментит, налагащи дисоциране на колониите от ЕС клетки до единични клетки, ние използвахме описания в литературата инхибитор на ROCK (Y-27632).

За разлика от метода „висяща капка”, отглеждането на отделените от субстрата колонии в плаки с неадхезивна повърхност дава възможност за получаване на значително по-големи количества ЕТ, както и да се осигурява добро хранене, поради по-големите обеми хранителна среда, които могат да се използват (Фиг. 15 В).

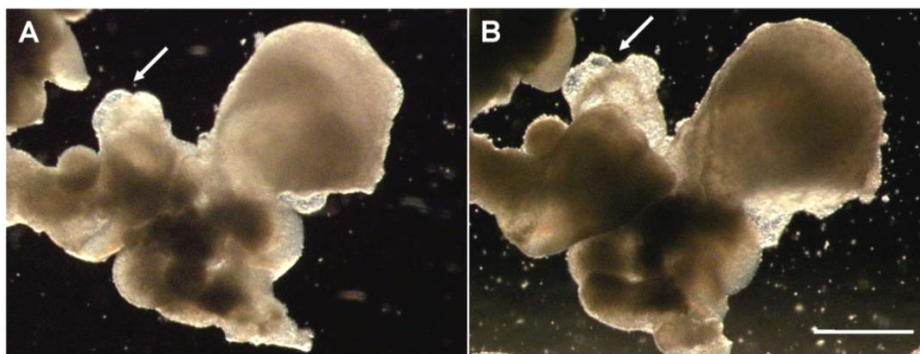


Фигура 15. Култивиране на ембрионидни телца във „висяща капка”(А) и неадхезивни плаки (В). Малките стрелки на панел „А” очертават границите на капката от хранителна среда, а голямата стрелка показва позицията на ембрионидното тяло.

Спонтанна диференциация към ектодерма, мезодерма и ендодерма в ембрионидни тела (ЕТ) от линия VABE1

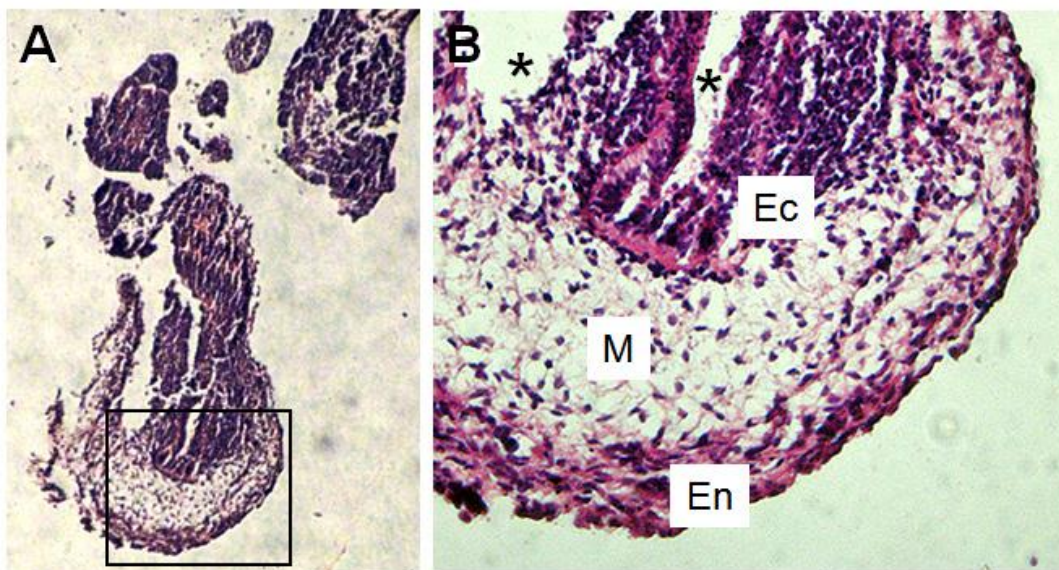
За да изследваме способността на клетките от линията VABE1 да формират ЕТ и да се диференцират *in vitro* до производни на трите ембрионални зародишни пласта (ектодерма, мезодерма и ендодерма), колонии с размери 300-500 μm , бяха отделени механично от подхранващия слой и оставени като суспензионна култура в хранителна среда в отсъствие на FGF2 и култивирани в неадхезивни плаки за 23 дни. След три дни клетъчните агрегати придобиваха сферична форма, като по повърхността им все още се забелязваха единични клетки, неинтегрирани в общия агрегат. След петия ден, формиращите се ЕТ нарастваха леко и придобиваха загладена повърхност. Съгласно установената последователност в диференциацията при ЕТ, това е периодът в който се осъществява диференциацията на най-външните, обвиващи клетки към примитивна ендодерма. В последващите етапи от развитието, тези клетки отлагат извънклетъчен матрикс, съдържащ колаген IV и ламинин и наподобяващ по своя състав и структура базалната мембрана. Като резултат от отлагането на извънклетъчния матрикс, често в ЕТ

се формират празнини, при които клетките в контакт с базалната мембрана запазват своята жизненост, докато клетките от вътрешността претърпяват апоптоза и предизвикват образуване на изпълнена с течност празнина. Този процес на кавитация се разглежда като важен морфологичен белег за настъпилата диференциация. В нашите експерименти забележимо разрастване на ЕТ и начало на кавитация бяха регистрирани след 16тия ден и ясно изразени на 22-23тия ден (Фиг. 16, стрелка).



Фигура 16. Промени в ембрионните телца настъпващи от 22 ден (А) до 23 ден (В). Стрелките показват област на интензивна кавитация. Калибровъчната линия е 250 μm .

След 23тия ден от развитието си *in vitro*, ембрионните тела бяха фиксирани, включени в парафин и подготвени за хистологично изследване на клетъчните типове, формирани в резултат от така предизвиканата диференциация. Резултатите от тези изследвания показаха наличие на производни и на трите ембрионални зародишни слоя – ектодерма, мезодерма и ендодерма (Фиг. 17). От литературата е известно, че при формиране на ЕТ от човешки ЕС клетки, клетките намиращи се на повърхността претърпяват спонтанна диференциация към примитивна ендодерма. Впоследствие тези клетки от примитивна ендодерма се диференцират на висцерална и париетална ендодерма, като формират базална ламина богата на ламинин и колаген IV. За разлика от истинските ембриони, ембрионните тела нямат трофоектодерма. Поради тази причина външната им повърхност е директно изложена на разтворимите фактори, намиращи се в средата за култивиране. Пермисивната дифузия на разтворими фактори (<1000Da) в средата за култивиране, от повърхността към вътрешността на ембрионните тела, дава възможност за създаване на концентрационни градиенти, които силно повлияват процесите на диференциация в ембрионните тела, водещи до формиране на хетерогенни популации от клетки производни на трите зародишни слоя. Получените резултати бяха в синхрон с литературните данни и потвърдиха плюрипотентните свойства на ново изолираната линия от човешки ЕС клетки ВАВЕ1.

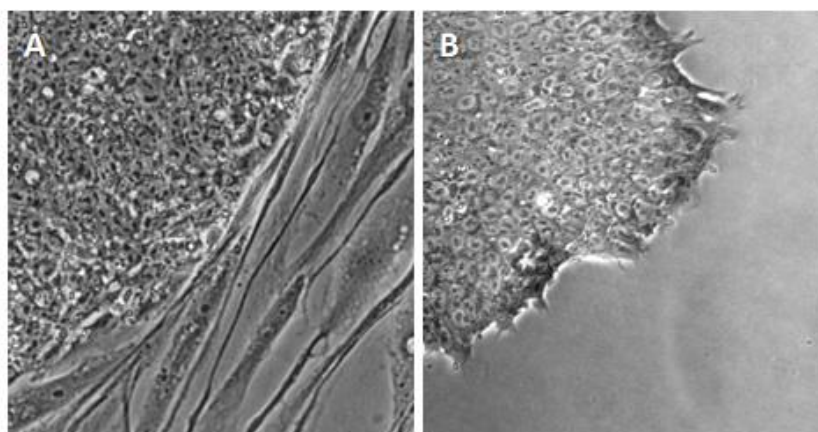


Фигура 17. Хистологично изследване на 23-дневни ембрионни тела, формирани от линията VABE1. А) Общ изглед на препарати оцветени с хематоксилин/еозин. Частта обозначена с квадрат е представена на по-високо увеличение на панел В. En – примитивна ендодерма, М – мезодерма, Ec – ектодерма, Звездите показват места на кавитация.

Адаптиране на изолираните нови линии от човешки EC клетки към култивиране върху Matrigel в mTeSR-1 среда без наличие на подхранващ слой от фибробласти.

В първоначалните етапи на изолиране на линиите от човешки EC клетки, както и при първите няколко пасажа, те бяха култивирани върху подхранващ слой от миши STO фибробласти. За много от експериментите, които проведохме беше по-удобно, а в някои случаи и наложително, линиите от EC клетки да бъдат култивирани при feeder-free условия. Това наложи адаптирането на две от ново изолираните линии, VABE1 и VABE2, към култивиране върху Matrigel. Това което стои зад търговската марка Matrigel, е разтворим екстракт от базална мембрана на Engelbreth-Holm-Swarn (EHS) миши тумор. Той съдържа основно ламинини, колаген IV, ентацин и хепарин сулфат протеогликан, заедно с редица разтежни фактори като FGF2, insulin-like growth factor-1(IGF-1), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), nerve growth factor (NGF) и transforming growth factor-b1 (TGF-b1). Тъй като средата за култивиране, която използвахме в началните етапи не е подходяща за feeder-free култури ние използвахме среда mTeSR-1 предлагана от Stemcell technologies. Тази среда е създадена специално за култивиране на човешки EC клетки върху Matrigel. При първите 1-2 пасажа на клетки от линиите VABE1 и VABE2 в тези условия забелязахме малко по-висок от „нормалния“ процент спонтанна диференциация в някои от колониите, но след тези начални

флуктуации не се наблюдаваха повече отклонения. Тъй като при липсата на подхранващ слой от STO фибробласти няма какво да уплътнява границите на колониите от човешки ЕС клетки, те не са толкова гладки и често по тях се наблюдават ламелиподии и филоподии, което е нормално за тези условия на култивиране и не е белег за диференциация (фиг. 18). Линията ВАВЕ1 беше култивирана при тези условия повече от 35 пасажа, без да показва отклонения в кариотипа, морфологията и плюрипотентността си.



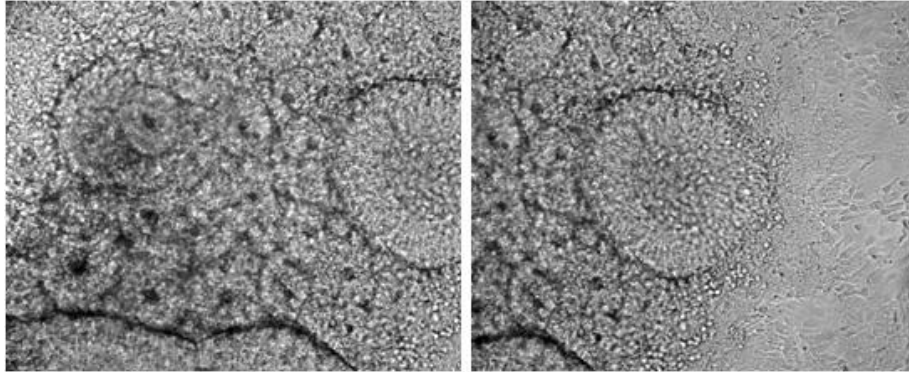
Фигура 18. Примерни изображения на колонии от ЕС клетки от линия ВАВЕ1 култивирани върху миши STO фибробласти (А) и Matrigel (В).

7. Диференциация към невроектодерма (неврони).

7.1. Спонтанна диференциация на адхезивни култури от човешки ембрионални стволови клетки от линия ВАВЕ1 към невроектодерма и неврони.

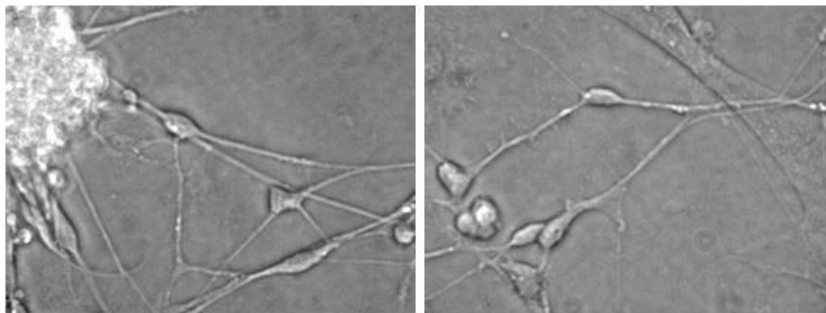
От литературата е известно, че спонтанна диференциация към невроектодерма може да бъде индуцирана чрез „прерастване“ на културите от ЕС клетки. В експериментите проведени от нас това беше постигнато чрез култивиране на ЕС клетки от линия ВАВЕ1 за период от 21 дни. Колонии от ЕС клетки бяха култивирани върху Matrigel в mTeSR-1 среда, като през първата седмица те бяха отглеждани при стандартни условия за култивиране на човешки ЕС клетки и ежедневна смяна на хранителната среда, с цел достигането на размери подходящи за пасажирание. Така отгледаните колонии от ЕС клетки, бяха оставени да растат в същите плаки без да бъдат пасажирани за още две седмици, през които смяна на средата се извършваше всеки четвърти ден. В културите започнаха да се наблюдават структури известни от литературата като неврални розетки (Фиг. 19). *In vitro* процесът на неврална диференциация на човешки ЕС клетки започва с формирането на примитивната невроектодерма, което се проявява чрез образуването на

неврални розетки, изградени от неврални прогениторни клетки. Невралните розетки напомнят по структура на напречен пререз от неврална тръба на три- седмичен човешки ембрион.



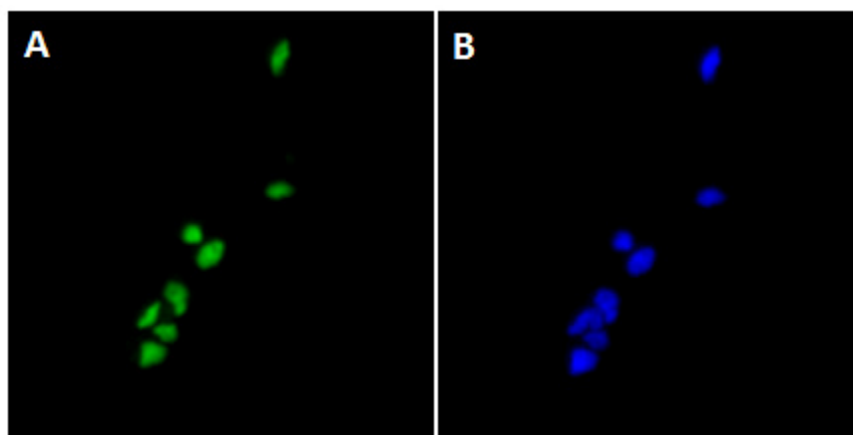
Фигура 19. Спонтанна диференциация на клетки от линия VABE1 към невроектодерма, на ден 17-ти. Формиране на неврални розетки.

След получаването на неврални розетки чрез спонтанна диференциация, те бяха механично изрязани и прехвърлени върху Matrigel в mTeSR-1 среда, където бяха култивирани за още една седмица при смяна на средата всеки втори ден. В така получените култури наблюдавахме клетки с морфология, много наподобяваща тази на неврони (Фиг. 20).



Фигура 20. Спонтанна диференциация на линия VABE1 към неврони, след механично пасажирание на неврални розетки.

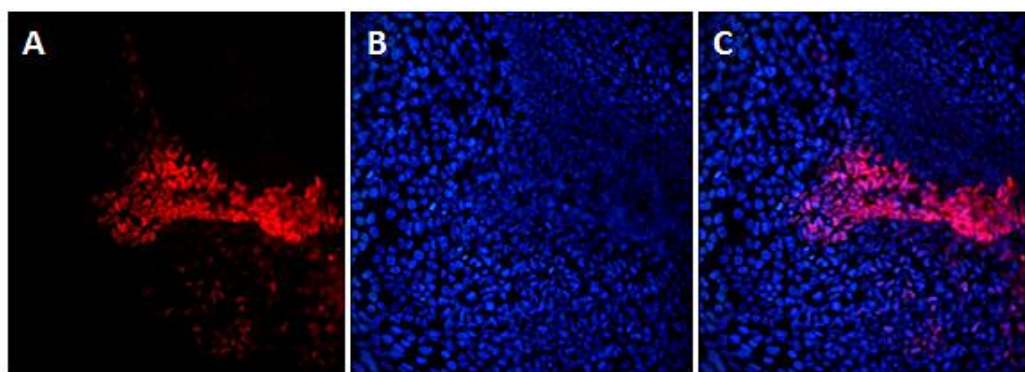
За да потвърдим диференциацията към невроектодерма, проведохме имунофлуоресцентен анализ като използвахме антитяло срещу транскрипционния фактор SOX1, който е един от най-ранните маркери за диференциация към невроектодерма (Фиг. 21), като над 90% от клетките в културите от механично пасажирани неврални розетки бяха позитивни по този маркер.



Фигура 21. Имунофлуоресцентен анализ с антитела срещу SOX1 (A) в невроектодермални клетки, диференцирани от човешки ЕС клетки от линия VABE1. Позицията на ядрата е установена чрез оцветяване с DAPI (B).

Позитивните резултати за експресия на SOX1, демонстрираха възможността на ЕС клетките от линия VABE1 за диференциация към невроектодерма.

Друг маркер за диференциация към невроектодерма е OTX2, който *in vivo* се експресира в anteriорната част на невралната тръба, от която впоследствие се развива прозенцефалона. Невроектодермалните прекурсори, диференцирани от човешки ЕС клетки в отсъствие на постериоризиращи морфогени като RA, имат транскрипционен профил подобен на anteriорната невроектодерма *in vivo*.



Фигура 22. Имунофлуоресцентен анализ с антитела срещу OTX2 (A) в невроектодермални, производни получени чрез спонтанна диференциация на човешки ЕС клетки от линия VABE1. (B) Оцветяване с DAPI за визуализиране на клетъчните ядра. (C) Насложени образи

За да проверим дали невралните розетки спонтанно диференцирани от човешки ЕС клетки от линия VABE1 експресират OTX2, ние проведохме следният експеримент. Културите, от които бяха механично изолирани неврални розетки за предишния експеримент, бяха оставени да се развиват за още 10 дни в среда EBdM, след което беше

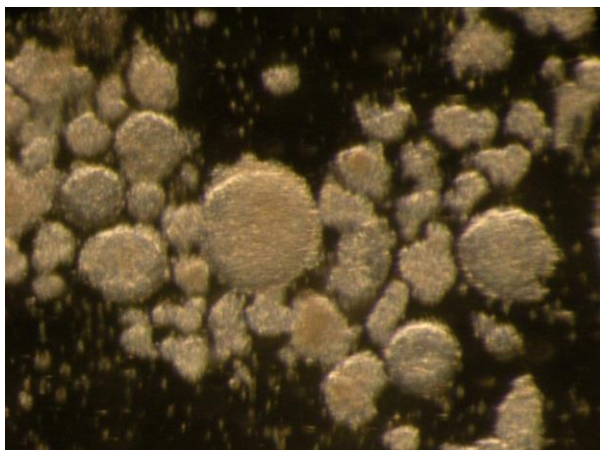
проведен имунофлуоресцентен анализ за експресия на транскрипционния фактор OTX2. Резултатът от този анализ, представен на фигура 22, ясно демонстрира наличието на OTX2 позитивна популация от клетки.

Общо резултатите от проведените експерименти по спонтанна диференциация към невроектодерма, представени на фигура 21 и 22, показаха потенциала за диференциация на ЕС клетки от линия VABE1 до SOX1 позитивни невроектодермални прогенитори, и OTX2 позитивни клетки характерни за anteriорната невроектодерма, а съдейки по морфологията на клетките, представени на фигура 20 и до неврони.

7.2. Насочена диференциация на човешки ембрионални стволови клетки от линия VABE1 към невроектодерма и неврони.

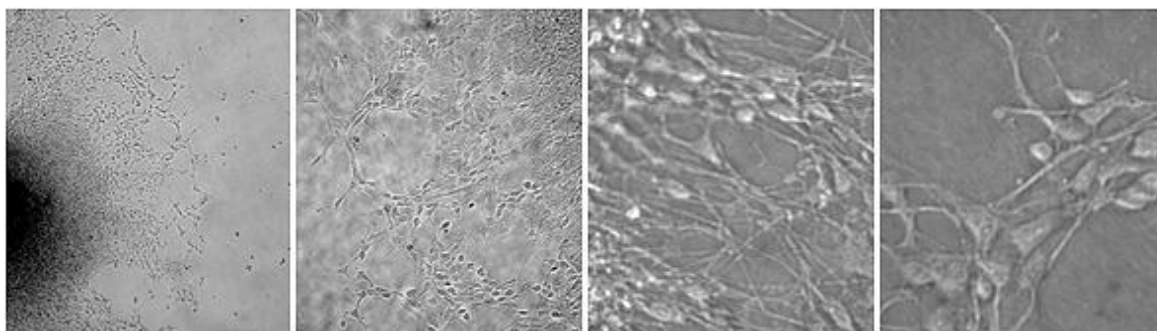
За да демонстрираме потенциала на човешките ЕС клетки от линия VABE1 за насочена диференциация към неврони, бяха проведени експерименти за насочена диференциация по протокол модифициран от нас. Той включва три стъпки. В първия етап колонии от човешки ЕС клетки от линия VABE1 бяха култивирани на адхезивни култури върху Matrigel в mTeSR-1 среда с добавени 20ng/ml FGF2 и 10 μ M RA за 5 дни. В този период на индукция към невроектодерма клетките претърпяха ясна морфологична промяна, която наблюдавахме в културите още на 3-тия ден, като клетките увеличиха размера си, границите на колониите, както и границите между самите клетки станаха трудно различими, а ядръцата по-трудно видими.

Втората стъпка включваше вдигане на клетките в суспензия и култивирането им за още 5 дни в mTeSR-1 среда, под формата на сфероида (невросфери) (Фиг. 23) – това са подобни на ET структури, формирани от клетки вече насочени към невроектодерма, в които за разлика от ET не могат да се формират производни на останалите два зародишни пласта – ендодерма и мезодерма. В този период клетките продължават диференциацията си до невробласти.



Фигура 23. Невросфери формирани от ЕС клетки от линия VABE1 след индукция към невроектодерма и култивиране в неадхезивни плаки под формата на сфероиди за три дни.

Третият етап включваше посяването на невросферите на адхезивни култури върху Matrigel и култивирането им в среда DMEM/F12 със суплемент B27 и 10 μ g/ml хепарин. Културите бяха оставени да се развиват поне още една седмица, или до появата на клетки с характерна за невроните морфология (Фиг. 24).



Фигура 24. Примерни изображения за насочена диференциация към неврони получени чрез култивиране на невросфери от линия VABE1 на адхезивни култури за 10 дни.

Ползвайки този протокол за насочена диференциация ние получихме култури, в които над 90% от клетките бяха с типичната за неврони морфология (Фиг. 24), което показва способността на човешките ЕС клетки от линия VABE1 да бъдат насочено диференцирани към невроектодерма и в частност към неврони.

8. Диференциация към мезодерма (кардиомиоцити)

Генерирането на кардиомиоцити от човешки ЕС клетки е от съществен интерес, както за репаративната медицина, така и за ред други области от науката и практиката. Първо, то предоставя достъп до *in vitro* модел на развитието на човешкото сърце, който не може да бъде постигнат по друг начин. Второ, кардиомиоцитите, получени от

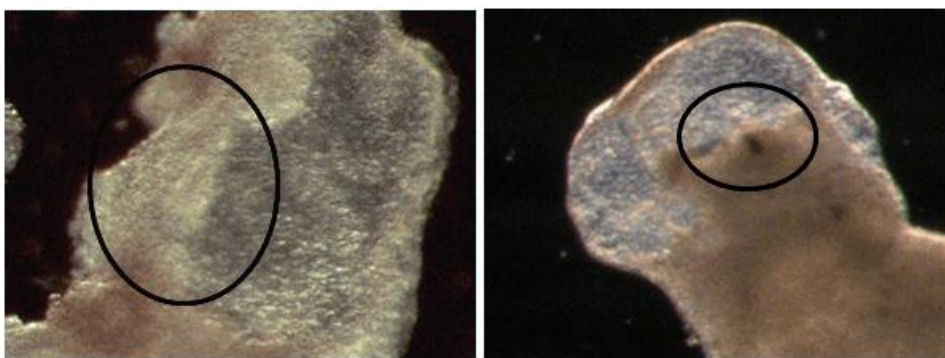
стволови клетки са модел, който може да се използва за важни изследвания, вариращи от клетъчна електрофизиология до белтъчна биохимия. Трето, продукцията на неограничени количества от човешки кардиомиоцити е от особен интерес за фармацевтичната промишленост при разработването на нови кардиоактивни съединения и скрининг за потенциална кардиотоксичност. Независимо от това какви са конкретните приложения е необходимо разработването на ефективни и възпроизводими протоколи за кардиомиоцитна диференциация.

8.1. Спонтанна диференциация на човешки ембрионални стволови клетки от линия ВАВЕ1 към мезодерма и кардиомиоцити.

По литературни данни човешките ЕС клетки могат да се диференцират спонтанно до кардиомиоцити, когато се култивират под формата на ЕТ, но със сравнително малък процент успеваемост. При проведените от нас експерименти с линията ВАВЕ1 за спонтанна диференциация на кардиомиоцити в ембрионни тела, те бяха отглеждани за 25 дни в среда EBdM. Получените резултати потвърдиха ниската ефективност на спонтанната кардиомиоцитна диференциация при човешките ЕС клетки. На 23-тя ден от общо 20-те ЕТ, в две (10% ефективност) беше наблюдавана появата на спонтанно котрактиращи групи кардиомиоцити.

8.2. Насочена диференциация на човешки ембрионални стволови клетки от линия ВАВЕ1 към мезодерма и кардиомиоцити.

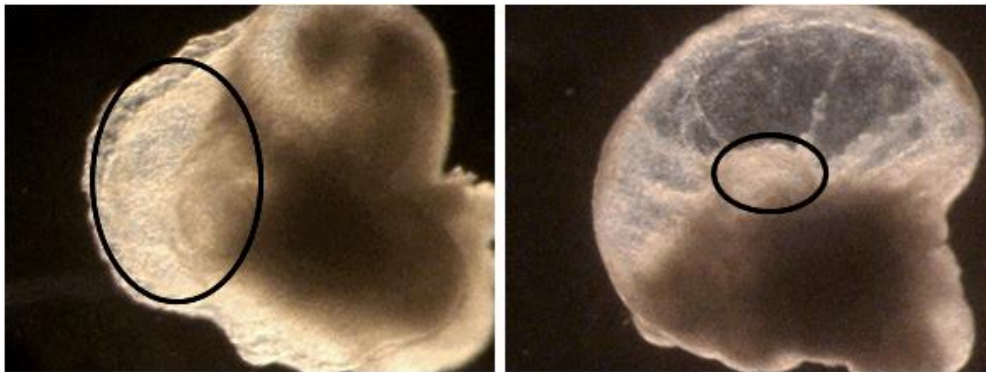
BMP 4 играе важна роля при формирането на мезодермата и на всички мезодермални производни, включително спецификацията на кардиомезодермата и кардиомиоцитите. Установено е, че факторите от BMP семейството стимулират експресията на SMAD и MAP3K7, които от своя страна повишават продукцията на сърдечномускулните транскрипционни фактори NKX2-5 и GATA4 и като резултат - довеждат до формирането на прекардиобласти и кардиобласти. Това ни даде основание да изследваме способността на ЕС клетки от линия ВАВЕ1 да се диференцират до кардиомиоцити *in vitro* при индукция с BMP4. За целта култивирахме ЕТ от линия ВАВЕ1 в среда с добавка на BMP4 (25ng/ml) в продължение на 22 дни. В края на третата седмица (20 ден) в 3 от общо 10-те ЕТ (Фиг. 25) се наблюдаваха котрактиращи групи от кардиомиоцити, което е около три пъти повече от получените чрез спонтанна диференциация и потвърди възможността за стимулиране на този диференциационен път чрез BMP4.



Фигура 25. Ембрионни телца от линията ВАВЕ1 с контрактиращи зони (отбелязани с кръг) от насочено диференцирани с BMP4 кардиомиоцити

При методите за насочена диференциация на ЕС клетки в някои случаи се използва ко-култивирането с определени клетъчни линии или кондиционирана от тях среда, които секретират фактори индуциращи диференциацията на ЕС клетки в дадена посока. От литературата е известно, че клетъчната линия 5637 (ATCC® НТВ-9™) от човешки рак на пикочен мехур секретира множество растежни фактори като leukemia inhibitory factor (LIF), stem cell factor (SCF), както и множество интерлевкини имащи отношение към хематопоезата. Поради това, кондиционирана среда от линия НТВ-9 дълги години е използвана за *in vitro* култивиране на първични култури от хематопоетични клетки. Също така има данни, че leukemia inhibitory factor (LIF) играе роля при диференциацията на кардиомиоцити от миши ЕС клетки, както и че има различен ефект върху спецификацията и пролиферацията на кардиомиоцитите, като има по-скоро инхибиращ ефект върху спецификацията, но повлиява позитивно пролиферацията на кардиобластите и хипертрофията на вече диференцираните кардиомиоцити.

Базирайки се на литературните данни, ние култивирахме ембрионни тела от линия ВАВЕ1 за 15 дни в кондиционирана среда от клетъчната линия НТВ-9 като наблюдавахме диференциация към кардиомиоцити в 2 от общо 4-те ембрионни тела (Фиг. 26). Въпреки, че не може да бъде направена статистика поради малкия брой ЕТ, важно е да се отбележи, че контрактиращи групи от кардиомиоцити се появиха само след 12 дни, което е почти два пъти по-бързо от резултатите получени при спонтанната диференциация или индукцията с BMP4. Това вероятно се дължи, както на по-добра пролиферация на специфицираните кардиобласти, така и на по-добра преживяемост и хипертрофия на вече диференцираните кардиомиоцити при култивиране в среда кондиционирана от линия НТВ-9.



Фигура 26. Ембрионидни телца от линията ВАВЕ1 с контрактиращи зони (отбелязани с кръг) от насочено диференцирани кардиомиоцити с кондиционирана среда от клетъчната линия НТВ-9

Проведените експерименти показват, че ЕС клетки от линия ВАВЕ1 имат потенциала да формират мезодермални производни, каквито са кардиомиоцитите, както спонтанно, така и чрез насочена диференциация. От всички използвани подходи за кардиомиоцитна диференциация на линията ВАВЕ1, третирането с кондиционирана среда от човешката линия НТВ-9 се оказва най-икономичен, ефективен и бърз метод.

9. Диференциация към герминативни клетки

През последните години бяха проведени ключови експерименти, чрез които беше показано, че е възможно от миши ЕС клетки да се получат не само различни типове соматични клетки, но и да се индуцира диференциацията им до примордиални герминативни клетки (ПГК) и съответно до гамети, от които впоследствие могат да се получат бластоцисти. От незрели сперматозоиди, получени от миши ЕС клетки, са получени зрели гамети, годни за оплождане, от които е родено жизнеспособно поколение. Предварителните изследвания показват, че човешките ЕС клетки имат подобен капацитет. Ако бъде развит, огромният потенциал на тази нова технология ще бъде от полза за репродуктивната медицина, както като достъпна система за изучаване на ранните стадии на гаметогенезата при човека, така и като ефикасен метод за получаване на полови клетки, способни на геномно репрограмиране.

От литературните данни е известно, че първите сигнали за специфицирането на ПГК *in vivo*, произхождат от екстраембрионалната ектодерма под формата на BMP4. Установено е, че BMP8b- друг член на това семейство също играе важна роля, като формира хетеродимери с BMP4 и по този начин стимулира функцията му. BMP4 и BMP8b трябва да действат съвместно, за да предизвикат правилно специфициране на

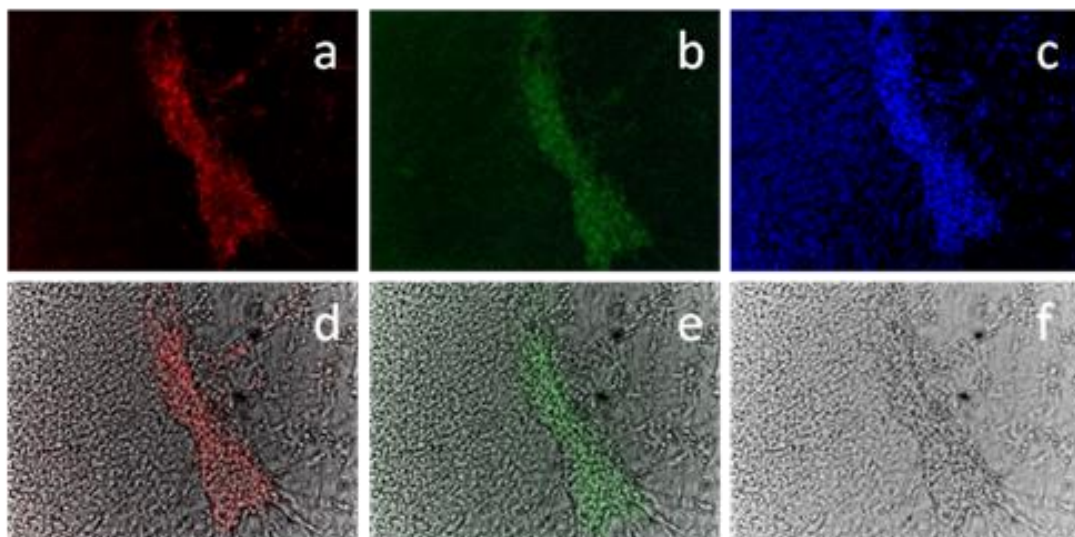
ПГК при мишка. Подобни резултати са получени и при третиране на човешки ЕС клетки с BMP. Третирането с BMP4 индуцира експресията на маркери, специфични за ПГК, а добавянето на BMP7 и BMP8b имат адитивен ефект върху индукцията на герминативните клетки. Други идентифицирани фактори, които имат отношение към формирането, съзряването и оцеляването на ПГК са glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) и цитокина stem cell factor (SCF). Тези данни от литературата ни дадоха основание да разработим нов протокол за индукция на диференциация към ПГК, обединявайки специфициращия ефект на представителите на гореспоменатите фактори от фамилията на BMP (BMP4, BMP7 и BMP8b) и позитивните ефекти на GDNF и SCF.

9.1. Спецификация и ранна диференциация на човешки ембрионални стволови клетки от линия VABE1 към примордиални герминативни клетки, чрез третиране с BMP4, BMP7, BMP8b, GDNF и SCF.

Възможността за диференциация към ПГК от ЕС клетки от линия VABE1 беше проучена, като ги култивирахме под формата на ембрионидни тела в присъствие на BMP4, BMP7, BMP8b, GDNF и SCF, добавени в концентрация 50ng/ml за 10 дни. След 10-тия ден, ЕТ бяха прехвърлени в условия позволяващи адхезията им върху коатирани с желатин стъкла и култивирани за още 5 дни. Това беше необходимо за преминаването на културите от големи триизмерни агрегати, каквито са ЕТ, в адхезивна монослойна култура, което даде възможност за директно провеждане на имунофлуоресцентен анализ.

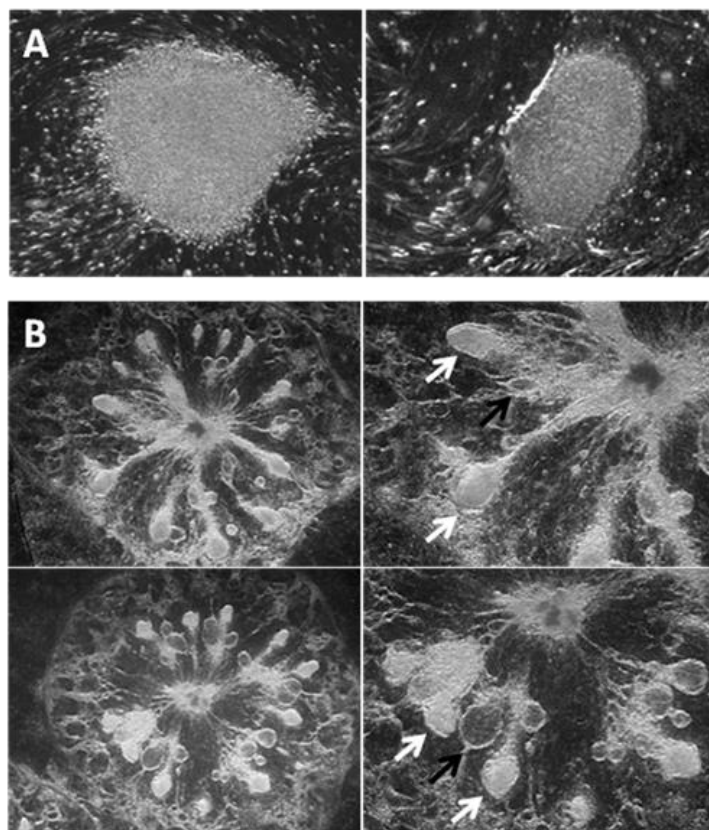
Експресията на транскрипционния фактор *Vlimp1* се счита за един от най-ранните маркери за спецификация към ПГК. За да проверим за наличие на клетъчни популации позитивни по този маркер в така получените култури, ние проведохме имунофлуоресцентен анализ за *Vlimp1*. Фигура 27. илюстрира резултатите от такова изследване, проведено с антитела срещу *Vlimp1*, при което ясно се забелязва група от клетки, позитивни по този маркер, което е характеристика за ранна спецификация към ПГК.

Полученият положителен резултат ни позволи да доразвием протокола за диференциация, като заменим ембрионидните телца и преминем към използване на монослойни култури от човешки ЕС клетки. Този подход създава възможност за по-голям контрол върху процесите на диференциация, елиминирайки вътрешните диференциационни сигнали, присъщи за ЕТ.



Фигура 27. Имунофлуоресцентно изследване на ембрионидни тела, третирани с комбинация от BMP4, BMP7, BMP8b SCF и GDNF (50 ng/ml) за десет дни и оставени да адхезират върху покривно стъкло за още пет дни. Използваните антитела са анти-Blimp1(a) и анти- Oct4 (в). Позицията на клетъчните ядра е визуализирана с Hoechst (c), а фазовоконтрастният образ на културата е представен на панел (f). Насложените фазовоконтрастни образи с флуоресцентните образи от Blimp1 (d) и Oct4 (e) потвърждават факта, че една и съща клетъчна групировка е позитивна и по двата маркера.

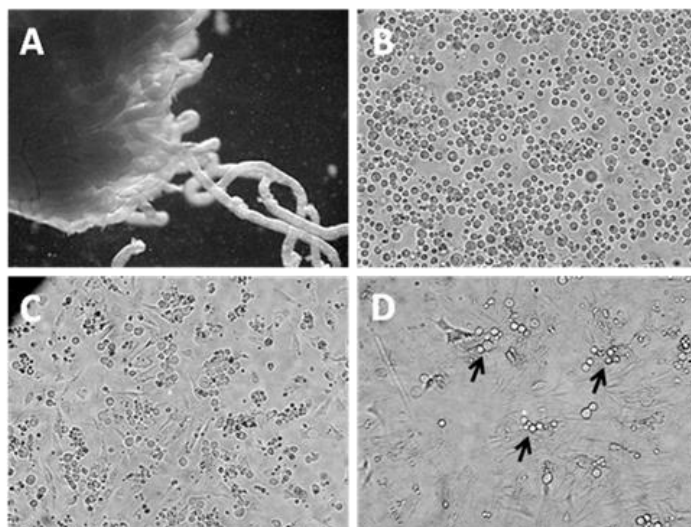
За провеждането на тези експерименти, третирахме клетки от линия BAVE1 със същата комбинация от фактори, която беше приложена върху ET (BMP4, BMP7, BMP8b, SCF и GDNF)(Фиг. 27). Колониите бяха отглеждани върху подхранващ слой от фибробласти, тъй като е известно, че те подпомагат процеса на диференциране на ЕС клетки към ПГК. Десет дни след началото на третирането, колониите от ЕС клетки показаха ясно изразена тенденция към диференциация, изразяваща се в оформяне на триизмерни, сферични структури подобни на ембрионидни телца (Фиг. 28,В, стрелки). Тези структури имаха два типа морфология – тъмни и наподобяващи цистични ET (Фиг. 28,В, черни стрелки) и светли и изпълнени с клетки телца (Фиг. 28,В, бели стрелки), наподобяващи класическите ET. Следвайки аналогията с ET, тези триизмерни структури най-вероятно отвън са обвити с ендодерма, а в изпълнените с клетки телца са съсредоточени клетки с мезодермален произход. Подобно допускане се подкрепя от факта, че използваният BMP4 е мощен индуктор на мезодермални производни, каквито са и соматичните клетки на половите гребени.



Фигура 28. Колонии от човешки ЕС клетки, отглеждани върху подхранващ слой от фибробласти за 10 дни без третиране (А) или третирани със смес от 50 ng/ml от BMP4, BMP7, BMP8b, SCF и GDNF (В). Десните панели на „В” представят части от левите, на по-високо увеличение. Стрелките показват позицията на структури подобни на ембрионидни телца.

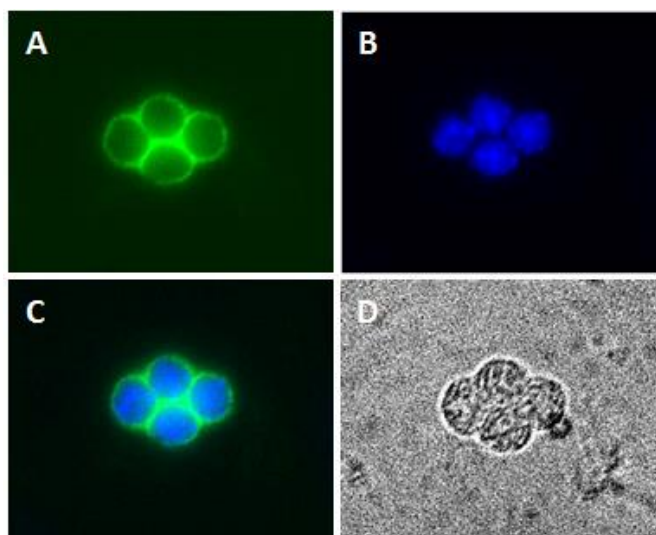
За разлика от първият експеримент, в който използвахме *Blimp1* като маркер за ранна диференциация към ПГК, в настоящият експеримент се насочихме към маркер за късна деференциация към герминативни клетки, а именно - *VASA*. *VASA* е високо консервативен белтък от семейството на АТФ-зависимите РНК хеликази, който е не само необходим за нормалното протичане на гаметогенезата, но е и задължителен за специфицирането и диференцирането на герминативните клетки по време на ембриогенезата. В момента, експресията на *VASA* се смята за един от най-надеждните маркери за герминативни клетки в повечето животински видове, което ни даде основание да проверим експресията му в сферичните структури, описани по-горе.

За да потвърдим специфичността на планирания имунофлуоресцентен анализ с използване на закупеното анти-*VASA* антитяло, ние проведохме предварителни експерименти като изолирахме първични клетъчни култури от миши тестиси (Фиг. 29), в които, както е известно от литературата, има популация от *VASA*-позитивни клетки.



Фигура 29. Фазовоконтрастни образи на тестис от новородена мишка с видими семенни каналчета (A), клетки, непосредствено изолирани от тестис (B), същите клетки след 24 часово култивиране *in-vitro* (C) и същата култура на четвъртия ден от изолиране на клетките (D). Стрелките указват групички от герминативни клетки.

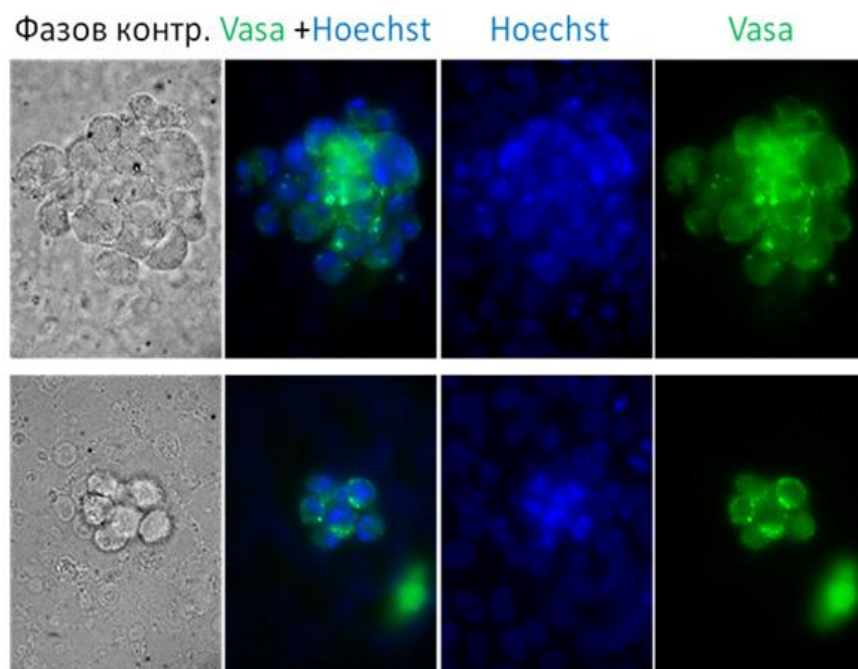
След четири дни в условия *in vitro* в първичната култура от миши тестиси, ясно се забелязваха струпвания от клетки със сферична морфология, които най-вероятно представляваха групи от герминативни клетки. Имунофлуоресцентният анализ, извършен върху тях показва, че те, съгласно очакванията ни, са VASA позитивни герминативни клетки (Фиг. 30).



Фигура 30 Имунофлуоресценция с анти-VASA (A) и флуоресцентно оцветяване на ДНК с DAPI (B) за установяване позицията на ядрата на герминативните клетки. Комбинираните флуоресцентни образи показват цитоплазмена локализация на VASA в група от позитивни клетки (C). Фазовоконтрастен образ на изследваните клетки (D).

Този резултат потвърди специфичността на анти-VASA антитялото, което ни позволи да пристъпим към проучване на експресията на този маркер в диференцираните към ПГК с BMP4, BMP7, BMP8b, SCF и GDNF клетки от линията VABE1. За да проверим за наличие на клетки, които са в по-напреднал етап от диференциацията към герминативни клетки в тези култури, ние проведохме имунофлуоресцентен анализ за експресия на VASA. Резултатите от това изследване (Фиг. 31), потвърдиха наличието на групи от VASA позитивни клетки, които подобно на мишите герминативни клетки (Фиг. 30), показаха позитивна цитоплазмена реакция.

Получените резултати демонстрираха, че използваният протокол за диференциране на монослойни култури от човешки ЕС клетки, чрез обработването им с коктейл, съдържащ 50 ng/ml BMP4, BMP7, BMP8b, SCF и GDNF в продължение на 10 дни, довежда до успешно индуциране развитието на VASA позитивни герминативни клетки.



Фигура 31. Имунофлуоресценция с анти- VASA (Vasa, зелено) и флуоресцентно оцветяване на ДНК (Hoechst, синьо) за установяване позицията на клетъчните ядра на човешките ЕС клетки, третирани с BMP4, BMP7, BMP8b, SCF и GDNF. Комбинираните флуоресцентни образи показват цитоплазмена локализация на VASA в група от позитивни клетки (Vasa+Hoechst). Панелите „Фазов контр.“ показват фазовоконтрастните образи на изследваните клетки.

Разработеният протокол, макар и успешен, изискваше обработка на човешки ЕС клетки с голям набор от скъпо струващи растежни фактори и изискваше дълготрайно третиране,

което допълнително оскъпяваше процедурата. Това ни стимулира да потърсим нов, по-ефективен протокол за диференциране на човешки ЕС клетки към герминативни клетки.

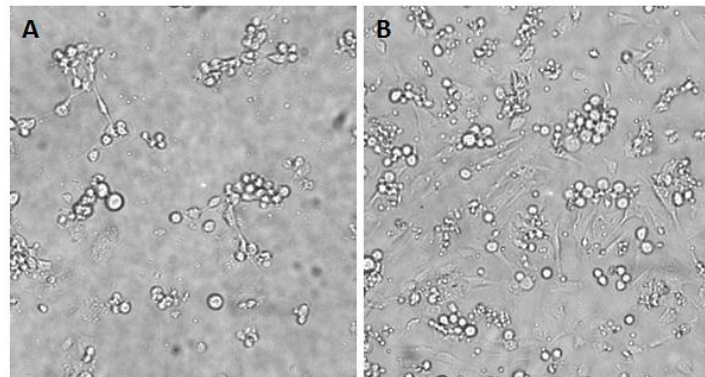
9.2. Спецификация и ранна диференциация на човешки ембрионални стволови клетки от линия VABE1 към примордиални герминативни клетки чрез третиране с BMP4 и среда, кондиционирана от човешки амниотични стволови клетки от линия hAFSC-4

От литературата е известно, че амниотичните стволови клетки секретират широк спектър от растежни фактори като SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), FGF2, FGF7, EGF, LIF, TGF- β , SCF (stem cell factor). При анализа на литературните данни за секретомата на амниотичните стволови клетки ние забелязахме, че много от факторите секретирани от тези клетки играят важна роля в процесите на диференциация и пролиферация на примордиалните герминативни клетки. Така например хемокинът SDF-1 има основна роля в процеса на миграция на ПГК, като ги насочва към половите гребени, а също така подпомага оцеляването и пролиферацията им по време на миграцията, както при мишки, така и при Zebrafish и Xenopus laevis. Други изследвания демонстрираха ролята на FGF сигнализацията в процесите на миграция и пролиферация на ПГК при мишка, като показаха, че FGF2 регулира основно подвижността на ПГК, докато FGF7 повлиява броя им. Също така, през последните години някои от тези фактори като LIF, SCF и EGF в комбинация с BMP4, са успешно използвани за насочена диференциация, както на човешки ЕС клетки, така и на миши ЕС клетки към ПГК.

По тези причини, ние изолирахме и линия от човешки амниотични стволови клетки. След получаването на първичните култури от амниотичен флуид, клетките бяха сортирани на чрез FACS по повърхностно разположения маркер SSEA-4. Тази SSEA-4 позитивна клетъчна популация беше култивирана в среда за амниотични стволови клетки. Така, получихме клетъчна линия човешки амниотични стволови клетки, която нарекохме hAFSC-4 и използвахме в последващите експерименти за получаване на hAFSC-4 кондиционирана среда (hAFSC-4-CM), богата на фактори, стимулиращи диференциацията на човешки ЕС клетки към ПГК.

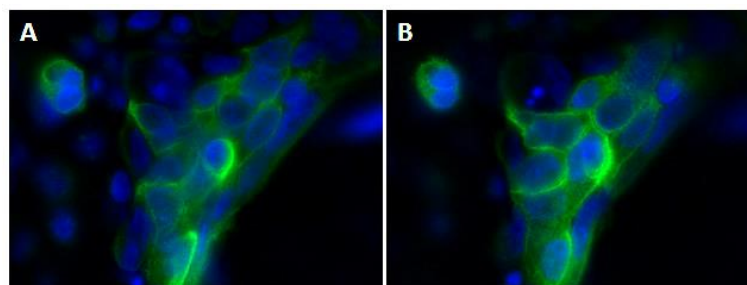
Както вече беше отбелязано, един от индукторите на герминативната линия *in vivo* е BMP4. Също така е известно от литературата, че сигналите идващи от екстраембрионалната ектодерма имат важна роля в индукцията на герминативната линия. В ембрионалното развитие екстраембрионалната ектодерма покрива стените на амниотичната кухина. Базирайки се на тези факти, ние проведохме експеримент за

насочена диференциация на монослойна култура от човешки ЕС клетки към герминативни клетки, чрез кратка индукция с BMP4 за 48 часа и култивиране в среда за амниотични стволови клетки, кондиционирана от линията hAFSC-4 (Фиг. 32А).



Фигура 32 Морфологична прилика между диференцирани към герминативни клетки ЕС клетки от линия BABE1 на 7-ми ден след кратка индукция с BMP4 за 48 часа и култивиране в среда за амниотични стволови клетки кондиционирана от линия hAFSC-4 (А) и първични култури от миши тестиси на 4-ти ден (В).

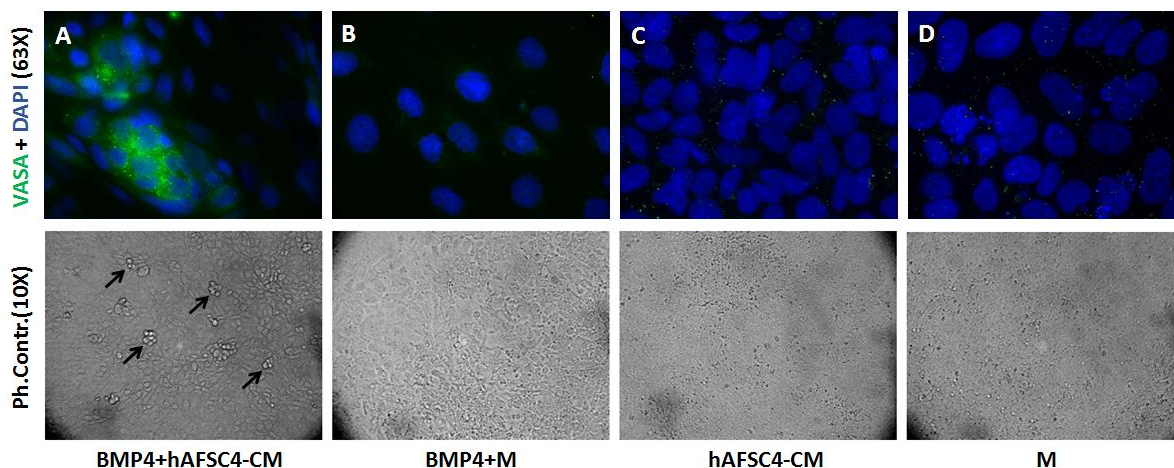
В края на първата седмица, морфологията на развиващите се култури много наподобяваше тази, наблюдавана при първични култури от миши тестиси на 4-ти ден (сравни Фиг. 32 А и В). На този етап беше проведен и имунофлуоресцентен анализ за да проверим има ли в тях популации от VASA позитивни клетки. Резултатите ясно показаха наличието на такива клетки (Фиг. 33).



Фигура 33. Имунофлуоресцентен анализ за VASA (в зелено), в герминативни клетки диференцирани от човешки ЕС клетки от линия BABE1, чрез 48-часова индукция с BMP4 и култивиране в hAFSC кондиционирана среда за амниотични стволови клетки за 7 дни. Ядрата са оцветени с DAPI (син цвят). На панели А и Б са представени изображения получени при различна дълбочина на фокуса.

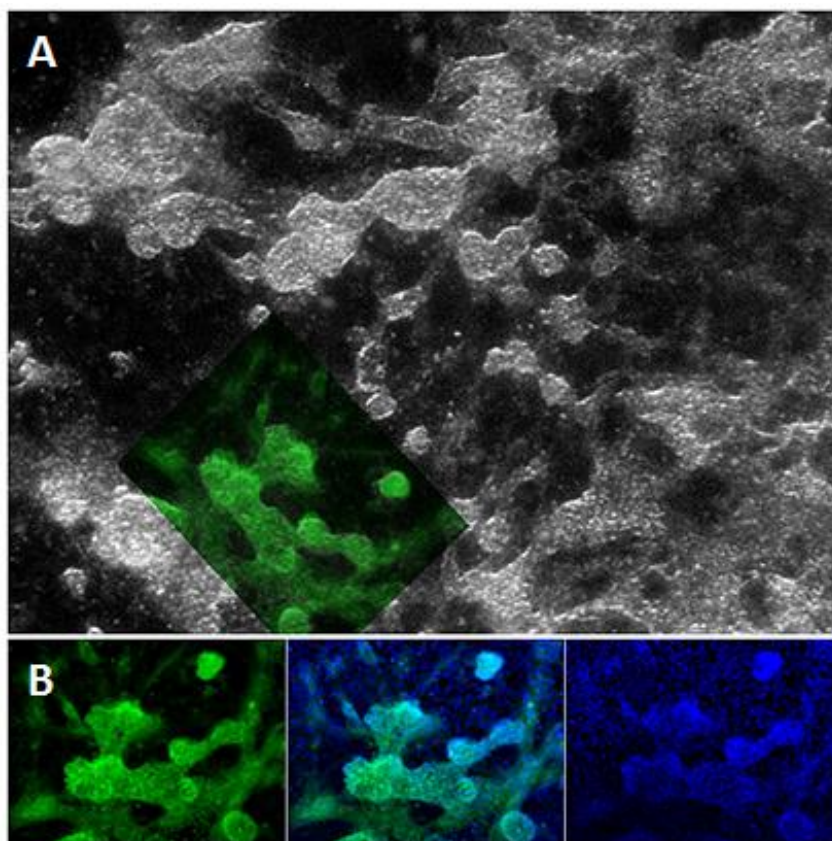
За да проверим ефекта на различните фактори в наблюдаваната диференциация ние проведохме допълнително изследване с четири различни варианта на по-горе описания експеримент, включващи различни комбинации от използваните фактори (Фиг. 34). Проведените от нас експерименти показаха, че както индукцията с BMP4, така и наличието на кондиционирана среда от амниотични стволови клетки от линия hAFSC-

4 са от решаващо значение за успешната диференциация и пролиферация на VASA позитивни ПГК. Този извод беше направен, тъй като в културите третирани само с BMP4, или само с кондиционирана среда от hAFSC4, не се наблюдаваха групи от VASA позитивни клетки.



Фигура 34. Имунофлуоресцентен анализ за VASA (зелено), експерименти за диференциация към герминативни клетки от човешки ЕС клетки от линия BABE1, чрез различни комбинации от фактори. А) 48-часова индукция с BMP4 и култивиране в hAFSC4 кондиционирана среда за амниотични стволови клетки за 7 дни. В) 48-часова индукция с BMP4 и култивиране в среда за амниотични стволови клетки без кондициониране за 7 дни. С) култивиране в hAFSC4 кондиционирана среда за амниотични стволови клетки за 7 дни. D) култивиране в среда за амниотични стволови клетки без кондициониране за 7 дни. Ядрата са оцветени с DAPI (синьо).

Съществен недостатък на някои от публикуваните съвременни протоколи за диференциране, както на човешки ЕС клетки, така и на миши ЕС клетки до герминативни клетки, е прекратяване на пролиферацията ПГК на 4-5 ден след спецификацията им. За да проверим дали това е валидно и за разработения от нас протокол, ние проведохме диференциация, като оставихме диференциращите се култури да се развият за две седмици. В края на този период отново проведохме имунофлуоресцентен анализ за установяване експресията на маркера VASA. Резултатите показаха, че малките групи от VASA позитивни клетки наблюдавани на 7-ми ден (Фиг. 32 А, Фиг. 33 и Фиг. 34) са се разрастнали в големи групи от ПГК, позитивни по този маркер (Фиг. 35), които формираха триизмерни структури нарастващи, не само на ширина, но и перпендикулярно на основата на плаките за култивиране.



Фигура 35. Имунофлуоресцентен анализ с антитела срещу Vasa (зелено) в герминативни клетки диференцирани от човешки ЕС клетки от линия BABE1, чрез 48-часова индукция с BMP-4 и култивиране в hAFSC кондиционирана среда за 14 дни. Ядрата са оцветени с DAPI (син цвят). Панел А показва панорамен светлинно-микроскопски образ и областта от културата, от която са представени имунофлуоресцентните образи на панел В.

Като цяло, резултатите от проведените експерименти по диференциация на човешки ЕС клетки от линия BABE1 към производни на герминативната линия, демонстрират потенциала на тази линия да се диференцира, както на ранни Blimp1 позитивни ПГК, така и на късни премейотични VASA позитивни ПГК. Разработеният от нас оригинален протокол за този тип диференциация предлага ефективен, икономически изгоден и сравнително бърз начин за получаване на VASA позитивни премейотични герминативни клетки от човешки ЕС клетки като поддържа пролиферацията им за минимум 14 дни след спецификация с BMP4.

ИЗВОДИ

1. От новосъздадените три линии от човешки ембрионални стволови клетки, линията VABE1 експресира всички основни маркери за плюрипотентност, има нормален XY кариотип, може да формира ембрионни тела и да се диференцира към екто-, ендо- и мезодерма, както и към герминативни клетки. Това дава основание VABE1 да бъде определена като пълноценна линия от човешки плюрипотентни ембрионални стволови клетки.
2. Разработеният от нас вариант на метода за *in situ* витрификация на адхезирали върху Laminin-521 колонии от човешки ембрионални стволови клетки в стандартни 4-ямкови плаки осигурява 3 до 5 пъти по-висока преживяемост, в сравнение с класическите методи на бавно замразяване в суспензия, както и бързо възстановяване на клетките след размразяване без спонтанна диференциация.
3. Насочена диференциация на клетките от линията VABE1 към кардиомиоцити може да бъде постигната бързо, икономично и ефективно чрез формиране на ембрионни тела и последващо третиране с кондиционирана среда от клетъчната линия НТВ-9.
4. Насочена диференциация към примордиални герминативни клетки може да бъде успешно постигната, чрез третиране на монослойни култури от линията VABE1 с коктейл от факторите BMP4, BMP7, BMP8b, GDNF и SCF.
5. Ефективна и бърза насочена диференциация на монослойни култури от линията VABE1 към VASA позитивни примордиални герминативни клетки, при това със запазена пролиферативна ативност, може да бъде предизвикана чрез разработения от нас протокол, включващ третиране с BMP4 и използване на кондиционирана среда от човешки амниотични стволови клетки.

ПРИНОСИ

1. За първи път в България е приложена успешно технологията за получаване на линии от човешки ембрионални стволови клетки.
2. Създадена е първата характеризирана българска линия от човешки ембрионални стволови клетки.
3. Разработен е оригинален метод за насочена диференциация на човешки ембрионални стволови клетки към късни премейотични VASA позитивни примордиални герминативни клетки, основан на първоначална индукция с BMP4 и последващо отглеждане в среда, кондиционирана от човешки амниотични стволови клетки.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Arabadjiev B**, Petkova R, Chakarov S, Pankov R, Zhelev N. We heart cultured hearts. A comparative review of methodologies for targeted differentiation and maintenance of cardiomyocytes derived from pluripotent and multipotent stem cells. *BioDiscovery* 2014; 14: 2; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.14.2
2. Petkova, R., **Arabadjiev, B.**, Chakarov, S., & Pankov, R. Current state of the opportunities for derivation of germ-like cells from pluripotent stem cells: are you a man, or a mouse?. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(2), 184-191, 2014.
3. **Arabadjiev B**, Petkova R, Momchilova A, Chakarov S, Pankov R. Of mice and men – differential mechanisms of maintaining the undifferentiated state in mESC and hESC. *Biodiscovery* 2012; 3: 1; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2012.3.1
4. **Arabadjiev B**, Petkova R, Nonchev S, Chakarov S, Momchilova A, Pankov R, Derivation of human embryonic stem cell line from discarded ivf morula, *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, 63 (12), 1765-1770, 2010
5. **Arabadjiev B**, Petkova R, Chakarov S, Momchilova, A and Pankov R., Do we need more human embryonic stem cell lines?, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(3),1921-1927, 2010

Конференции

1. **Borislav Arabadjiev**, Ivana Roeva, Stoyan Chakarov, Roumen Pankov, IN SITU VITRIFICATION OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS, постер, Първа национална конференция по биотехнология, 17-18 октомври, 2014, София
2. **Arabadjiev B**, Chakarov St, Momchilova A, Pankov R. BMP induced differentiation of hESC. *Младежка научна конференция „Климентови дни“*, Р60, 22-23 ноември, 2012, София, България.
3. **Арабаджиев Б.**, Петкова Р., Нончев С., Чакъров С., Момчилова А., Панков Р., Изолиране и характеризиране на две нови линии от човешки ембрионални стволови клетки, *Младежка научна конференция „Климентови дни“*, 22-23.11.2010, София

Забелязани цитирания

Arabadjiev B, Petkova R, Chakarov S, Pankov R, Zhelev N. BioDiscovery 2014; 14: 2; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.14.2

Цитирана от:

1. Lewis, Kirsty, and Kerry Falconer. "Human pluripotent stem-cell-derived cardiomyocytes in cardiovascular drug discovery and development." *BioDiscovery* 16 (2015).

Petkova, R., Arabadjiev, B., Chakarov, S., & Pankov, R. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(2), 184-191, 2014.

Цитирана от:

- Lewis, Kirsty, and Kerry Falconer. "Human pluripotent stem-cell-derived cardiomyocytes in cardiovascular drug discovery and development." *BioDiscovery* 16 (2015).

Arabadjiev B, Petkova R, Momchilova A, Chakarov S, Pankov R. *Biodiscovery* 2012; 3: 1; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2012.3.1

Цитирана от:

- Uth, Kristin, and Dimitar Trifonov. "Stem cell application for osteoarthritis in the knee joint: a minireview." *World J Stem Cells* 6.5 (2014): 629-636.
- Vazharova, Radoslava, and Ivo Kremensky. "Individual capacity for DNA repair and maintenance of genomic integrity: a fertile ground for studies in the field of assisted reproduction." *Biotechnology & Biotechnological Equipment* (2016): 1-15.
- Mellies, Nadine. From stem cells to male germ cells: Experimental approaches for the in vitro generation of mouse and human spermatogonial stem cells. Diss. Niedersächsische Staats-und Universitätsbibliothek Göttingen, 2015.
- Uth, Kristin, and Dimitar Trifonov. "Name of journal: World Journal of Stem Cells ESPS Manuscript NO: 12841 Columns: MINIREVIEWS Stem cell application for osteoarthritis in the knee joint: A minireview."
- Uth, Kristin, and Roger Sleight. "Deregulation of the circadian clock constitutes a significant factor in tumorigenesis: a clockwork cancer. Part I: clocks and clocking machinery." *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 28.2 (2014): 176-183.
- Lewis, Kirsty, and Kerry Falconer. "Human pluripotent stem-cell-derived cardiomyocytes in cardiovascular drug discovery and development." *BioDiscovery* 16 (2015).

Arabadjiev B, Petkova R, Chakarov S, Momchilova, A and Pankov R., *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(3),1921-1927, 2010

Цитирана от:

- Abbasalizadeh, Saeed, and Hossein Baharvand. "Technological progress and challenges towards cGMP manufacturing of human pluripotent stem cells based therapeutic products for allogeneic and autologous cell therapies." *Biotechnology advances* 31.8 (2013): 1600-1623.
- Zimmermann, Anna, et al. "Haplotype-based banking of human pluripotent stem cells for transplantation: potential and limitations." *Stem cells and development* 21.13 (2012): 2364-2373.
- Brown, Mark. "No ethical bypass of moral status in stem cell research." *Bioethics* 27.1 (2013): 12-19.
- Fisher, Melanie C., et al. "The potential of human embryonic stem cells for articular cartilage repair and osteoarthritis treatment." *Rheumatology: Current Research* 2012 (2013).

13. Crocco, Melisa Candela, Nilo Fratz, and Adriana Bos-Mikich. "Substrates and supplements for hESCs: a critical review." *Journal of assisted reproduction and genetics* 30.3 (2013): 315-323.
14. Bridge, Sophie. "Induced Pluripotent Stem Cells: An Alternative to Embryonic Stem Cells?." *Asian Bioethics Review* 5.1 (2013): 25-39.
15. Devaney, Sarah. *Stem cell research and the collaborative regulation of innovation*. Routledge, 2013. ISBN 1136014403
16. Lewis, Kirsty, and Kerry Falconer. "Human pluripotent stem-cell-derived cardiomyocytes in cardiovascular drug discovery and development." *BioDiscovery* 16 (2015).