



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

Биологически факултет

**доц., д-р Пламен Тодоров Тодоров**

Криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и  
фрагменти

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертация за присъждане на научната степен „доктор на науките“**

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

София

2017г.

Дисертационният труд съдържа 159 страници, онагледен е с 47 фигури и 7 таблици. Цитирани са 293 литературни източника, от които 281 на латиница и 12 на кирилица.

Изследванията по дисертационния труд са проведени на базата на ИБИР-БАН, ИМ-БАН, НЦЗПБ и Университета на г. Кьолн.

Научно жури:

Вътрешни членове:

Чл. кор., проф. Румен Панков

Проф. Христо Гагов

Външни членове:

Проф. Филип Куманов

Проф. Бойчо Биволарски

Проф. Виктор Златков

Проф. Сорен Хайрабедян

Проф. Атанас Щерев

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на ..... от ..... часа в заседателната зала Биологическия факултет към СУ „Климент Охридски“

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



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

Биологически факултет

**доц., д-р Пламен Тодоров Тодоров**

Криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и  
фрагменти

### **АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертация за присъждане на научната степен „доктор на науките“**

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

София

2017г.

## **Използвани съкращения**

AMX (AMH) – антимюлеров хормон (Anti-Mullerian Hormone)

Г (Gly) – глицерин (Glycerol)

ГнРХ (GnRH) – гонадотропен релизинг хормон (Gonadotropin Releasing Hormone)

ДДХ-4 (DDX-4) – DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4

ДМСО (DMSO) – диметилсулфоксид (Dimethyl sulfoxide)

ЕСК (ESCs) – ембрионални стволови клетки (Embryonic Stem Cells)

ЕГ (EG) – етиленгликол (Ethylene glycol)

ЕМА – епителен мембранен антиген (Epithelial Membrane Antigen)

ЛХ (LH) – лутеинизиращ хормон (Luteinizing hormone)

МСК (MSCs) – мезенхимни стволови клетки (Mesenchymal Stem Cells)

МГГ (MGG) – Май-Грюнвалд Гимза (May-Grünwald-Giemsa staining)

ПВП (PVP) – поливинилпиролidon (Polivinilpirrolidone)

ПГ (PG) – пропиленгликол (Propylene glycol)

ПГК (PGCs) – примордиални полови клетки (Primordial Germ Cells)

ФСХ (FSH) – фоликулостимулиращ хормон (Follicle Stimulating Hormone)

ХЕ (H&E) – хематоксилин-еозин (Hematoxylin and eosin staining)

чХГ (hCG) – човешки хорионгонадотропен хормон (Human Chorionic Gonadotropin)

ВМР-4 – Bone Morphogenetic Protein-4

BSA - Bovine serum albumin

EGF – епидермален растежен фактор (Epidermal Growth Factor)

ZP – зона пелуцида (Zona Pellucida)

IGFs – инсулиноподобни растежни фактори (Insulin-like Growth Factors)

IGFBPs – протеини, свързващи инсулиноподобните растежни фактори (Insulin-like growth factor-binding proteins)

ICSI – интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоид (intracytoplasmic sperm injection)

IVF – ин-витро оплождане (in vitro fertilization)

HES (ХЕС) – хидроксиетилнишесте (Hydroxyethyl starch)

HSA – човешки серумен албумин (Human serum albumin)

Oct3/4 – Октамер-свързан транскрипционен фактор (Octamer-binding transcription factor 3/4)

PBS – фосфатно-буферен разтвор (Phosphate buffered saline)

PE – фикоеритрин (Phycocerythrin)

PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1)

PerCP – перидинин хлорофил протеин (Peridinin-Chlorophyll-protein)

PI – пропидиев йодид (Propidium Iodide)

PCNA – ядрен антиген на пролифериращите клетки (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

ROS – свободни кислородни радикали (Reactive Oxygen Species)

SCID – имунодефицит (Severe combined immunodeficiency)

CM – криопротективен медиум (Cryoprotective medium)

Sox-2 – транскрипционен фактор, свързан с регулацията на ембрионалното развитие

SSEA – стадий-специфичен ембрионален антиген (Stage specific embryonic antigen)

TBS – трис-буфериран разтвор (Tris-buffered saline)

TGF – трансформиращ растежен фактор (Transforming Growth Factor)

FGF – фибробластен растежен фактор (Fibroblast Growth Factor)

FBS – фетален говежди серум (Fetal Bovine Serum)

FITC – флуоресцин изотиоцианат (Fluorescein isothiocyanate)

## ВЪВЕДЕНИЕ

Раковите заболявания са на второ място в световен мащаб като причина за смъртност след сърдечносъдовите. Благодарение на съвременните комплексни методи на лечение, преживяемостта на онкоболните постоянно се увеличава, като в голяма част от случаите се постига и пълно оздравяване. Така например, петгодишната преживяемост при пациенти с хематологични заболявания, карцином на млечната жлеза и др. често надвишава 90%. Това поставя на дневен ред въпроса за качеството на живот на вече излекуваните пациенти, респективно възможността им да имат деца. Известно е, че в много случаи химио-/лъчетерапията води до увреждане на гонадалните функции – оогенезата и сперматогенезата. Затова е редно преди започване на противотуморната терапия на болните да бъдат предложени опции за запазване на фертилитета (*fertility preservation*). При мъжете е рутинна практика семенната течност да бъде замразявана с цел бъдещо използване, като методът намира широко приложение. По-сложна е ситуацията при пациентите от женски пол. При тях съществуват различни подходи (подбор на щадящи гонадите химиотерапевтици, транспозиция на яйчиците, криоконсервация на репродуктивни клетки и тъкани). Стратегията при всеки пациент е индивидуализирана и зависи от:

- Възраст на пациентката;
- Вид и стадий на развитие на злокачественото заболяване;
- Терапевтичен план, който ще се следва;
- Очаквани дълготрайни ефекти от лечението;
- Възможност или невъзможност да се отложи старта на лечението;
- Наличие на партньор/съпруг;
- Биология на тумора и потенциалният риск от метастази в яйчника и др.

Друга категория пациенти, нуждаещи се от запазване на фертилитета са тези с автоимунни заболявания. Тази група обхваща над 50 орган-специфични и системни болести, началната изява на много от които е в репродуктивна възраст. При лечението им се прилагат имunosупресивни, цитотоксични и противовъзпалителни лекарствени средства, някои от които имат гонадотоксичен ефект и могат да доведат до преждевременна овариална недостатъчност. Съвременните тенденции за отлагане на

майчинството за по-късна възраст увеличават дела на пациентите, които все още не са реализирали репродуктивните си шансове към момента на поставянето на диагноза, налагаща гонадотоксична терапия. Налице са данни, че опасността от загуба на фертилността им причинява значителен психологически стрес, и може да повлияе на решението им за избор на основна терапия. Затова следва те да бъдат уведомявани коректно за рисковете за репродуктивното им здраве и да им бъде предложена подходяща стратегия за запазване на фертилитета.

В голяма част от случаите на пациентите се предлага замразяване и съхранение на гамети или ембриони. Технологиата е добре отработена и се използва в клиниките за асистирана репродукция. При определени групи – малки момичета (преди пубертета), онкоболни, при които хормоналната стимулация е противопоказана и др., криоконсервацията на ооцити и ембриони е неподходяща и при тях единственият избор за фертилно застраховане е замразяването на овариална тъкан. Това е сравнително нов метод, който, макар и все още да се води експериментален, вече намира своето приложение в развитите страни. Към момента в световен мащаб са родени над 100 деца след криоконсервация и трансплантация на яйчникова тъкан. За съжаление, успеваемостта на процедурата е ниска. Има редици неизяснени въпроси, касаещи запазването на функциите на овариалните клетки в процеса на замразяване, както и подходите за оптимизиране на процедурите. Все още няма разработена технология за криоконсервация на цял яйчник (*Paulini F. et al, 2016*). Всичко това налага по-нататъшни задълбочени изследвания в областта на криоконсервацията на овариални клетки и фрагменти.

## **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

**ЦЕЛ** на настоящия дисертационен труд бе провеждането на криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и фрагменти с оглед оптимизиране на технологията за криоконсервация на овариална тъкан

Реализирането на така поставената цел предполагаше изпълнението на следните **ЗАДАЧИ**:

**1. Изследвания върху човешки овариални клетки (смесена култура) и човешки гранулозни клетки, култивирани ин-витро:**

- Пролиферация и особености на растежа на културата;
- Морфологичен статус на клетките при дълготрайно култивиране;
- Ароматазна активност, базална и стимулирана секреция на полови хормони;
- Функционална активност (способност да модифицират културалната среда) – влияние на ко-култивирането с овариални клетки върху мъжки гамети и предимплантационни ембриони;
- Експресия на маркери за плурипотентност от човешки овариални клетки и фактори, влияещи върху нивата на тази експресия

**2. Криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки:**

- Токсично действие на проникващи криопротектори върху овариалните и гранулозните клетки;
- Сравнителни изследвания върху методи за замразяване на овариални клетки

**3. Оптимизиране на методите за ин-витро култивиране на овариални фрагменти и изолирани фоликули:**

- Изучаване на процесите, протичащи при *ин-витро* култивиране на овариални фрагменти и изолирани фоликули в 2D и 3D-условия;
- Култивиране на овариална тъкан в условията на микровибрации;
- Ко-култивиране на фоликули с овариални клетки и меземхимни стволови клетки;



**4. Криобиологични изследвания върху човешка овариална тъкан:**

- Сравнителни изследвания върху методи за криоконсервация на овариална тъкан (програмно замразяване и витрификация);
- Влияние на периода на преинкубация на тъканта преди замразяване върху ефективността на процеса на криоконсервация;
- Влияние на наличието на медула в замразяваните фрагменти върху показателите на овариалната тъкан след размразяване и ксенотрансплантация

**5. Ксенотрансплантация и автоложна трансплантация на човешка овариална тъкан след криоконсервация**

## **МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

Изследванията бяха извършени през периода 1996-2016г. на базата на ИБИР – БАН, Института по микробиология – БАН и Университета в г.Кьолн, Германия. Използвахме овариални клетки и фрагменти от жени, участващи в програмите за *in-vitro* оплождане в Медицински център Димитров или подложени на планови операции на яйчниците. Получаването на експерименталния материал ставаше с разрешение на комитета по медицинска етика и информирано съгласие от страна на пациентите.

### **Бяха използвани методи за:**

Получаване на човешка яйчникова тъкан и на овариални (смесена култура) и гранулозни клетки

Култивиране на овариални клетки, изолирани фоликули и тъканни фрагменти

Получаване, характеризиране, култивиране и диференциация на човешки мезенхимни стволови клетки

Получаване на гамети, оценка и подготовка за оплождане

Получаване и култивиране на човешки предимплантационни ембриони *in-vitro*

Ко-култивиране на гамети, ембриони и овариални фоликули със соматични клетки

Криоконсервация на клетки и тъканни фрагменти (конвенционално замразяване, програмно замразяване и витрификация)

Имунофлуоресцентен анализ

Морфологични изследвания

Проточна цитометрия (имунофенотипизиране, изследване на апоптоза, изследване на маркери за плурипотентност)

Радиоимунологичен анализ (изследване на базална и стимулирана секреция на естрадиол и прогестерон и ароматазна активност)

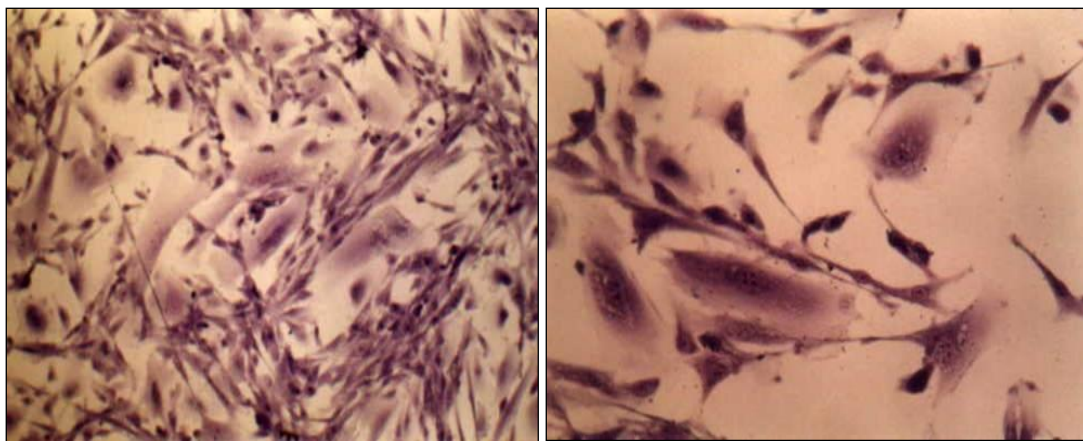
Ксенотрансплантация на човешка овариална тъкан на имунодефицитни мишки

Автоложна трансплантация на човешка овариална тъкан

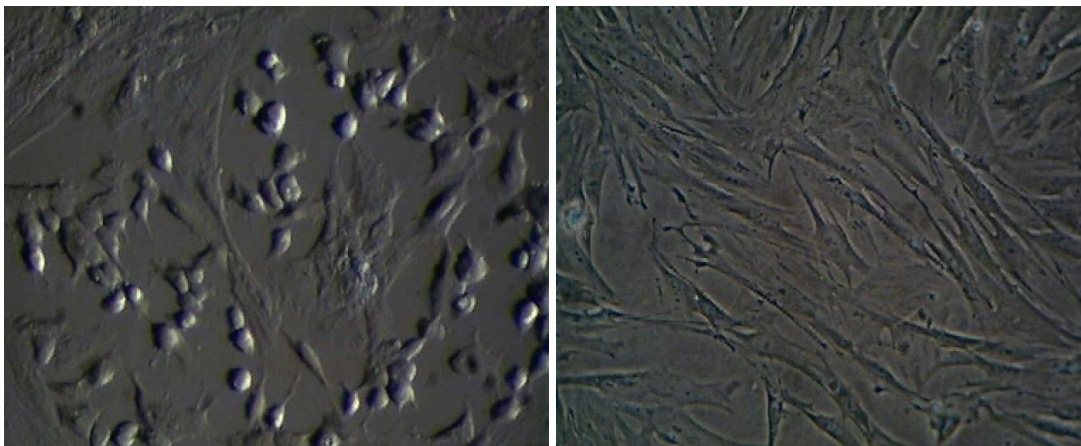
## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### Изследвания върху овариални клетки

Проведени бяха изследвания върху човешки овариални (смесена култура) и гранулозни клетки. В рамките на сравнителни експерименти бе установено, че клетките могат успешно да бъдат култивирани в хранителна среда DMEM/F-12, обогатена с 10% FBS и 0,75ME/мл ФСХ/ЛХ. Клетките се отличават с умерена пролиферативна активност. Едно денонощие след посяването им се наблюдава прикрепване към дъното на плаките. В повечето случаи клетките растат на колонии, по-рядко се наблюдават единични. Конфлуентен монослой се регистрира след около 12-14 дни. Прави впечатление фактът, че след трипсинизация плътен монослой се образува по-рано – около 8-10-ия ден от култивирането. И при двата вида клетъчни култури (смесена от овариални клетки и чисти гранулозни клетки) се наблюдава хетерогенност в морфологията им – присъстват както такива с епителоидна, така и с фибробластоподобна форма (Фиг.1, Фиг.2). В първичните култури има клетки със силно гранулирана цитоплазма, дължаща се вероятно на повишената им секреторна активност. При култивиране за по дълъг период от време се установява тенденция към дедиференциация на клетките, свързана с придобиване на фибробластоподобна форма. Микроскопски се виждат полигонални клетки с високо ядрено-цитоплазмено съотношение, с по два - три и повече цитоплазмени израстъци. Клетъчните ядра са относително големи, овални и с фино диспергиран хроматин, с по една до три нуклеоли.

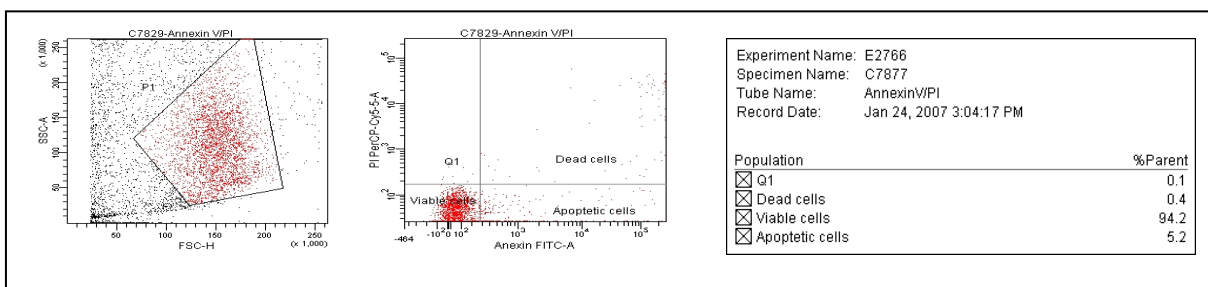


Фиг.1 Човешки овариални клетки (смесена култура). Оцветяване с ХЕ



Фиг.2 Човешки гранулозни клетки. Фазово-контрастна микроскопия (200x).

Клетките се отличават с добър виталитет. На Фиг.3 са представени резултатите от флоуцитометричния анализ след трипсинизация на овариални клетки, показващи относително ниски нива на апоптоза, което е свидетелство за стабилност на клетъчната култура.

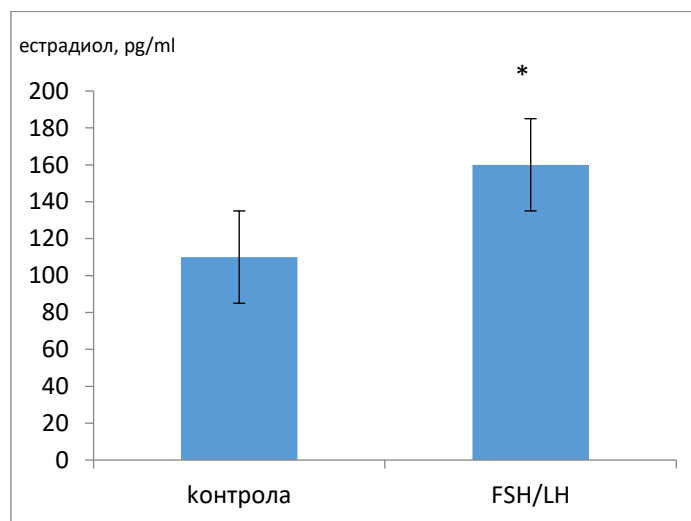


Фиг.3 Виталитет на човешки овариални клетки (флоуцитометричен анализ с *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I*)

**Базална и стимулирана секреция на естрадиол и прогестерон от овариалните клетки при култивиране ин-витро**

Една от основните функции на овариалната тъкан е продукцията на стероидни хормони, които участват в регулацията на женския полов цикъл. За оценка на функционалния капацитет на клетките извършихме измерване на секрецията на естрадиол и прогестерон. Известно е, че овариалните клетки притежават рецептори за

гонадотропните хормони на хипофизата и секретирането на естрогени зависи от действието на тези хормони. ФСХ има значение за развитието на фоликулите, чиито клетки продуцират естрадиол. В същото време присъствието на ФСХ и естрадиол във фоликула по време на фоликуларната фаза предизвикват съзряване на гранулозните клетки и появата в тях на рецептори за ЛХ, които обезпечават продукцията на прогестерон. В програмите за асистирана репродукция яйчниците се третират допълнително с хормонални препарати с цел съзряване на повече фоликули и получаване на повече яйцеклетки (хормонална стимулация). За нас беше важно да установим до колко реагират на стимулация овариалните клетки при *in-vitro* условия. За тази цел към средата за култивиране в опитните групи добавихме гонадотропни хормони 75U/ml. Като източник на ФСХ/ЛХ използвахме препаратът *Humegon (Organon)*. Активната съставка, получена от урината на жени, преминали критичната възраст, е стандартизирана с човешки хорионгонадотропин (чХГ) за постигане на съотношение между ФСХ и ЛХ приблизително 1:1. Установено бе, че при култивиране *in-vitro* клетките запазват не само базалната си, а и стимулираната продукция на естрадиол (фиг.4). Не наблюдавахме достоверна разлика в секрецията на прогестерон след добавяне на препаратите.



Фиг.4 Базална и стимулирана секреция на естрадиол от овариални клетки, култивирани *in-vitro* (\* $p < 0.05$  в сравнение с контролата)

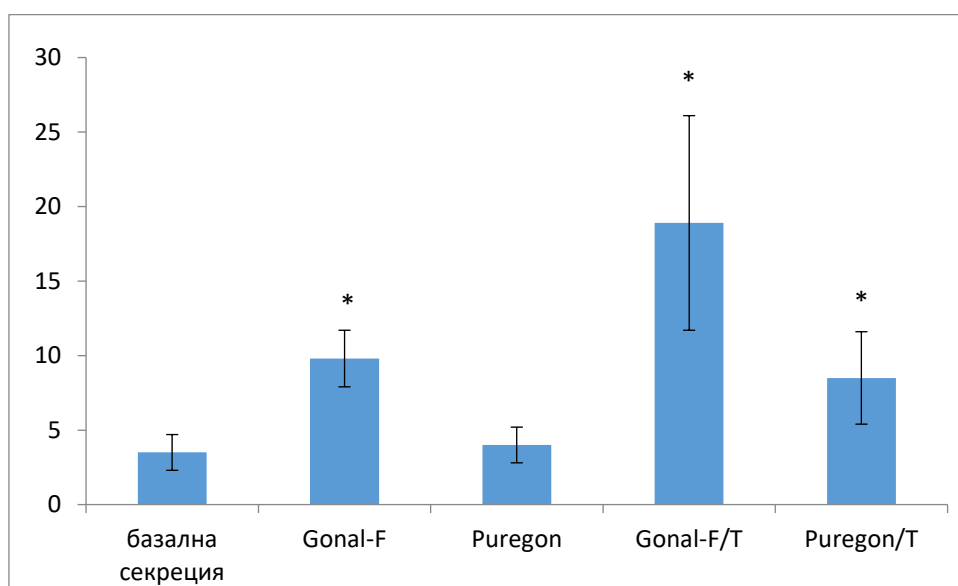
### ***Ароматазна активност на овариалните клетки (смесена култура) при култивиране *инвитро****

Предшественик за синтезата на стероидни хормони в яйчника е холестеролът, който може да се образува в клетките на жлезата или се транспортира от други тъкани. Той се явява субстрат за синтезата на прегненолона, който се превръща последователно в прогестерон, андрогени и естрогени. Най-същественят момент от образуването на естрогени е ароматизиране молекулата на тестостерона. За нас беше интересно да установим доколко овариалните клетки ароматизират тестостерона в *ин-витро* условия. За тази цел добавихме към средата за култивиране чист тестостеронов препарат в концентрация  $10^{-7}$ М. Измерихме базалната и стимулираната секреция на естрадиол и от получените резултати установихме, че и в двата случая тя се повишава. Интерес представлява факта, че след култивиране на овариалните клетки в среда, съдържаща тестостерон, наблюдавахме промени в морфологията на ядрата на клетките. Нямаме обяснение на този феномен и не открихме подобни данни в литературата, но той определено представлява интерес и ще бъде обект на бъдещи наши изследвания.

### ***Изследване на базална и стимулирана секреция на $17\beta$ -естрадиол от човешки гранулозни клетки култивирани *in vitro*:***

За изследване на базалната и стимулираната секреция на  $17\beta$ -естрадиол, проведохме експерименти с култура от човешки гранулозни клетки. След достигане на 50-60% конfluентност на монослоя, към произволно избрани ямки бяха добавяни препаратите *Gonal-F* или *Puregon* (човешки рекомбинантен ФСХ), в концентрация 0,75 UI/ml. В някои от ямките към средата за култивиране бе добавян и  $10^{-7}$  М свръхпречистен тестостерон, с цел изследване на способността на овариалните клетки да използват андрогени като прекурсор на  $17\beta$ -естрадиол. След 24 часа клетките бяха промивани и култивирани в безсерумна среда за следващите 18 часа. Количеството на съдържащия се в средата естрадиол бе определяно чрез директен радиоимунологичен анализ. Установено бе, че при самостоятелното добавяне на *Gonal-F* и *Puregon* се предизвиква повишен синтез на естрогени, отколкото при клетки, инкубирани само в хранителна среда. Двата рекомбинантни гонадотропина се различават по това, че *Gonal-F* съдържа  $\alpha$ -субединицата на ФСХ, а *Puregon* -  $\beta$ -субединицата. Базалната секреция на естрадиол,

измерена при клетки, култивирани само в хранителна среда бе  $3,5 \pm 1,2$  pg/ml. При тези, инкубирани за 24 часа с *Gonal-F* се наблюдава достоверно по-високо ( $p < 0,05$ ) ниво на естрадиол –  $9,8 \pm 1,9$  pg/ml. При добавяне на *Puregon* средната стойност на концентрацията на естрадиол бе  $4,0 \pm 1,2$  pg/ml и не се различава достоверно от тази, измерена в супернатантите на клетки, култивирани само в хранителна среда. След добавяне на тестостерон към средата за култивиране се наблюдава увеличение на естрадиоловата секреция ( $18,9 \pm 7,2$  pg/ml;  $p < 0,01$  за *Gonal-F* и  $8,5 \pm 3,1$  pg/ml;  $p < 0,05$  за *Puregon*). Не се отчита значително различие по отношение на процентното увеличение спрямо стойностите, получени при инкубиране без присъствието му (192% за *Gonal-F* и 221% за *Puregon*). Отчетохме по-висока секреция на  $17\beta$ -естрадиол при добавяне на *Gonal-F* към средата за култивиране (Фиг.5). Добавянето на препарат, съдържащ комбинация ФСХ/ЛХ 1:1 (*Merional*), също води до увеличаване на естрадиоловата секреция



Фиг.5 Ефект на *Gonal-F* и *Puregon*, в присъствието и отсъствието на тестостерон върху секрецията на естрадиол (pg/ml) от човешки гранулозни клетки, култивирани *in-vitro* (\* $p < 0,01$  спрямо базалната секреция)

## Ко-култивиране на човешки овариални клетки със сперматозоиди и предимплантационни ембриони

При култивиране клетките модифицират подхранващата среда. Това тяхно свойство се използва в практиката при разработването на различни системи за ко-култивиране. Най-широко приложение към момента е намерило съвместното инкубиране на предимплантационни ембриони със соматични клетки. Установено е, че ко-култивирането с овидуктални и ендометриални клетки имитира естествените условия и спомага за преодоляване „блока на дробене”, който се наблюдава на стадий 2-4 бластомера. Има данни, че в този случай по-голям процент от ембрионите достигат до стадий бластоцист, което подобрява успеваемостта на програмите за асистирана репродукция. Предполагат се няколко възможни механизма на действие на хелперните клетки:

- детоксикация на средите за култивиране, например чрез хелация на йоните на тежките метали;
- редукция на нивото на детрименталните субстанции (глюкоза, хипоксантин, никотинамид и др.) в медиума;
- секреция на вещества, стимулиращи развитието на ембрионите (ембриотрофични субстанции, растежни фактори);
- стабилизация на физико-химичните показатели (рН,  $O_2/CO_2$  –концентрация и др.);
- комбинация от няколко от тези механизми (Тодоров П., 1998).

Положителен ефект от ко-култивирането е наблюдаван и при други биологични обекти – ооцити (Kano K. et al., 1994), сперматозоиди (Ballie H.S. et al., 1996) и др. Използването на фидерен слой е често срещан метод при култивирането на ембрионални стволови клетки (Guidelines for Embryonic Stem Cells, 2005). Предполага се, че той секретира в средата все още неидентифицирани напълно растежни фактори (напр. LIF-*leukemia inhibitory factor*, bFGF-*basic fibroblast growth factor*), които подпомагат митотичната активност на ЕСК и задържат тяхната диференциация. В повечето случаи за фидерен слой служат инактивирани миши фетални фибробласти. Като недостатък на метода се отчита животинският им произход. Поради тази причина все повече



изследователи се ориентират към използване на човешки клетки за монослой - плацентарни фибробласти, утеринни ендометриални клетки, паренхимни клетки от млечна жлеза, фетални фибробласти (от абортен материал), мезенхимни клетки от костен мозък и др. Системите за ко-култивиране често се прилагат и като тест за биологичните свойства на клетките. В това отношение удачен модел е съвместното инкубиране на изследваните клетки със сперматозоиди.

Изследвахме влиянието на свежи и замразени човешки овариални клетки върху мъжки гамети в система за ко-култивиране. Те бяха инкубирани съвместно с предварително изолирана фракция подвижни човешки сперматозоиди. При избора на метод за сепарация на гаметите се изхождаше от показателите, получени при предварителната оценка на еякулатите. В случаите на нормоспермия (n=34) бе използван *swim-up* метод за сепариране на подвижната фракция сперматозоиди. При влошена подвижност (n=19), наличие на патологични изменения в гаметите, повишено количество на левкоцити или други клетъчни елементи бе използван метод за разделяне чрез центрофугиране през градиенти (*SupraSperm System, Medicult*), който осигурява фракция, съдържаща морфологично нормални и подвижни гамети. Установено бе, че ко-култивирането подобрява биологичната преживяемост на сепарираните сперматозоиди. При нормоспермични еякулати след 1<sup>ия</sup> час инкубация се наблюдава увеличение на общата им подвижност и в опитната, и контролната проба (табл.1). Това може да се обясни с хиперактивацията на гаметите, която е най-силно изразена до около 3<sup>ия</sup> час и се дължи на наличието на белтъчни молекули в средата за култивиране. През този период не се наблюдава разлика между двете групи. На шестия час се наблюдава тенденция към по-добро запазване на мотилитета на гаметите, ко-култивирани с овариални клетки. Статистически достоверни разлики в подвижността са регистрирани след 12<sup>ия</sup> час инкубиране. В контролната група сперматозоидите запазват мотилитета си след 72 часа (до около 80<sup>ия</sup>), докато в опитната на 108<sup>ия</sup> час се наблюдават единични подвижни гамети. При ко-култивирането на сперматозоиди от пациенти с астенозооспермия отново се наблюдава статистически достоверна разлика между двете изследвани групи след 12 часа (табл.2). В контролната група те запазват мотилитета си не повече от 48 часа, докато при ко-култивиране подвижни гамети се регистрират до 84<sup>ия</sup> час. Вероятното обяснение за

този ефект на овариалните клетки е, че те модифицират средата, като секретират растежни фактори, биологично активни молекули и др., които влияят позитивно върху преживяемостта и подвижността им.

Час	Подвижност [%]										
	0	1	3	6	12	24	36	48	72	96	108
Ко-култивиране	87.9	89.4	89.0	85.7	83.9*	80.4**	65.1***	58.7***	40***	12.3***	единични
Контрола	87.9	89.3	88.1	73.1	58.0	45.1	28.4	12.0	единични	0	0

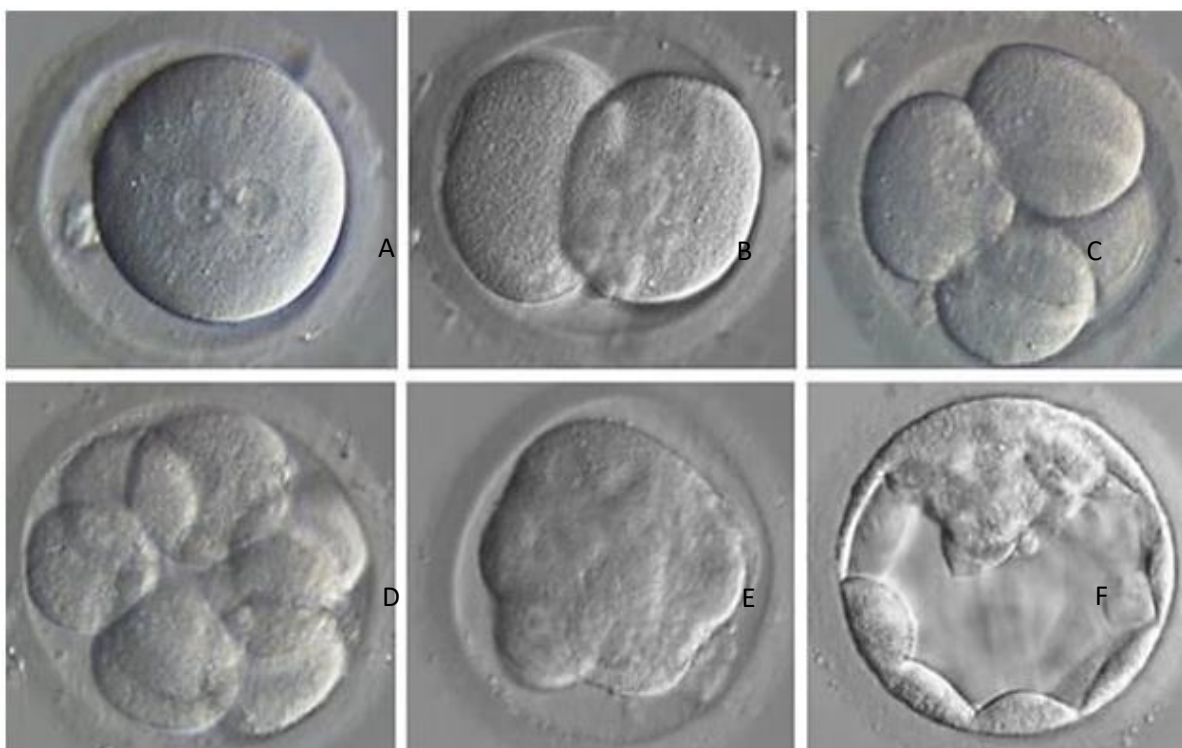
Табл.1. Ко-култивиране на сперматозоиди от нормоспермични еякулати с човешки овариални клетки (\*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  – в сравнение с контролата).

Час	Подвижност [%]									
	0	1	3	6	12	24	36	48	72	96
Ко-култивиране	74.0	75.1	73.0	70.2	60.8*	47.5**	35.2***	14.8***	5.9***	0
Контрола	74.0	73.9	71.4	64.1	46.6	30.0	10.2	единични	0	0

Табл.2. Ко-култивиране на сперматозоиди от пациенти с астенозооспермия с човешки овариални клетки (\*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  – в сравнение с контролата).

Положителен ефект наблюдавахме и при съвместното инкубиране на предимплантационни ембриони с овариални клетки. При разработване на лабораторните техники за инвитро оплождане системите за ко-култивиране са се използвали за оптимизиране на условията и подобряване качеството на получените ембриони. Понастоящем на пазара се предлагат широка гама специално разработени среди за матурация на ооцитите, оплождане и развитие на предимплантационните ембриони до стадий бластоцист, без да се налага съвместното им инкубиране със соматични клетки. На Фиг.6 са представени различните стадии от развитието на предимплантационен ембрион (1-5 ден култивиране).

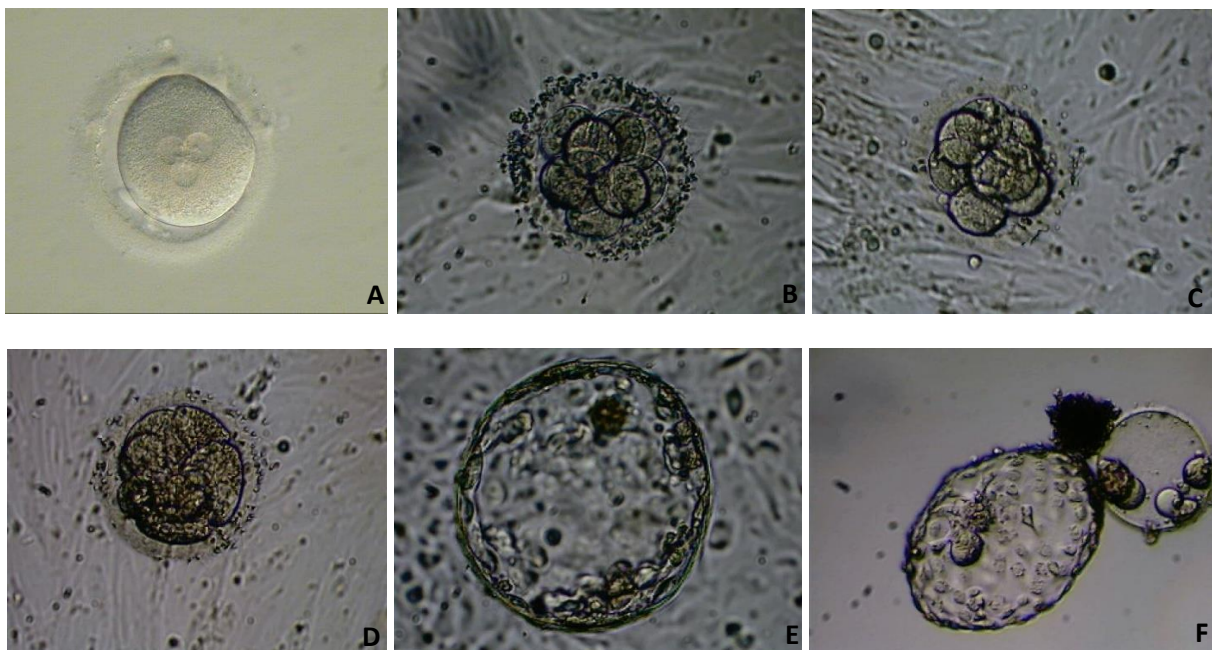
В нашите изследвания използвахме ко-култивирането не с цел подобряване качеството на ембрионите, а като тест в каква степен клетъчната култура модифицира средата и как това се отразява на развитието им. Използвахме неподлежащи на трансфер или криоконсервация ембриони (с три или повече пронуклеуса), получени при класическо *in-vitro* оплождане или ICSI от пациенти, участващи в програмата за асистирана репродукция в Инвитро АГ медицински център „Димитров“ след получаване на информирано съгласие и в съответствие с действащото законодателство (*Наредба номер 11 от 17 ноември 2011г.*).



Фиг.6 Стадии на развитие на човешки предимплантационни ембриони (зиготи) при култивиране инвитро (*Magli C.M. et al, 2012*)

- A) Пронуклеарен стадий (16-20 часа след оплождане). Виждат се два пронуклеуса и две полярни телца
- B) 2-ри ден култивиране (денят на оплождане се брои ден-0) – стадий 2 бластомера

- C) 2-ри ден култивиране – стадий 5 бластомера (деленето е асинхронно, не винаги броят на бластомерите да е четно число)
- D) 3-ти ден култивиране – 8-10 бластомера
- E) 4-ти ден – стадий компактна морула
- F) 5-ти ден – стадий бластоцист



Фиг.7 Човешки предимплантационни ембриони, получени инвитро и култивирани върху монослой овариални клетки (оригинални фотографии)

- A) Зигота с три пронуклеуса (20 часа след оплождане чрез ICSI)
- B) Ембрион, получен чрез конвенционално оплождане (IVF), трети ден
- C) Ембрион, получен чрез ICSI, трети ден след оплождане
- D) Морула, 4-ти ден култивиране
- E) Експандирал бластоцист (5-ти ден)
- F) Хетчинг (ембрионът е излязъл от «зона пелуцида»), 6-ти ден култивиране

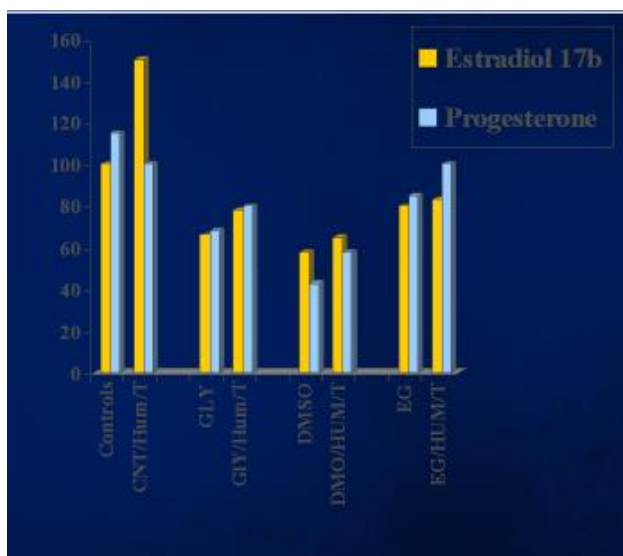
От деня след оплождането зиготите от опитната група бяха култивирани върху предварително подготвен монослой овариални клетки, като ежедневно бе отчитана морфологията и развитието им до бластоцисти. В много случаи в *ин-витро* условия ембрионите забавят или даже преустановяват развитието си на ранен стадий, наблюдава

се така наречения «блок на дробенето». Той е характерен за всички бозайници, но при различните видове се среща на различни етапи. При човешки зиготи, получени и култивирани инвитро той се наблюдава на стадий 4 бластомера (Tesarik J., 1989). Механизмите, контролиращи генната експресия през този период на ембрионалното развитие са слабо проучени, но е установено, че ко-култивирането с някои видове клетки и тъкани спомагат за преодоляване на „блока на дробене“. Този факт бе потвърден и в нашите експерименти. В опитната група значително по-висок процент ембриони продължаваха развитието си до по-късен стадий в сравнение с контролната (62 vs 43%). Ембрионите, култивирани съвместно с овариални клетки, достигаха до бластоцисти средно с 11 часа по-рано от контролните (Фиг.7). Това ни дава основание да предположим, че овариалните клетки модифицират средата за култивиране и оказват положителен ефект върху тях, което е признак за функционалната им активност в инвитро условия. При анализа на представените данни следва да се има предвид, че използвахме зиготи с влошено качество (ЗРН). При нормално оплодените яйцеклетки, използвани за трансфер или замразяване, значително по-висок процент достигат в развитието си до стадий бластоцист – експандирал бластоцист.

#### **Изследване на токсичното действие на различни криопротектори върху овариалните клетки (смесена култура)**

Криопротекторите защитават клетките и техните мембрани от увреждания в процеса на замразяване. Действието им се изразява основно в това, че формират водородни връзки с течната фаза на клетката и ги предпазват от дехидратация. Понижават скоростта на образуване на ледени кристали, които механично увреждат клетките, също така смекчават и неблагоприятния ефект на другите фактори. Въпреки, че имат защитно действие, много от криопротекторите са токсични за клетките. Проучихме токсичността на някои криопротектори, които се използват често в репродуктивната медицина (глицерол (Gly), диметилсулфоксид (DMSO) и етиленгликол (EG) върху овариалните клетки. За целта ги култивирахме за 30 минути в среда, съдържаща 1,5 М концентрация на изпитваните вещества, след което заменяхме средата с такава за култивиране. Изследвахме различни показатели на овариалните клетки (пролиферация, базална и стимулирана секреция, ароматизиране на тестостерона).

И при трите вида криопротектори в използваната от нас концентрация не наблюдавахме подтискане на пролиферацията на клетките. След няколко дни се образува плътен монослой. Резултатите, които получихме при измерване на базалната и стимулирана секреция на естрадиол и прогестерон, показаха, че криопротекторите въздействат върху секреторната активност на овариалните клетки. Най-добро запазване на секрецията бе регистрирано при групата, която беше третирана с етиленгликол (фиг.8). Подобни данни получихме и при ароматизиране на тестостерона, като отново най-ниска токсичност бе отчетена при инкубиране с етиленгликол.



Фиг.8. Влияние на различни криопротектори върху базалната и стимулирана секреция на естрадиол и тестостерон от човешки овариални клетки при култивиране *in-vitro*.

*Controls (CNT)* – контролни, нетретирани проби

*Hum* – *Humegon (Organon)* – човешки уринарен гонадотропен препарат, съдържащ фоликулостимулиращ и лутеинизиращ хормон в съотношение 1:1

*T* – тестостерон

*GLY* – глицерин (глицерол)

*DMSO* – диметилсулфоксид

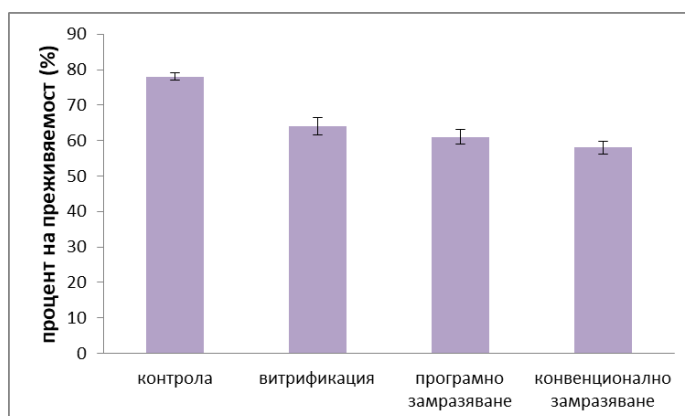
*EG* – етиленгликол

Тези резултати се съгласуват с други автори, които при сравнителни изследвания върху репродуктивни клетки (ооцити, ембриони, сперма) установяват, че етиленгликола има най-ниска токсичност. Същевременно EG добре запазва клетките в процеса на замразяване. Това ни дава основание да го предложим като подходящ протектор за криоконсервация на овариална тъкан, като оптималните концентрации и режима на замразяване подлежат на допълнителни изследвания. От друга страна, има данни, че ДМСО и EG са токсични за овариалните клетки и тъканни фрагменти и трябва максимално да бъдат „отмивани“ преди трансплантация на размразената тъкан.

### **Сравнителни изследвания върху методи за криоконсервация на човешки гранулозни клетки**

Проведохме експерименти с цел отработка на подходящ протокол за замразяване на гранулозни клетки. За сравняване на виталитета им след приложените методи за криоконсервация наред с пролиферативната им активност използвахме и оцветяване с трипаново синьо. За да получим съпоставими резултати при всеки опит концентрацията на клетъчната суспензия бе доведена до  $1.10^6$  клетки/мл. Като контрола бе използвана култура след трипсинизиране. След използване на конвенционалният протокол за замразяване (на парите на азота) получихме най-нисък процент преживяемост. Въпреки, че той е сравнително лесен за осъществяване и се предпочита от повечето лаборатории, не е подходящ за чувствителни обекти, т.к. при него трудно се контролира скоростта на понижаване на температурата. При криоконсервация с помощта на програмен замразител, тези трудности се избягват, т.к. степента на охлаждане се определя от зададената програма. В съответствие с това, получените от нас резултати показват по-голям процент на преживяемост при този подход, сравнено с конвенционалния метод. Недостатък при него е, че се изисква скъпоструваща апаратура и процедурата е сравнително бавна. Независимо, че не бяха отчетени статистически достоверни различия при теста с трипаново синьо, най-добри резултати получихме при използването на витрификацията като метод за криоконсервация (Фиг.9). При него водата замръзва в стъклоподобно състояние, без образуване на ледени кристали и поради това той е по-удачен за съхранение на чувствителни биологични обекти. От друга страна, не се изисква специфична апаратура, както при програмното замразяване и е значително по-бърз за

изпълнение. Поради гореизброените причини ние считаме, че получените от нас резултати ни позволяват да предложим витрификацията като най-подходяща технология за съхранението на човешки гранулозни клетки. По отношение на базалната и стимулирана секреция на естрадиол от гранулозните клетки, не наблюдавахме разлики между стойностите, измерени преди и след размразяване. Тези данни се съгласуват с резултатите, получени от *Sluss P. et al. (1994)*.



Фиг.9 Виталитет на клетките след различни методи за криоконсервация (оцветяване с трипаново синьо)

### **Експресия на маркери за плурипотентност от човешки овариални клетки**

Съществуващата от 50-те години на миналия век догма гласи, че овариалният резерв се формира през пренаталния период и намаляването на съществуващият при раждането пул ооцити не може да бъде компенсирано (*Zuckerman S. et al., 1951*). Тезата, че момичетата се раждат с определен брой яйцеклетки, който постепенно се редуцира с възрастта и яйчниците не могат да произведат повече репродуктивни клетки, бе силно „разклатена” през последното десетилетие. Оогенеза е демонстрирана при култивиране на миши ембрионални стволови клетки. Митотично активни герминативни клетки са наблюдавани в яйчници от възрастни примати от подраздел *Prosimiae* и мишки. През 2004 г., при изследване на процесите, които се случват по време на менопауза, Tilly и екипът му случайно установяват несъответствие между темповете на фоликулна дегенерация и броят на здравите примордиални и първични фоликули за същия период.



Те изчисляват, че резервът в яйчниците би трябвало да се изчерпи на много по-ранна възраст, отколкото това реално се случва (*Johnson J. et al., 2004*). Впоследствие същият екип изолира и самите стволови клетки, от които се формират ооцитите в постнаталния период. Като използват тъкан от пациенти, подложени на овариектомия поради смяна на пола, авторите успяват да изолират овариални стволови клетки и от човешки яйчници и след това да ги диференцира до яйцеклетки (*White A.R. et al., 2012*). Тези резултати са потвърдени и в други изследвания (*Bukovsky A. et al., 2004; Kossowska-Tomaszczuk K. et al., 2009; Bukovsky A., 2011*). Овариални стволови клетки са открити основно в две области на постнаталния яйчник - в герминативния епител и сред гранулозните клетки на зрелия антрален фоликул. Митотично активни герминативни клетки са наблюдавани и при други бозайници (овце, свине, маймуни) (*Parte S. et al., 2011; Bui H.T. et al., 2014*). Всичко това дава надежди за развитието на нови терапии за лечение на инфертилитета. В последващите години различни екипи се опитват да възпроизведат експериментите, но получените резултати са отрицателни (при човек) или противоречиви (при лабораторни животни), което предизвиква известна доза критицизъм в научната общност. Към момента се знае, че в овариалната *tunica albuginea* присъстват мезенхимни стволови клетки, които могат да се диференцират в клетки на повърхностен епител, наподобяващи гранулозните. Предполага се, че от своя страна клетките на повърхностния епител могат да бъдат източник на герминативни клетки. Има данни, че овариалните мезенхимни клетки са предшественици и на гранулозните. Усилията на изследователите са насочени към получаването на информация относно функционалните и молекулярни характеристики на овариалните клетки, тяхната пластичност и възможностите за образуване на герминативни клетки при култивирането им *ин-витро*. Интерес представлява и въпросът за наличието на така наречените „овариални туморни клетки” (*Bagheri V. et al., 2017*). Особено актуален е този аспект в контекста на криоконсервацията на овариална тъкан като метод за фертилно застраховане.

За наличие на маркери за плурипотентност в овариалните клетки от повърхностния епител е съобщено за първи път през 2008 г. (*Virant-Klun I. et al., 2008*). Една година по-късно е получено живо потомство след изолиране и трансплантиране на *DDX4*-позитивни клетки на инфертилни мишки (*Zou K. et al., 2009*). През 2010г. е

демонстрирана експресията на *Oct-4* в овариални клетки, не участващи в структурата на фоликулите (*Pachiarotti J. et al., 2010*). Има данни, че експресията на *SSEA-1*, *Nanog* и *Oct-4* не зависи от срока на култивиране (брой пасаж) (*Gong S.P. et al, 2010*). Следва да се отбележи, че изследванията в тази област са малко и противоречиви. Няма информация дали експресията на стволово-клетъчни маркери е свързана с възрастта на жените. Това ни мотивира да проведем настоящето проучване. Изследвахме проби от 19 пациентки, разделени на три групи, разделени по възраст:

група 1 – между 21 – 35 години (n=9);

група 2 – между 35 – 48 години (n=8);

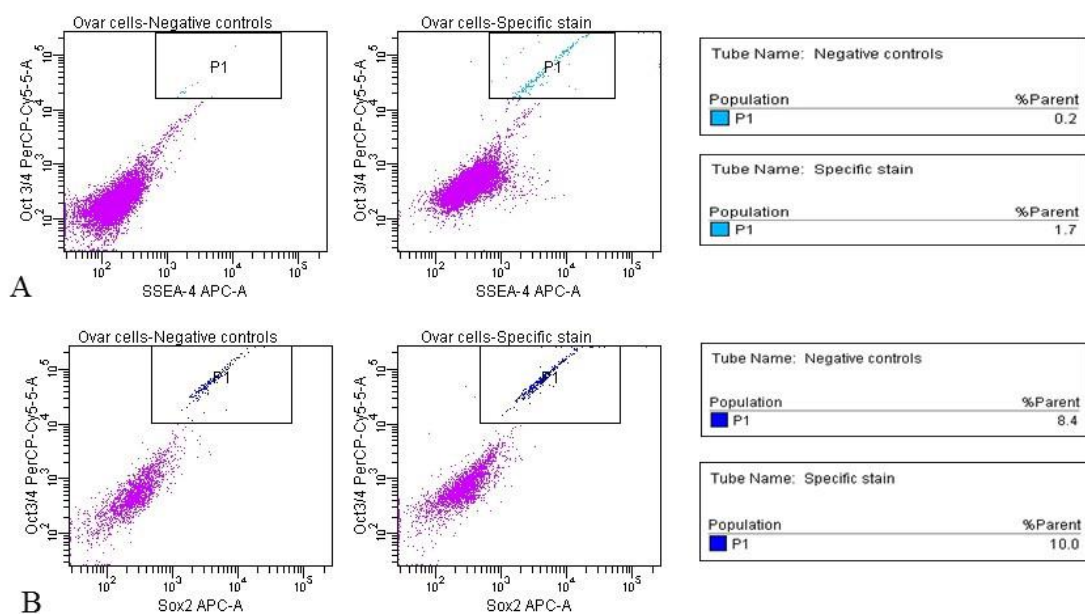
група 3 – жени в менопауза - 49 - 50 години (n=2).

Чрез използването на два взаимно допълващи се кита (*Human and Mouse Pluripotent Stem Cell Analysis Kit (BD)* и *Human Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis Kit (BD)*) чрез флоуцитометричен анализ анализирахме експресията на специфични маркери за плурипотентност - *SSEA-1*, *SSEA-4*, *Oct3/4*, *Nanog* и *Sox2*. За положителна контрола използвахме две линии човешки ембрионални стволови клетки, предоставени ни от колеги от Биологическия факултет към СУ „Климент охридски“. Доказано е, че те експресират всички основни маркери за плурипотентност, имат нормален XY кариотип, може да формират ембрионни тела и да се диференцират към екто-, ендо- и мезодерма, както и към герминативни клетки, което дава основание да бъдат определени като пълноценни линии човешки ембрионални стволови клетки (*Arabadjiev B. et al, 2010*).

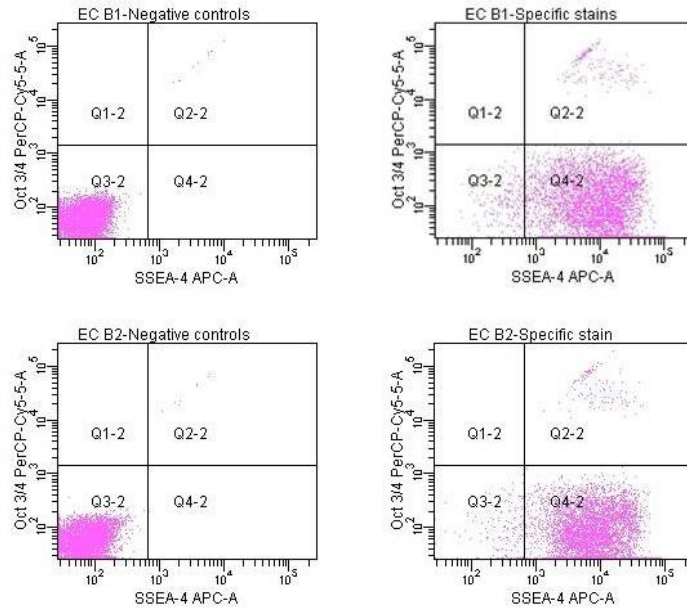
Получените резултати показаха, че всички изследвани маркери присъстват в клетките на пациентите от първите две групи (Табл.3). В клетките на жените в менопауза (група 3) отчетохме експресия на *SSEA-4* (1.5%) и *Sox2* (1.6%) и липса на такава за *Oct3/4*, *Nanog* и *SSEA-1* (Фиг.25) Резултатите от контролните проби са представени на Фиг.26.

Група/маркер	SSEA-1	SSEA-4	Oct3/4	Nanog	Sox2
21 - 35 г.	1,7 %	4,1 %	2,9 %	3,9 %	2,9 %
35 – 48 г.	1,1 %	3,7 %	1,6 %	1,8 %	2,3 %
49 – 50 г.	-	1,5 %	-	-	1,6 %

Табл.3. Експесия на маркери за плурипотентност от овариални клетки на жени в различни възрастови групи (флоуцитометричен анализ).



Фиг.10. **A:** Експресия на SSEA-4 от овариални клетки на жени в менопауза (group 3), (*BD Human and Mouse Pluripotent Stem Cell Analysis Kit*); **B:** Експресия на Sox2 от овариални клетки на жени в менопауза (group 3) (*BD Human Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis Kit*).



Фиг.11. Експресия на маркери в контролните проби (две линии човешки ембрионални стволови клетки)

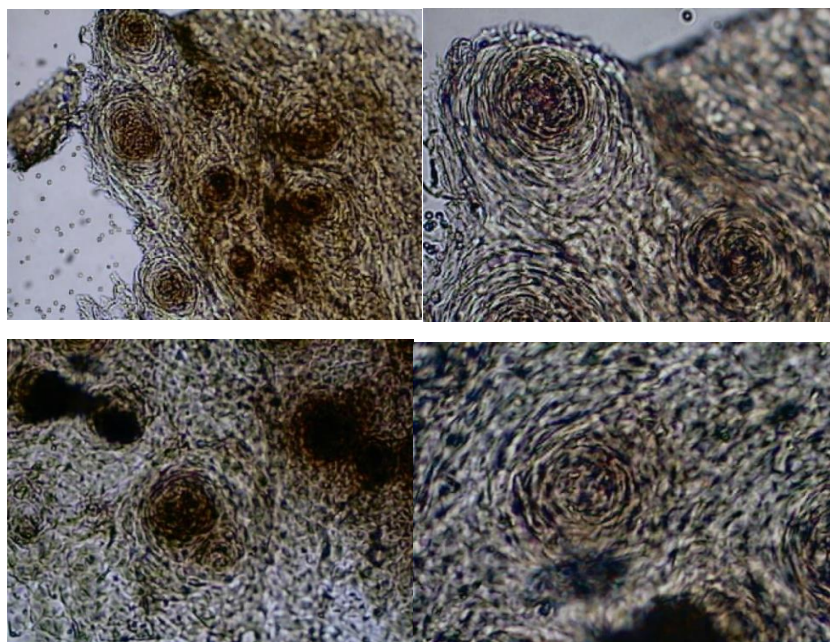
След миграцията си в половите гребени примордиалните герминални клетки (ПГК) се диференцират в предшественици на женските или мъжките гамети. Има данни, че специфични популации от ПГК (5-15 гестационна седмица) експресират повечето стволово-клетъчни маркери, такива като *Oct4*, *Nanog*, *cKIT*, *SSEA-1* и *SSEA-4* (Kerr C.L. et al, 2008). Независимо, че е показана експресията на тези молекули и в яйчници на възрастни жени, липсва информация за нейното ниво (количествени показатели). В нашите експерименти използвахме смесена култура овариални клетки (кортекс + медула) от жени в различна репродуктивна възраст. Изследвахме позитивната експресия на плюрипотентните маркери *SSEA-1* и *SSEA-4* (стадий-специфичен ембрионален антиген 1 и 4), *Oct3/4* (октамер-свързан транскрипционен фактор 3/4), *Nanog* и *Sox2* чрез флоуцитометрия. Резултатите ни показват намаляване на нивата на изследваните молекули с напредване възрастта на жените. Подобни данни са получени и от друг екип, но техните анализи са получени с помощта на RT-PCR (Novella-Maestre E. et al., 2009). Авторите получават овариална тъкан от три групи пациенти:  $22.2 \pm 3.6$ г.,  $24 \pm 2.9$ г. и  $27.5 \pm 2.5$ г. Наблюдавани са приблизително еднакви нива на експресия на *Nanog*, *Sox2* и *Oct4* в различните възрастови категории. Интересно е проучването на Stimpfel M. et al.

(2013), които работят с клетъчни култури, получени от жени на възраст 35-45г., 47-50г. (перименопаузални) и 52-73г. (постменопаузални). Те не наблюдават разлика в колоноформиращата активност и пролиферацията на клетките в отделните възрастови групи (с изключение на една пациентка на 73г., при която не е получена инвитро култура). Успяват да индуцират културата към адипогенна, остеогенна, нервна и панкреатична диференциация. С помощта на имунофлуоресценция установяват, че клетките са позитивни по отношение на плурипотентните протеини *Nanog*, *Oct-4*, *Sox2* и *SSEA-4*, но не формират тератоми след трансплантация на имунодефицитни мишки. Флоуцитометричният им анализ показва, че клетките в отделните проби експресират *SSEA-4* между 3,4 и 0,8%, което се съгласува с нашите резултати. В друго проучване (*Virant-Klum I. et al., 2013*) авторите диференцират клетки, получени от повърхностния епител на яйчника, в ооцито-подобни, които експресират *SSEA-4*, *Oct-4*, *Sox2*, *SALL4*, *CDH1* и *LEFTY1*. Същият екип наблюдава 2,2% *SSEA-4* – позитивни клетки в размразена овариална тъкан. Малко по-ниските стойности в сравнение с тези, получени от нашата група, вероятно се дължат на факта, че процесът на криоконсервация може да влияе на нивото на експресия на съответния маркер. Подобни на нашите изследвания относно влиянието на възрастта върху експресията на плурипотентни маркери от овариалните стволови клетки провеждат и *Esmalian Y. et al (2012)*, но върху мишки и с помощта на PCR. За разлика от нас, те не намират разлика в нивата на *Sox2* в зависимост от възрастта.

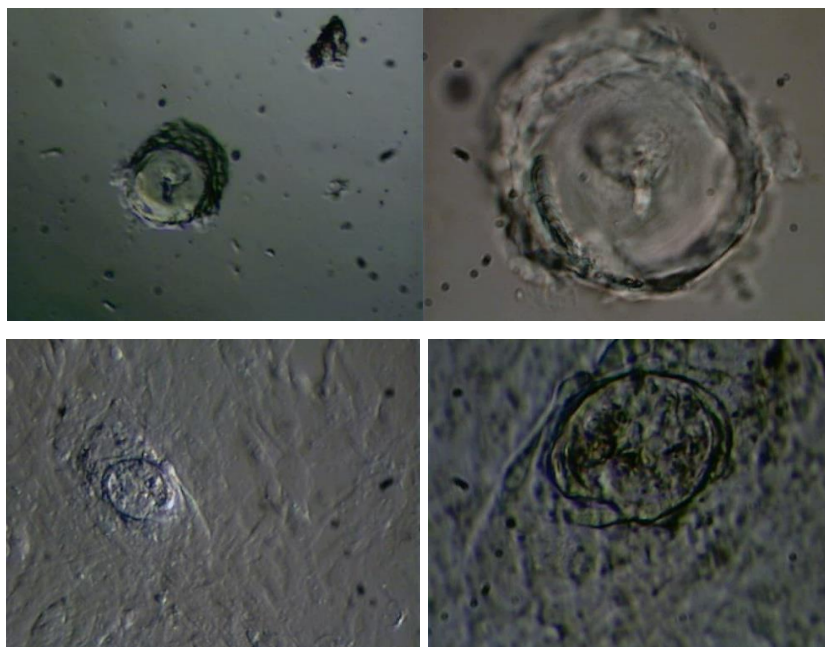
Като обобщение на получените оригинални резултати и литературните данни по въпроса, може да се направи извода, че количеството на овариалните клетки, експресиращи маркери за плурипотентност, намалява с напредване на възрастта на жената. Този факт разкрива нови възможности за изследване на причините за изчерпване на яйчниковия резерв и настъпване на преждевременна менопауза и алтернативни подходи за лечение на тези състояния. В аспекта на настоящия труд това заключение е още една обосновка за необходимостта от криоконсервация на овариална тъкан при определени групи пациенти като опция за фертилно застраховане.

## Култивиране *инвитро* на човешка овариална тъкан и изолирани фоликули

Разработването на методи за култивиране *инвитро* на овариална тъкан е важно за изучаване на яйчниковата физиология и патология (напр. развитието на поликистозен овариален синдром), изследването на влиянието на различни химикали върху съзряването и генома на ооцитите, получаването на яйцеклетки за научни експерименти и др. В нашите изследвания това бе и начин за контрол върху степента на запазването на тъканта в процеса на криоконсервация. С цел изследване растежа на фоликулите *инвитро* се използват два принципни подхода – култивиране на фрагменти тъкан, съдържащи множество фоликули и култивиране на отделни (изолирани) малки фоликули (поединично или на групи). В експериментите използвахме и двата метода (Фиг.12, Фиг.13). На базата на резултатите от предварителни сравнителни изследвания по оптимизиране средите за култивиране използвахме среда *DMEM/F-12*, суплементирана с 10% фетален серум и антибиотик. Към средата добавяхме 0,75 МЕ/мл ФСХ или комбинация ФСХ/ЛХ.



Фиг.12. Фрагменти човешка овариална тъкан, култивирана *ин-витро*



Фиг.13. Изолирани овариални фоликули

Най-разпространеният подход при култивиране на клетки и тъкани *ин-витро* е в 2D-система на дъното на петриеви панички, плаки или матрочета. При култивиране на органични експланتي в подобни условия протича прикрепване на фрагмента тъкан към повърхността, а след това се наблюдава прорастване (миграция) на различни видове клетки около него. Следва да се отбележи, че тъканните фрагменти са комплексна система, в която присъстват както витални фоликули в различен стадий на зрелост, така и атретични фоликули и екстрафоликулярни клетки. На 2-3-ти ден отчетохме миграция на фибробластоподобни клетки около фрагментите, а впоследствие (след 5-тия ден) върху тях прорастаха епителоподобни. Към 7-10 ден се наблюдава придвижване на по-малки, но също с епителоподобна форма клетки. Към края на втората седмица се виждат елементи на самоорганизация – открити лумени и тубулоподобни структури. По принцип това свойство е характерно за епителните клетки при растежа им върху различни субстрати. Подобни структури формират и ембрионалните стволови клетки при култивиране *ин-витро* (Wang Y. Et al, 2014). В естествени условия (в организма) при съзряването на фоликулите в тях се образуват кухини, запълнени с фоликулярна течност, които са обкръжени от пристенни гранулозни клетки. *Ин-витро* гранулозните клетки също образуват тубулоподобни структури (Antczak M. and VanBlerkom J., 2000). Това ни

дава основание да предположим, че наблюдаваните от нас клетки са гранулозни, мигрирали от разрушени фоликули. При култивиране на овариални експланти понякога в средата наблюдавахме незрели ооцити, което вероятно също е следствие на разрушаването на фоликулите.

При култивирането на единични фоликули установихме подобни процеси на клетъчна миграция около тях, както и при по-големите овариални фрагменти. Предполагаме, че наблюдаваните от нас фибробластоподобни клетки се придвижват от тека-обвивката на фоликула, а епителоподобните са гранулозни. Някои автори считат, че при култивиране в 2D-условия протича не само миграция на клетките от фоликула, но и разрушаване на базалната мембрана, на която са разположени гранулозните, което води до разрушаване на тримерната му структура. Това не позволява пълноценно съзряване и ръст на фоликулите при подобен тип култивиране.

Като алтернативен подход за инкубиране, с цел избягване прикрепването на фрагментите към дъното на петритото и миграцията на клетки, използвахме култивиране на тъканта в условията на постоянно разклащане на средата (апарат *Viboviduct 1500, SimSoTec*) с честота на трептене (35Hz за 5 сек. през 30-минутни интервали). В този случай не наблюдавахме образуването на монослой клетки около тъканта, а съдържащите се в нея фоликули до 10-12-ти ден култивиране запазваха морфологичната си цялост. Освен, че не позволява прикрепване на фрагментите към дъното, култивирането в условията на микровибрации има редица други преимущества. Положителният му ефект е демонстриран върху развитието на предимплантационни ембриони и стволови клетки. При този процес, известен като механотрансдукция, клетките реагират, като конвертират механичните стимули в електрохимична активност. Интегриновите молекули, фокалните адхезии и цитоскелетните филаменти медиират тази реакция. Налягането, породено от микровибрациите, се трансмисира чрез контракции на актиновите нишки и микротубули. Каскадата включва участието на малки *GTPase Rho* и *Rho*-свързани протеин-киназа (*ROCK*) белтъци (*Santos L.J. et al, 2015*). Някои автори предполагат, че механичните сигнали могат да се предават в ядрата и да повлияят генната експресия (*Hur Y.S. et al, 2013; Mizobe Y. et al, 2010*). Има данни, че вибрациите променят нивата на иРНК в различни екстрацелуларни матрикс-свързани протеини, повишават акумулацията на сулфат-глюкозаминогликаните и намаляват съдържанието на колаген (*Kutty J.K. and*



Webb K., 2010). От друга страна, експериментите на Wolchok и съавт. (2009) с човешки фибробласти показват, че микровибрациите водят до увеличаване нивата на колаген тип 1 и фибронектин в матрикса, както и тези на TGF $\beta$ 1, фактор, регулиращ важни клетъчни функции, като пролиферация и диференциация. Предполага се също така, че аугментацията влияе върху репликацията на ДНК и синтеза на протеогликани, но в този случай авторите са използвали различна от нашите експерименти честота на трептене (Liu J. et al, 2001). Всичко това ни дава основание да препоръчаме култивирането на овариална тъкан в условията на микровибрации.

За култивиране в 3D условия изпробвахме две системи - върху милипорови филтри (на повърхността на културалната течност, което позволява частично обгазяване на тъканта) и във „висяща капка“. Култивирането върху филтри се оказва неефективно за нашите цели, тъй като също се наблюдава миграция на клетки, поради това използвахме основно втория метод. Поради отсъствие на адхезивна повърхност клетките не могат да мигрират и това позволява запазване на целостта (триизмерната организация) на фоликулите. При това те не само съхраняват структурата си, но увеличават и размерите си.

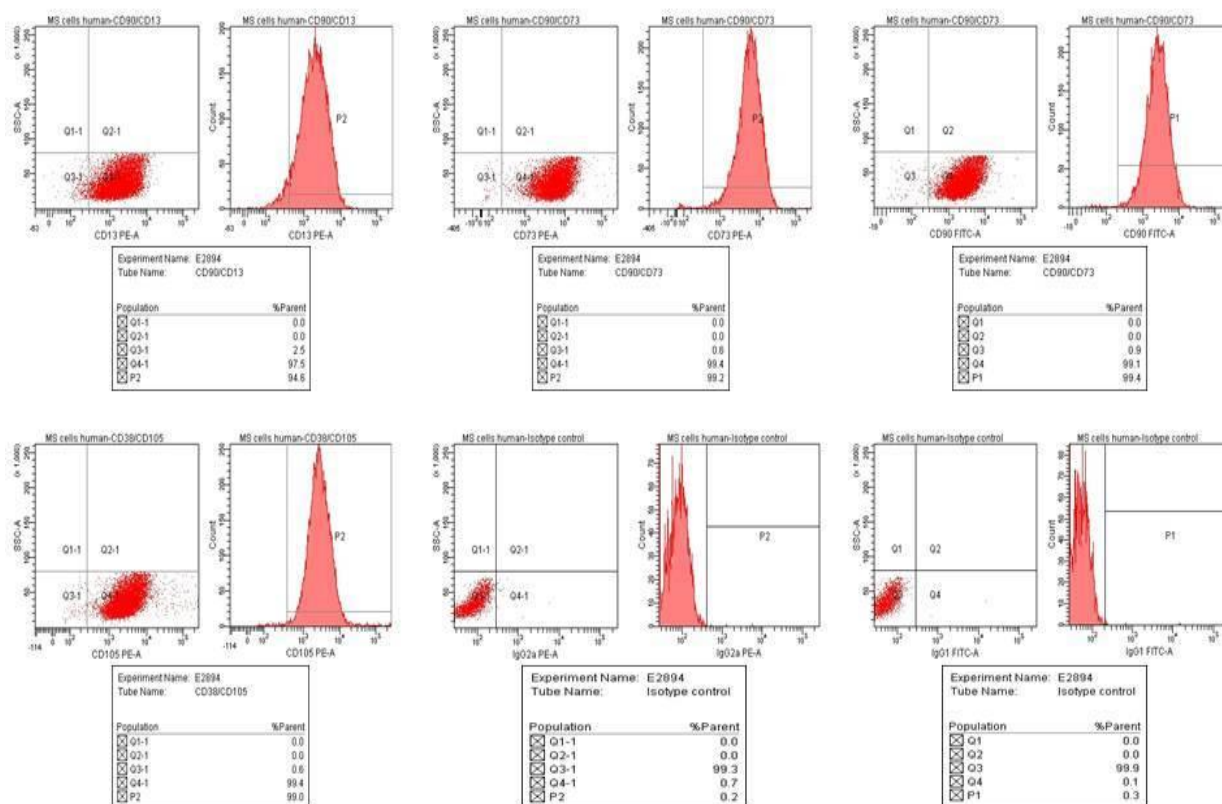
При експерименти с овариална тъкан от мишки и овце е наблюдавано, че в 3D-система фоликулите се развиват по различен начин, когато се култивират индивидуално или на групи (Driancourt M.A., 1994; Spears et al., 1996). Не е ясно точно какви фактори те отделят в средата и по какъв начин си взаимодействат, когато не са в пряк контакт. В нашите изследвания ние не отчетохме разлика в развитието им, когато ги инкубирахме поединично или по няколко в капка. В част от експериментите наблюдавахме „слепване“ на фоликулите и образуването на агрегати. За култивиране подбихме такива, които вече са стартирали развитието си от примордиален към ранен преантрален стадий – с наличие на известно количество тека или стромални клетки около тях, правилна овална форма, централно разположен ооцит, липса на видими признаци на атрезия (тъмни области) и интактна базална ламина. Използвайки подобни 3D-системи за култивиране на фоликули от лабораторни животни, някои автори наблюдават достигането им до преовулаторен стадий и оплождане на получените от тях яйцеклетки (Smits J. and Cortvrindt R., 2002). За съжаление ние не постигнахме подобни резултати. И в двата случая (култивиране поединично или на групи) част от фоликулите увеличаваха

размерите, а други ставаха атретични. В много малка част от случаите (5-10% от фоликулите) наблюдавахме началото на образуване на кухини, след което спираха развитието си. Отчетено бе ускоряване на растежа им и намаляваше нивата на атрезия при суплементирането на средата за култивиране с комбиниран ФСХ/ЛХ препарат, което ни дава основание да предположим, че някои от фоликулите реагират на хормонална стимулация. Култивирането на тъканта „във висяща капка“ в условията на вибрации бе технически неприложимо.

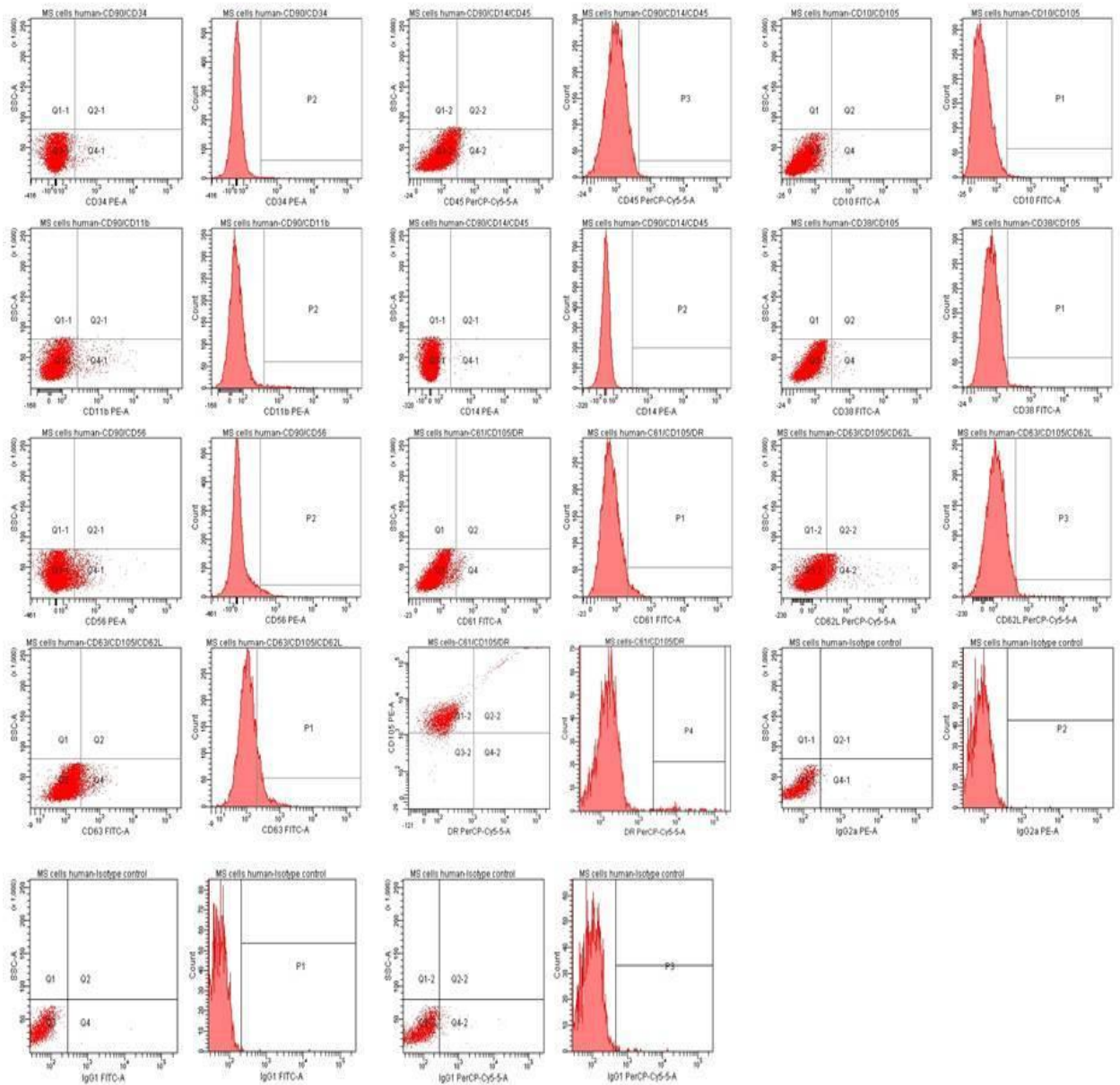
Добавянето на растежни фактори и хормони подпомагат в известна степен матurationта и растежа на фоликулите. Следва обаче да се отчита, че те са многокомпонентна система, регулираща се от много фактори, и е трудно да се определят определен вид цитокини и дози, които да се добавят към средата за достигане на оптимални условия. Поради това решихме да пресъздадем соматичното обкръжение на фоликулите чрез използване на системи за ко-култивиране. Известно е, че при ко-култивиране така наречените „хелперни клетки“ модифицират културалната среда. Използвахме два типа клетки – овариални и мезенхимни стволови, изолирани от фетален черен дроб. При ко-култивирането на фоликулите със стромални овариални клетки в 3D-система „висяща капка“ (3-4000 хиляди клетки и един фоликул в капка) установихме, че в рамките на 2-3 дни култивиране клетките се свързват с фоликула и образуват единен агрегат. Не знаем дали това се дължи на чисто механично прикрепване, или паракринни сигнали, отделяни от ооцита и фоликуларните клетки. В повечето случаи в системите за ко-култивиране наблюдавахме увеличаване на размерите на фоликулите. Предполагаме, че стромалните клетки отделят растежни фактори, стимулиращи матurationта на фоликулите и намиращите се в тях ооцити.

Подобни процеси наблюдавахме и при ко-култивирането с мезенхимни стволови клетки. Има данни, получени при лабораторни животни, че при изчерпан овариален резерв (вследствие въздействието на химиотерапевтични агенти), инжектирането на МСК води до увеличаване броя на растящите фоликули, секрецията на естрогени и VEGF (*Abd-Allah S.H. et al, 2013; Elfayomi A.K. et al, 2016, Li J. et al, 2017*). Установено е също така, че МСК играят важна роля в процесите на ангиогенезата и неоваскуларизация в овариалната тъкан посредством увеличаване експресията на VEGF, FGF2 и ангиогенин (*Xia X. et al, 2015*). Това ни даде основание да предположим, че и в *in-vitro* условия те

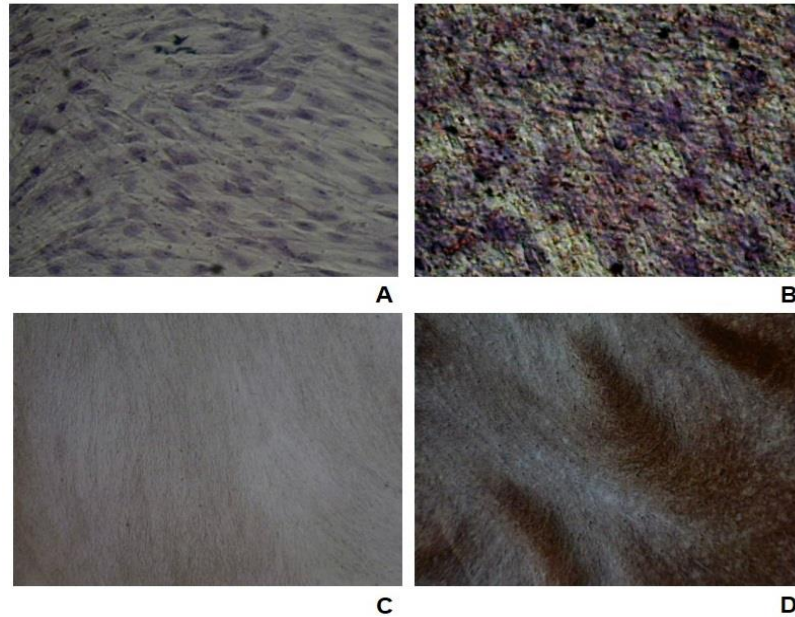
биха имали стимулиращ ефект върху матурацията на фоликулите. В нашите експерименти използвахме човешки МСК, изолирани от фетуси (абортен материал). Стволовият характер на клетките бе предварително доказан чрез имунофенотипен анализ (Фиг.14) и способност на културата за индуцирана диференциация в остеогенно и адипогенно направление (Фиг.15). Установихме, че МСК, подобно на овариалните, образуват единна структура с фоликулите. Интересен е фактът, че за разлика от тях, не всички стволови клетки се свързват с фоликула, в суспензията остават и единични или такива, образувачи малки конгломерати.



Фиг.14 (А) Флоуцитометричен анализ на МСК. Положителна експресия на повърхностни антигени от ЧФЧК и съответните изотипни контроли за PE и FITC.



Фиг.14 (В). Флуцитометричен анализ на МСК. Отрицателна експресия на повърхностни маркери от ЧФЧК и съответните изотипни контроли за PE, FITC и PerCP.



Фиг.15. Индуцирана диференциация на МСК в адипогенно и остеогенно направление

А,С – контрола (нетретирани клетки)

В – адипогенна диференциация (*Oil Red O* оцветяване). 14-ден култивиране в *Complete MesenCult Adipogenic Medium (Stem Cell Technologies)*

Д – остеогенна диференциация (оцветяване по *Von Kossa*). 35-ти ден култивиране в *MesenCult Osteogenic Medium (Stem Cell Technologies)*

### **Сравнителни изследвания върху методи за криоконсервация на човешка овариална тъкан**

За криоконсервация на овариална тъкан се използват две технологии – конвенционално (програмно) замразяване и замразяване чрез директно потапяне в течен азот (т.н. витрификация). Сравнителните изследвания между двата метода не са много, а резултатите са контраверсиални. При експерименти с човешка, говежда и свинска тъкан *Gandolfi F. et al (2006)* стигат до извода, че програмното замразяване дава по-добри резултати от витрификацията. При подобен род изследвания *Li J. et al (2007)*, *Sibler S. (2016)* правят коренно противоположен извод. *Isachenko V. et al. (2009)* не наблюдават разлика в морфологията на фоликулите и хормоналната секреция на размразената тъкан след консервация по двата метода, но констатира интересен факт относно драстично намаляване на експресията на гена *GAPDH (housekeeping-ген)* след витрификация. Като

цяло, засега повечето автори са на мнение, че конвенционалното замразяване е по-ефективно като метод за съхранение на овариална тъкан (*Isachenko V. et al, 2007; Isachenko V. et al, 2008*). Следва да се отбележи, че към момента почти всички родени деца са получени след трансплантация на яйчникова тъкан, криоконсервирана с помощта на програмно замразяване, и само две – след витрификация (*Nakamura Y. et al., 2017*). От друга страна, чисто технологическите предимства на витрификацията предполагат задълбочаване на изследванията в тази област. Това ни даде основание да изследваме ефекта на различните методи за криоконсервация върху морфологичните и функционални показатели на овариалната тъкан.

### ***Влияние на различни методи за криоконсервация върху морфологията и развитието на овариалните фоликули***

При трансплантация, рутинният хистологичен анализ е задължителен с цел минимизиране на риска от ре-трансплантация на ракови клетки. Но освен това хистологията на тъканта ни дава възможност да изследваме наличието, вида и качеството на овариалните фоликули като прогностичен белег за възстановяване на репродуктивните функции. Хистологичният анализ на фоликулите след криоконсервация може да се прави на три етапа: непосредствено след замразяване/размразяване, след размразяване и инвитро култивиране или след размразяване и ксенотрансплантация. Най-обективни са резултатите след последния подход, но това е и най-сложният и скъп метод.

В нашите изследвания овариалната тъкан бе криоконсервирана по две технологии – програмно (бавно) замразяване и чрез витрификация. При програмното замразяване използвахме общоприетият режим (скорост на охлаждане с 0,3 град/мин, с индуциране на сидинг при  $-7^{\circ}\text{C}$ ). За витрификация са предложени различни протоколи, различаващи се по вида и процентното съдържание на криопротектори и времето за експозиция на фрагментите във витрификационния разтвор. На базата на резултатите от наши предходни сравнителни експерименти ние използвахме модифициран протокол, подобен на описания от проф. Шерман Силбер (*Silber S., 2017*). След размразяване тъканта бе трансплантирана подкожно на имунодефицитни мишки (ксенографска трансплантация). На всеки етап - преди криоконсервация, след размразяване и ежеседмично след трансплантация в течение

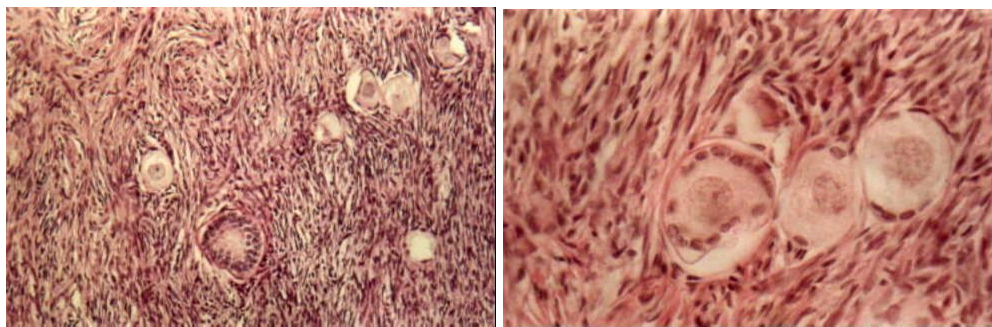
на 28 дни (за нуждите на конкретния експеримент) отчитахме вида на фоликулите и тяхното качество (Фиг.16, фиг.17).

За избягване на двойното преброяване (*overcounting*) бяха броени само секциите с видими ооцитни ядра. При определяне на параметрите на нормалните фоликули се ръководехме от класификацията на *Paynter S. et al. (1999)*.

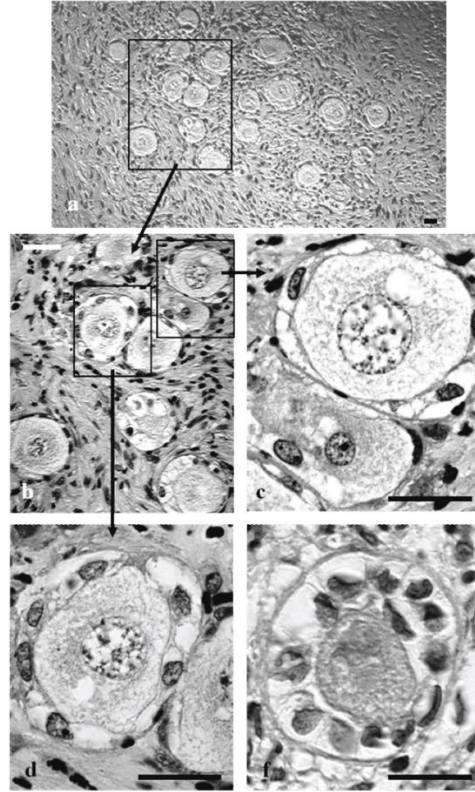
Фрагментите бяха разделени на три групи:

- **A:** контролна група (свежи, незамразена)
- **B:** програмно (бавно) замразяване
- **C:** витрификация

Първоначално изследвахме, в каква степен криоконсервацията влияе върху морфологията на фоликулите. Получените резултати показаха, че по-голямата част от тях (над 80%) запазват целостта си след размразяване, независимо от метода на криоконсервация (Фиг.16). Тези наши данни се съгласуват с общоприетото мнение, че примордиалните фоликули са криоустойчиви структури и процесът на замразяване слабо влияе на морфологичната им цялост (*Dolmans M.M. et al, 2013; Nagy Z.P. et al, 2017*).



Фиг.16 Фрагменти овариална тъкан след криоконсервация (HE)



Фиг.17. Хистологична микрография на фрагмент овариална тъкан на пациент К.А. (32 г.) след програмно замразяване: (а) фрагмент тъкан с фоликули, (b), (c) и (d) – участък от същия срез (по-голямо увеличение), (f) дегенеративен фоликул. (*Bar*= 20 $\mu$ m).

За нас определено по-голям интерес представляваше въпросът каква част от тях продължават развитието си и каква са подложени на атрезия при последващото култивиране *ин-виво*. Това ни мотивира да изследваме морфологията на фоликулите и степента на апоптоза в овариалната тъкан след трансплантация на имунодефицитни мишки. След експлантация на овариалните фрагменти, броят на атретичните фоликули, независимо от стадия им на развитие, бе достоверно по-висок след витрификация в сравнение с програмното замразяване и свежата тъкан (30%, 12% и 7% съответно). Това ни дава основание да твърдим, че по отношение влиянието на метода за криоконсервация върху последващата атрезия, програмното замразяване дава по-добри резултати. Следва да се отбележи, че след ксенотрансплантация на човешка овариална тъкан фоликулите съзряват значителни по-бързо, отколкото в женския организъм (*McGee E. et al, 2000*). Резултатите от хистологията на експлантираната тъкан показват, че във фрагментите от група „А“ (контролна, нетретирана тъкан) се съдържат достоверно ( $P < 0,05$ ) по-висок брой



прогресивно-развиващи се фоликули (вторични и третични) в сравнение с опитните групи („В“ и „С“). Най-нисък брой развиващи се фоликули се наблюдават в групата на замразените чрез витрификация фрагменти («С»). При сравняване на двата метода за криоконсервация се вижда, че след програмно замразяване по-голяма част от фоликулите продължават развитието си до вторични и третични в сравнение с витрификацията на овариална тъкан.

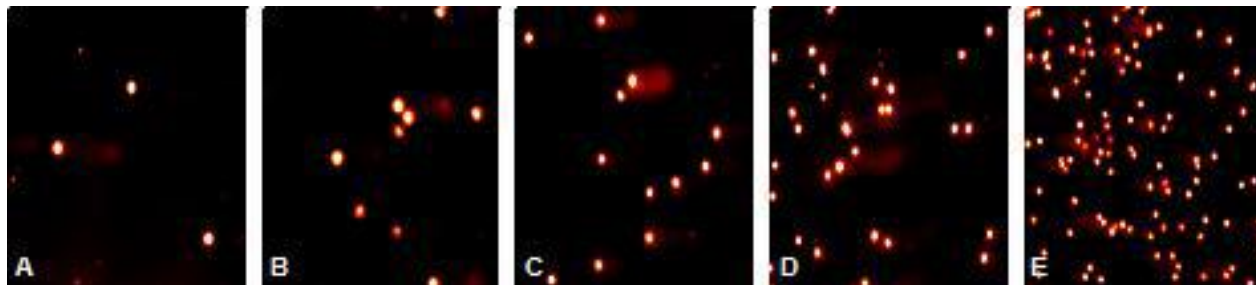
Група/вид фоликули	примордиални	вторични	третични
Нетрансплантирана тъкан	93	5	2
А – контрола (незамразени фрагменти)	42	34	14
В – програмно замразяване	56	36	8
С - витрификация	67	29	4

Табл.4 Вид фоликули (%) след 28-дневно культивиране ин-виво (трансплантация на имунодефицитни мишки).

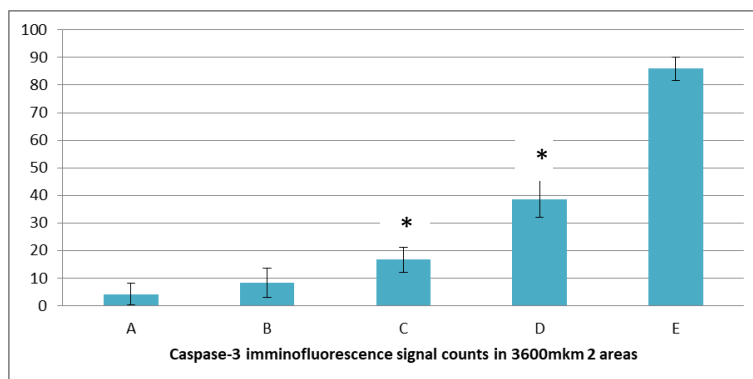
***Изследване степента на апоптоза в овариалната тъкан след различни методи на криоконсервация и последваща ксеногенна трансплантация.***

Следващата ни задача бе да изследваме в каква степен различните методи на криоконсервация влияят върху нивото на апоптоза в овариалната тъкан. Постарахме да отработим методика, позволяваща изчисляване на количеството клетки, преминаващи през този процес. Като положителна контрола тествахме възможността за изкуствено индуциране на апоптоза в свежа овариална тъкан с помощта на стауроспорин, за който се знае, че я предизвиква (*Kruman I., 1998*). В нашите експерименти използвахме 1 мкМ стауроспорин (предварително бе установено, че тази доза е достатъчна за предизвикване на апоптоза в 86% от овариалните клетки). Резултатите от изследването са представени на Фиг.18 и Фиг.19. Прави впечатление, че в контролната група (А) и в групата на трансплантираните свежи фрагменти (В) се наблюдава достоверно по-ниска степен на апоптоза в сравнение със пробите след криоконсервация (С и D). В стауроспорин третираните фрагменти нямаше витални фоликули и съответно се отчетоха най-високи нива

на апоптоза. Резултатите ни дават основание да предположим, че това е ключов механизъм в дегенерацията на овариалните фоликули в процеса на атрезия и играе важна роля в поддържането на тъканната хомеостаза.



Фиг.18. Каспаза-3 имунофлуоресценция в проби човешка овариална тъкан след различни методи за криоконсервация.



Фиг.19 Влияние на различните методи за криоконсервация върху нивата на апоптоза в овариалната тъкан (n=115 за всяка експериментална група). (\*p< 0.05 спрямо А и В)

И за двете фигури (Фиг.35 и Фиг.36) обозначенията са, както следва:

**A** – нетретирана овариална тъкан (контролна група),

**B** – свежа тъкан след ксенотрансплантация,

**C** – конвенционално (бавно) замразяване,

**D** – витрификация,

**E** – тъкан, третирана със стауроспорин.

Получените от нас резултати се съгласуват с данните на Dalman и съвт. (Dalman A. et al, 2017), които установяват, че експресията на гени, отговорни за апоптозата, вкл. CASP3,

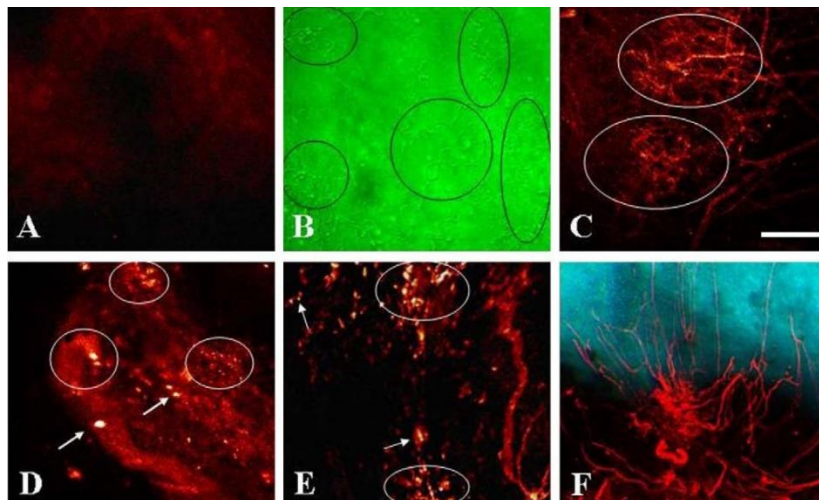
е достоверно по-ниска ( $P < 0.05$ ) при програмно замразяване в сравнение с витрификацията на овариална тъкан. След витрификация се наблюдава значително увеличение на VCL-2. На тази база авторите правят заключението, че витрификацията индуцира апоптоза в овариалните фрагменти.

### ***Изследване на процесите на ре-васкуларизация, протичащи в овариалната тъкан след различни методи на криоконсервация и последваща ксенотрансплантация***

Важен фактор за успешната трансплантация на овариална тъкан е формирането на кръвоносни съдове, които да подхранват растящите фоликули. Знае се, че след автотрансплантация на незрели яйчници при плъхове първите признаци на ре-васкуларизация се наблюдават след 48 часа (*Dissen G.A. et al, 1994*). Преди това във фрагментите се наблюдават фиброзни промени вследствие на исхемията, засягащи 30-70% от тъканта (*Kim S.S. et al, 2002*). От друга страна, има данни, получени при експерименти с новородени мишки, които са индикация, че трансплантацията не е толкова важна причина за загубата на примордиални фоликули, колкото процесът на криоконсервация (*Liu J. et al, 2002*). В серия експерименти проследихме в каква степен методът на замразяване (програмно или витрификация) влияе върху образуването на кръвоносни съдове в овариалните фрагменти след размразяване и ксенотрансплантация. Регулацията на овариалната ангиогенеза е комплексен процес, регулиращ се от множество вазоактивни и ангиогенни фактори, включващи васкуларния ендотелиален и фибробластният растежен фактор (*FGF-2*), ангиопоетин и др. (*Hazzard T.M. and Stuffer R.L., 2000*). В нашите изследвания степента на ангиогенеза определяхме с помощта на имунохистохимично оцветяване с ендотелиален клетъчно-специфичен маркер *PECAM-1* (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*). Фрагментите от опитните (замразени с програмен замразител или витрификация) и контролната група (свежа овариална тъкан) бяха трансплантирани на имунодефицитни мишки. През определени периоди от време експлантите бяха изследвани за наличие на ре-васкуларизация, като същевременно бе отчитан и броят и качеството на различните видове фоликули.

И в трите групи преди трансплантация не се наблюдава ре-васкуларизация (Фиг.20, А). На третия ден се отбелязват първи признаци на ангиогенеза в експлантираната тъкан (Фиг.20, В). След една седмица култивиране *ин vivo* се вижда мрежа от новосформирани

капиляри (Фиг.20, С,D,E). Размерът на микроваскуларната мрежа нараства от първата до четвъртата седмица (Фиг.20,F), както следва: от  $1,96 \pm 0,89 \text{ мм}^2$  до  $72,3 \pm 5,8 \text{ мм}^2$  за свежите, нетретиранни фрагменти, от  $2,85 \pm 0,27 \text{ мм}^2$  до  $92,5 \pm 7,1 \text{ мм}^2$  за бавно замразените, и от  $2.19 \pm 0,48 \text{ мм}^2$  до  $104,1 \pm 6,9 \text{ мм}^2$  за витрифицираната тъкан. Получените резултати показват, че процесите на ре-васкуларизация в трансплантираната овариална тъкан не зависят от метода на криоконсервация (Фиг.20 и Фиг.21)



Фиг.20. Начало на реваскуларизацията в овариалната тъкан на 3-ти ден след трансплантация:

**A-** Контрола (овариални фрагменти веднага след получаване от пациента),

**B-** свежа, нетретирана овариална тъкан,

**C-** свежа, нетретирана овариална тъкан, PECAM-1 флуоресценция,

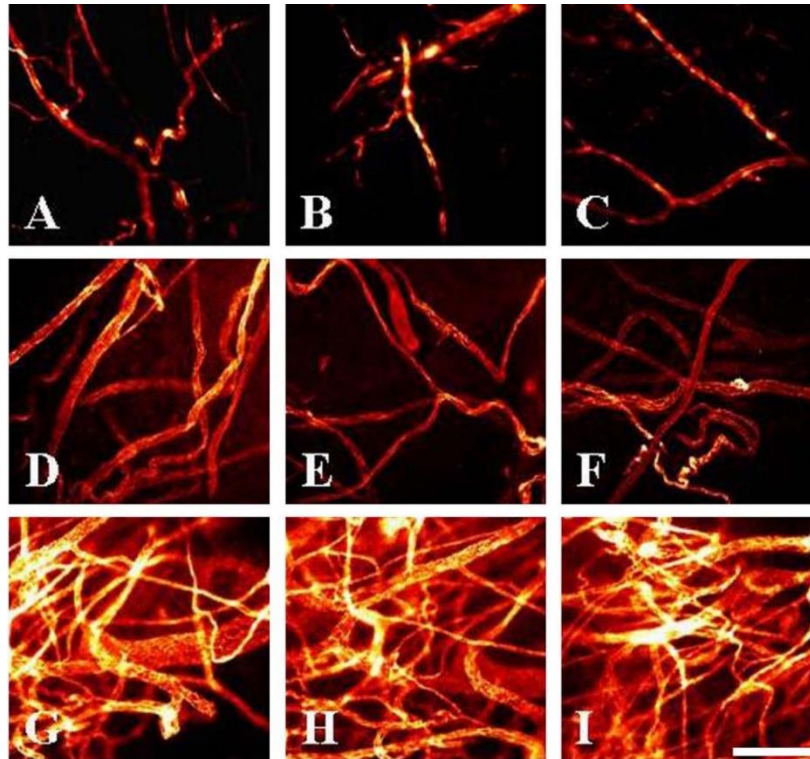
**D-** начало на формирането на кръвоносна мрежа след бавно замразяване,

**E-** след витрификация,

**F-** свежи овариални фрагменти, 4 седмици след ксенотрансплантация, трансмисионна микроскопия (зелено) и PECAM-1 имунофлуоресценция (червено). (*Bar = 20мкм*)

И в трите групи най-голяма загуба на фоликули (13%) се наблюдава през първата седмица след трансплантация, докато през следващите 3 седмици загубата е едва 5%. Предполагаме, че това е следствие на хипоксията, исхемията и криоуврежданията, чието действие се проявява през ранния посттрансплантационен период. Тези наши резултати се

съгласуват с наблюденията и на други автори, които отчитат най-голяма загуба на фоликули първите дни след трансплантация, преди ре-васкуларизацията на тъканта (Oktay K. et al, 2000).



Фиг.21. PECAM-1 имунофлуоресценция:

**A**- 1 седмица след трансплантация, свежа, нетретирана тъкан;

**B**- 1 седмица след трансплантация, бавно (програмно) замразяване;

**C**- 1 седмица след трансплантация, витрификация;

**D**- 2 седмици след трансплантация, нетретирана тъкан;

**E**- 2 седмици след трансплантация, бавно замразяване,

**F**- 2 седмици след трансплантация, витрификация,

**G**- 4 седмици след трансплантация, нетретирана тъкан;

**H**- 4 седмици след трансплантация, бавно замразяване;

**I**- 4 седмици след трансплантация, витрификация. (Bar = 20мкм)

## **Влияние на продължителността на периода на преинкубация на овариалната тъкан върху ефективността на процеса на криоконсервация**

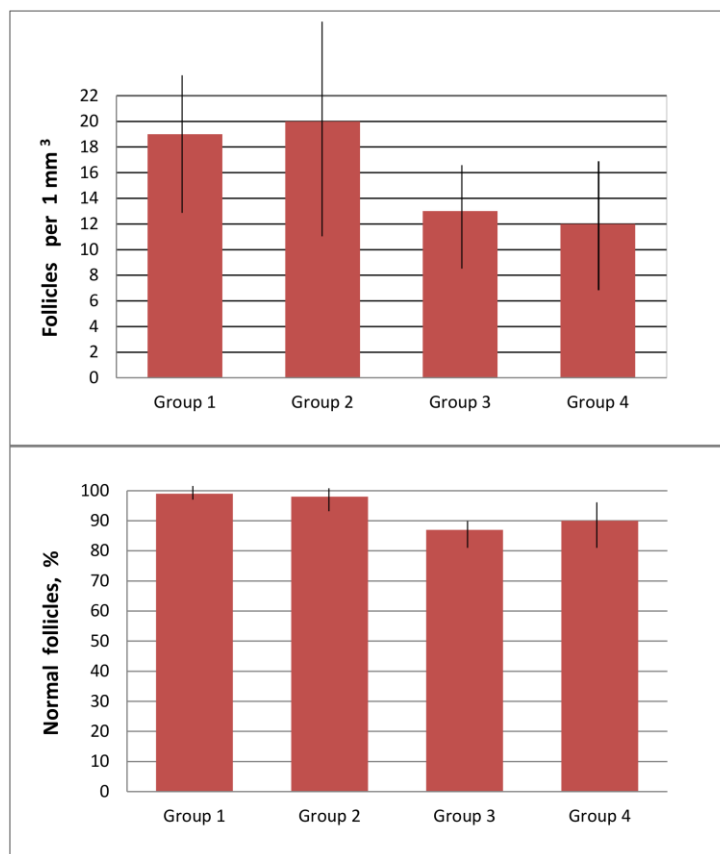
След получаване на тъканта понякога тя не може да бъде веднага замразена – налага се пренасяне до лабораторията, в много случаи до друг град – период, изискващ значително време. Обикновено това става в специални транспортни среди при хладилна температура ( $+5^{\circ}\text{C}$ ). От друга страна, не е известно в каква степен периодът на преинкубация на овариалната тъкан влияе върху биологичните и свойства след размразяване. Това ни мотивира да проведем серия експерименти в които си поставихме за задача да изследваме в каква степен еднократно и съхранение при ниски положителни температури влияе върху ефективността на последващата криоконсервация.

Овариални фрагменти от 11 пациенти бяха разделени на следните 4 групи:

- Група 1 ( $n=30$ ) – тъканта бе обработена и замразена веднага след получаване. Оценявахме качеството на размразените фрагменти непосредствено след размразяване;
- Група 2 ( $n=30$ ) – фрагментите бяха охладени и съхранявани в продължение на 24 часа при  $5^{\circ}\text{C}$  и впоследствие замразени. Оценка на качеството им извършихме веднага след размразяване;
- Група 3 ( $n=30$ ) – фрагментите бяха замразени веднага след получаване. След размразяване бяха трансплантирани на имунодефицитни мишки и култивирани инвиво в продължение на 45 дни. Оценката им бе извършена след експлантация;
- Група 4 ( $n=30$ ) – фрагментите бяха замразени след 24-часово съхранение при  $5^{\circ}\text{C}$ . След размразяване бяха трансплантирани на имунодефицитни мишки. Качеството им оценявахме след експлантация.

Във всички случаи използвахме програмно замразяване под защитата на 6% ДМСО, 6% ЕГ и 0,15М захароза.

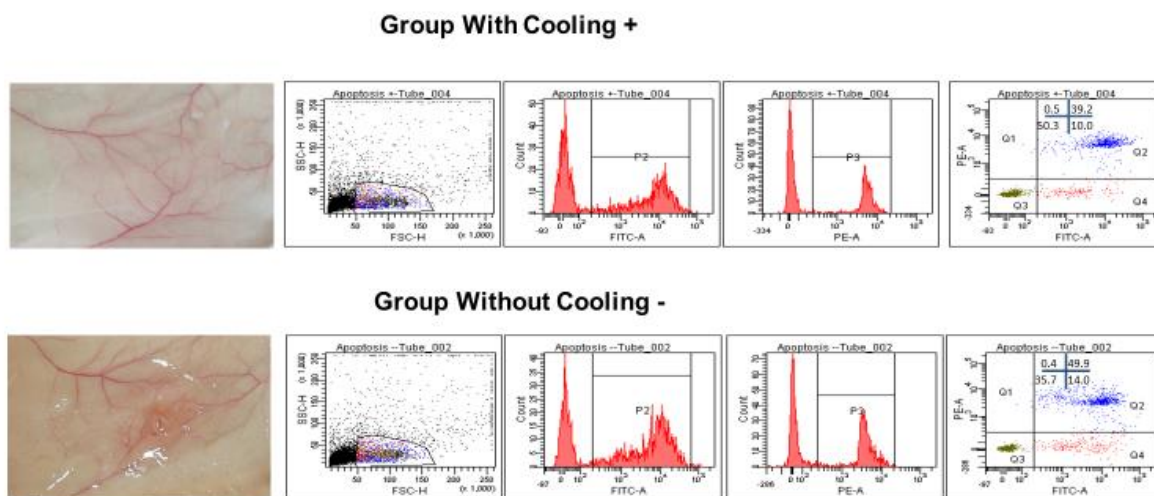
За групите 1,2,3 и 4 плътността на фоликулите/ $\text{mm}^3$  бе съответно  $19.0\pm 5.6$ ,  $20.2\pm 8.1$ ,  $12.9\pm 4.4$  и  $12.2\pm 5.1$  ( $P_{1-2, 3-4} > 0.1$ ). Не наблюдавахме разлика в морфологията на фоликулите в отделните групи. (фиг.22). Процентът на морфологично нормалните фоликули по групи съставляваше  $99.0\pm 2.1\%$ ,  $98.0\pm 3.0\%$ ,  $87.7\pm 4.1\%$  и  $90.0\pm 5.7\%$  ( $P_{1-2, 3-4} > 0.1$ ).



Фиг.22.Количество и качество на овариалните фоликули

В нашите изследвания за оценка на степента на апоптоза в овариалните клетки използвахме флоуцитометричен анализ с помощта на търговски кит *FACS with FITS-Annexin V and Propidium Iodide* (Фиг.23). Анализът показва достоверно по-ниски стойности на транслокация на фосфатидилсерин в групите 2 и 4 (в които фрагментите бяха държани 24 часа при 5<sup>0</sup>С преди криоконсервация). В група 1 процентът на клетките, намиращи се на ранен стадий на апоптоза (FITC-Annexin V позитивни, PI – негативни) бе 14.3±0.6%, докато 62.8±4.9% от клетките показваха характеристики на напреднал апоптичен стадий или мъртви (FITC-Annexin V позитивни, PI – позитивни). В тази група 22.8±3.7% от клетките бяха витални (негативни и по FITC-Annexin V, и по PI) и 1.0±0.1% съответстваха на некротични (FITC-Annexin V негативни, PI – позитивни). Във втората група 9.1±1.7% бяха на ранен апоптичен стадий (FITC-Annexin V позитивни, PI – негативни), докато 37.2±3.7 имаха характеристики на късна апоптоза или мъртви (FITC-Annexin V позитивни, PI – позитивни). В тази група процентът на виталните клетки (негативни и по FITC-Annexin V, и по PI) бе 50.4 ±4.7%, а на некротичните (FITC-Annexin V негативни, PI – позитивни)

3.3±0.2%. В група 3 процентът на клетките в ранен стадий на апоптоза бе 7.4±0.7%, в напреднал или мъртви – 52.8±4.8%. Виталните клетки бяха 39.5±4.1%, а некротизиралите – 0.5±0,0%. В четвъртата група разпределението на клетките бе, както следва: ранна апоптоза – 9.2±2.0%, напреднал стадий на апоптоза – 24.4±1.9%, витални – 66.2% и некроза – 0.2%. Резултатите от флуоцитометричния анализ са представени на Фиг.24.

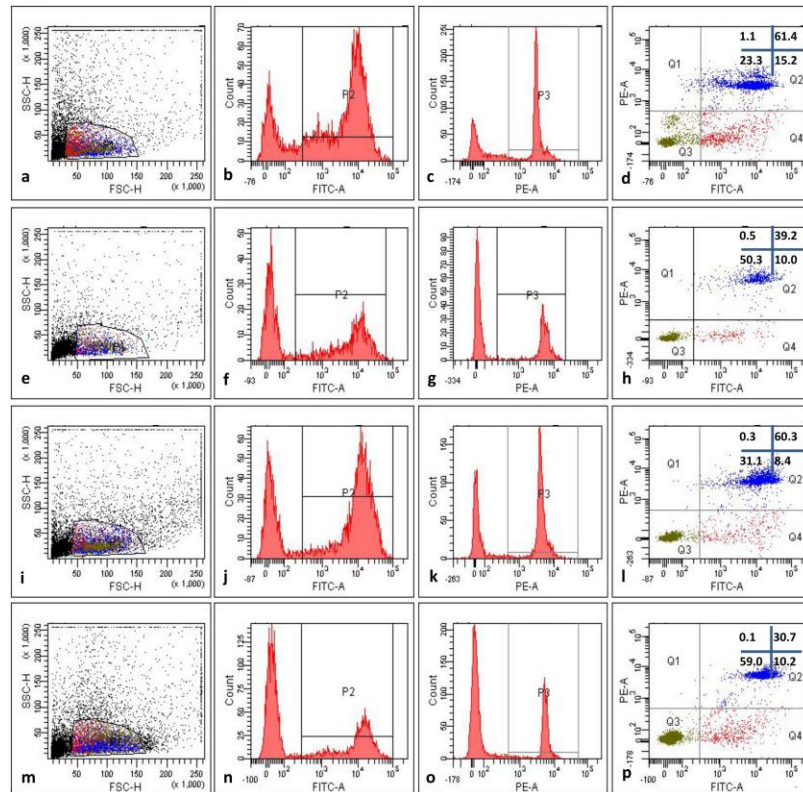


Фиг.23. Експресия на фосфатидилсерин в овариалните клетки след криоконсервация и ксенотрансплантация

Съхранението на овариалната тъкан при ниски положителни температури за период до 26 часа не инхибира развитието на фоликулите при последващо инвитро култивиране. Наблюдава се съпоставимо с контролните групи съзряване на примордиалните фоликули до по-напреднали стадии (*Isachenko E. et al, 2009*). От друга страна, *Yin H. et al (2003)* установяват, че съхранението на овариална тъкан от мишки за 24 часа при 4<sup>0</sup>С, макар и да не уврежда секреторните функции, води до намаляване броя на виталните фоликули, факт, който не се съгласува с нашите резултати. Възможно е да става дума за видова специфичност в чувствителността на яйчниците към ниски температури. Интерес в тази област представлява изследването на *Wood T.W. et al. (1997)*. Авторите не намират достоверна разлика в степента на атрезия на фоликулите в контролната група и тези, съхранявани за 48 часа при хипотермия.



В заключение може да се каже, че инкубацията на овариалната тъкан преди замразяване при 5°C не уврежда фоликулите, както и намалява експресията на фосфатидилсерин след размразяване, което е признак за по-добро запазване виталитета на клетките.



Фиг.24. Транслокация на фосфатидилсерин в овариални клетки – репрезентативни данни (от един експеримент)

(a, b, c, d) Група 1: Тъканта е замразена веднага след получаване. Анализът е направен след размразяване, (e, f, g, h) Група 2: Тъканта е съхранявана в продължение на 24 часа при 5°C преди замразяване. Анализът е направен след размразяване, (i, j, k, l) Група 3: Тъканта е замразена след получаване. След размразяване е трансплантирана и култивирана 45 дни. Анализът е направен след експлантация на фрагментите, (m, n, o, p) Група 4: Тъканта е замразена след 24-часово съхранение при 5°C. След размразяване е трансплантирана за 45 дни. Анализът е направен след експлантация на фрагментите, (a, e, i, m) точкова диаграма (дот-плот), върху която е селектирана популацията от клетки за анализ (c, g, k, o) PE-канал. Изследван е интензитетът на флуоресценция на Пропидиевия йодид PI (некротични клетки), (d, h, i, p) Дот-плот анализ на FITC-Annexin-5 и PE-канал;

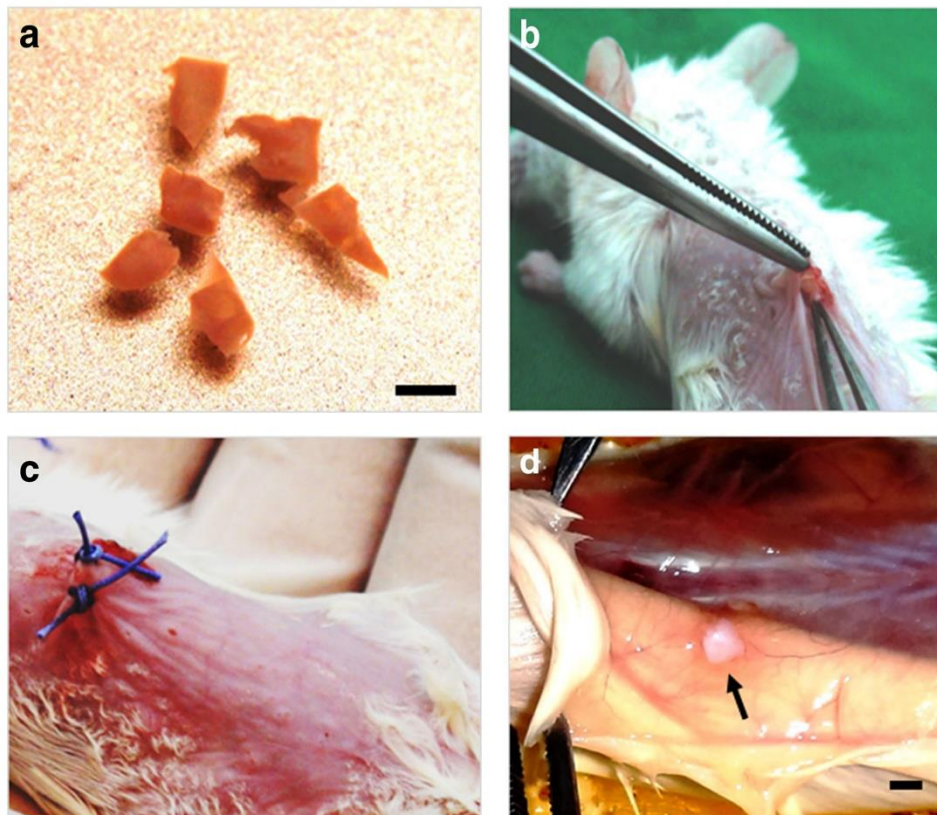
(Q1) – клетки, негативни по Anexin-5 (FITC A) и позитивни по PI; (Q2) – позитивни по Anexin-5 и PI (късен стадий на апоптоза); (Q3) – негативни по Anexin-5 и PI (с нормален виталитет); (Q4) – позитивни по Anexin-5 и негативни по PI (ранен стадий на апоптоза)

### **Влияние на наличието на медула в замразяваните фрагменти върху ефективността на процеса на криоконсервация на човешка овариална тъкан**

*Медулата (zona vasculosa)* се намира централно в яйчника. Образува се от ембрионалния мезенхим и е изградена предимно от рехавява съединителна тъкан. Обилно снабдена е с кръвоносни и лимфни съдове, има и доста нервни израстъци. Интерес представлява в каква степен наличието на медула в замразяваните овариални фрагменти влияе върху успеваемостта на процеса. Обикновено първият стадий на обработката на овариалната тъкан след получаване се състои в нарязване на яйчника и изолиране на кортекса от медулата. Идеята е да бъдат замразени намиращите се в кортикалната област примордиални фоликули, които са малки и криорезистентни структури. Това става чрез нарязване на кортекса на тънки парчета (ивици, ленти) и последващата им консервация. От друга страна, известно е, че в овариалната медула има фоликули и кръвоносни съдове. Данните показват, че в нея се съдържат почти 10000 фоликула/грам медула, и голяма част от тях (предимно преантрални) се губят при общоприетите методи за криоконсервация (*Kristensen S.J. et al, 2011*). Следва да се отбележи също така, че наличието на медула подпомага процесите на неоваскуларизация и развитие на фоликулите в овариалната тъкан след трансплантация. Кръвоносните съдове са важни за преживяемостта на присадените фрагменти, тъй като кръвоснабдяването е от ключово значение за запазването и матурацията на фоликулите (*Weissman A. et al., 1999*). Показано е, че 48 часа след автотрансплантацията на незрели яйчници при плъхове в тях се наблюдават активни процеси на ревакуларизация (*Dissen G.A. et al., 1994*). И при човек развитието на примордиалните фоликули в кортекса зависи от наличието на кръвоносни съдове (*Delgado-Rosas F. et al, 2009*). Имплантите са чувствителни към исхемия, което е важен фактор за приживяемостта им след трансплантация. Измененията, свързани с фиброза, могат да засегнат от 30-70% от тъканта (*Kim S.S. et al, 2002*). Хипоксията, която се наблюдава първите 5 дни след трансплантация, води до исхемични увреждания и индуцира загуба на фоликули и отклонения, свързани с тяхната активация (*Donnez J. et al., 2006; Dolmans M.M. et al., 2007*). Би могло да се очаква, че наличието на медула в замразяваните фрагменти ще

доведе до по-добра васкуларизация и ангиогенеза след размразяване и трансплантация. Всичко това показва евентуалните предимства при замразяването на овариална тъкан, съдържаща и медула освен кортекс. От друга страна, увеличаването размера на фрагментите, наличието на различни типове клетки и др., несъмнено усложнява процеса на криоконсервация. Това ни мотивира да проведем серия експерименти, в които изследвахме влиянието на наличието на медула в замразяваните фрагменти върху тяхната жизнеспособност след размразяване и трансплантация.

За предотвратяване на кристализацията на вътреклетъчната вода при криоконсервацията на овариална тъкан за защита на клетките се използват проникващи криопротектори. Приложение в практиката намират най-често тригликоли (високомолекулярни алкохоли – глицерол, пропиленгликол и етиленгликол) или ДМСО (*Gook D.A. and Edgar D.H., 2011*). Обикновено концентрацията на криопротектора е 10-12%, независимо дали се използва чист ДМСО или комбинация на ДМСО с гликоли. В конкретната серия експерименти за замразяване използвахме ДМСО и етиленгликол, изхождайки от факта, че в тъканта се съдържат различни видове клетки и затова е необходима мултипротекторна защита. Предишни наши изследвания (непубликувани данни) показаха, че ефективността на 12% ДМСО е по-ниска от използването на комбинацията от два криопротектора със същата крайна концентрация. Както бе споменато, ДМСО оказва и токсичен ефект върху клетките. В експериментите използвахме комбинация от проникващи и непроникващ криопротектор (захароза) и програмно замразяване, като овариалните фрагменти бяха разделени на две групи: само кортикална тъкан и такива, съдържащи и медула. След размразяване фрагментите бяха трансплантирани на имунодефицитни мишки (Фиг.25)



Фиг.25. Ксенотрансплантация на човешка овариална тъкан:

**a** – криоконсервирани овариални фрагменти след размразяване

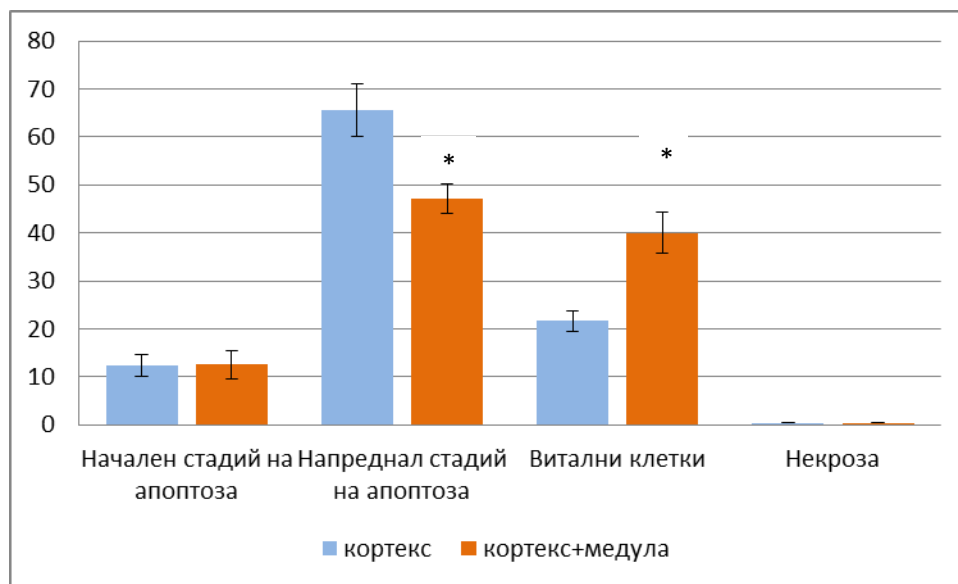
**b, c** - трансплантация на овариалните фрагменти

**d** - овариалните фрагменти след 45 дни култивиране *ин-виво* (*bar* = 2mm)

След 45 дни култивиране инвиво (ксенотрансплантация) направихме хистологичен анализ на фоликулите. Не установихме разлика в количеството и качеството на фоликулите в двете групи, което ни дава основание да твърдим, че наличието на медула в замразяваните фрагменти не влияе върху качеството на фоликулите след размразяване и трансплантация.

Освен брой и качество на фоликулите, с помощта на флоуцитометричен анализ изследвахме и експресията на фосфатидилсерин като маркер за виталитета на клетките. (Фиг.26) Криоконсервацията предизвиква най-малко 5 негативни ефекта върху тях - хипоксия, повишаване нивото на вътреклетъчните  $Ca^{2+}$ , осмотични увреждания на клетъчните мембрани, генериране на ROS (свободни радикали) и липидна пероксидация. Всички те в една или друга степен могат да доведат до транслокация на фосфатидилсерина.

Получените от нас резултати показват, че наличието на медула в замразяваните фрагменти влияе върху експресията на фосфатидилсерин след размразяване и трансплантация. В първата група (замразяване само на кортикална тъкан) 12.4±2.2% от клетките бяха на ранен стадий на апоптоза (FITC-Annexin V - позитивни, PI - негативни), докато 65.6±5.6% имаха характеристики на напреднал стадий или мъртви клетки (FITC-Annexin V - позитивни, PI - позитивни). В тази група отчетохме 21.6±2.2% витални клетки (FITC-Annexin V - негативни, PI - негативни) и 0.4 ±0.05% некротични клетки (FITC-Annexin V - негативни, PI – позитивни). Във втората група (овариални фрагменти, съдържащи медула) 12.5±3.0% от клетките бяха на ранен, 47.1±3.1% на късен апоптичен стадий или мъртви. В тази група процентът на виталните клетки бе 40±4.2%, а на некротичните - 0.4±0.05%. (Фиг.44 и Фиг.45)



Фиг.26. Виталитет на клетките (%) в овариални фрагменти (само кортекс и кортекс + медула) след размразяване и трансплантация на имунодефицисти (SCID) мишки. (\*P<0,05 между двете групи)

Фосфатидилсеринът е фосфолипиден компонент на мембраната, играещ ключова роля в клетъчната сигнализация, особено при процесите на некроза и апоптоза. Нормално е локализиран на вътрешната страна на мембраната. Под влиянието на някои негативни за

клетките фактори се транслоцира на екстрацелуларната повърхност, което служи като сигнал за последващата фагоцитоза (*Verhoven B. et al, 1995*). Знае се, че в процеса на криоконсервация, в отговор на стреса, в клетките също се инициират процеси, водещи до апоптоза или некроза. Това е показано при различни видове клетки (*Garcia M.B. et al, 2009*). Наблюдава се увреждане на рецепторите и повишаване концентрацията на вътреклетъчния калций (*Chiarugi A. and Moskowitz M., 2002; Mattson M. and Chan S., 2003*). Апоптичните протеини влияят по различни пътища и на митохондриите (набъбване, формиране на мембранни пори, повишаване пермебилитета на мембраните и др.). Някои автори са наблюдавали значително увеличение на апоптичните фоликули в замразената овариална тъкан (15% vs 4%) в сравнение с нативната (*Soleimani R. et al, 2011*).

Повишеният пермебилитет на мембраните в соматичните клетки е сигнал за ранен стадий на апоптоза (*Chekeni F. et al, 2010*). Транслокацията на фосфатидилсерин в клетките я разглеждаме по-скоро като маркер за загуба на виталност на клетките след криоконсервация. Това ни дава възможност, наред с другите показатели, да сравним ефективността на различните технологии за замразяване. Когато консервираните овариални фрагменти съдържат части от медулата, наблюдавахме значително по-ниски нива на транслокация на фосфатидилсерин в сравнение със случаите, когато замразявахме само кортикална тъкан. Следва да се отбележи, че има само ограничен брой подобни сравнителни изследвания, касаещи ролята на медулата при криоконсервация и трансплантация. Получените от нас данни ни дават основание да предположим, че наличието на медула в замразяваните овариални фрагменти спомага за по-добрата им преживяемост след размразяване и трансплантация. Следва да се отбележи, че в проведената серия експерименти използвахме изключително програмно замразяване. Наличието на медула увеличава размерът на овариалните фрагменти, следствие на което възникват чисто технически сложности за тяхната витрификация.

### **Криоконсервация и автоложна трансплантация на човешка овариална тъкан**

През 2003г. овариални фрагменти бяха замразени при 24-годишна жена с III стадий на Ходжкинов лимфом. Тъканта бе получена в Университетска болница „майчин дом“ от екип под ръководството на доц. Доганов. Криоконсервацията бе извършена от нашият екип с помощта на програмен замразител, под защитата на комбинация от криопротектори (6%

ДМСО, 6% ЕГ и 0.15М захароза). Замразената тъкан бе съхранявана в течен азот в продължение на две години в криобанката за стволови клетки, репродуктивни клетки и тъкани“ в Медицински център Димитров. След успешно проведено лечение при пациентката бе регистрирана преждевременна менопауза. През 2005г., след размразяване на яйчниковите експланти, се направи ортотропна автотрансплантация чрез лапаротомия. Жената понесе добре процедурата и възстановяването бе нормално. Отчетено бе възстановяване на секрецията на естрадиол четири месеца след операцията. Нямаме информация за настъпила бременност. Проследяването на състоянието на пациентката бе прекратено поради заминаването и в чужбина. Резултатите са докладвани на научни форуми и бяха широко отразени в обществената преса (Фиг.27). Това е първият и към момента единствен случай на трансплантация на овариална тъкан в нашата страна. В момента подобни операции не се провеждат поради липса на законова уредба.



Фиг.27. Публикация във вестник 24 часа, отразяваща трансплантацията на овариална тъкан

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Криоконсервацията на яйчникова тъкан е съвременна биотехнология, която намира все по-широко приложение в репродуктивната медицина. Тя се състои от различни етапи (получаване, изследване, обработка на тъканта, криоконсервация, съхранение, размразяване, трансплантация, проследяване на пациента и др.), като всеки от тях има своето значение за крайната успеваемост. За съжаление, ефективността на процедурата е ниска, към момента в световен мащаб са родени малко над 100 деца след трансплантация на замразени овариални фрагменти. Все още има редица неизяснени въпроси, касаещи подготовката на тъканта и самият процес на консервация. С настоящия дисертационен труд се постаряхме да дадем отговор на част от тях. Следва да се отбележи, че в България за първи път се провеждат подобен род изследвания. За тях екипът ни бе удостоен с наградата “Signum Laudis Pro Scientiae Meritis” за най-добра разработка в областта на медико-биологичните науки за периода 2002-2003. Получените резултати най-общо могат да бъдат разпределени в три основни групи:

### ***1. Култивиране *ин-витро* и изследвания върху овариални клетки и фрагменти***

В хода на експериментите бе показано, че овариалните клетки се характеризират с добра пролиферативна активност и могат успешно да бъдат култивирани *инвитро* при съблюдаването на определени условия. Предлаганите от фирмите готови среди за клетъчно култивиране, суплементирани с 10% фетален серум и гонадотропни хормони (чист ФСХ или комбинация ФСХ/ЛХ), осигуряват добри условия за растежа и запазване на физиологичните свойства на клетките. Те са криоустойчиви и използваните от нас технологии за замразяване запазват във висока степен виталитета им. Установено бе, че етиленгликолят е по-слабо токсичен от другите тествани криопротектори, а същевременно има добро криозащитно действие, което ни дава основание да го предложим за практическо приложение в центровете по репродуктивна медицина. Създадената от нас криобанка за човешки овариални клетки и фрагменти гарантира наличието на материал за бъдещи научни изследвания, обмен между научните звена, използването им в лабораторната практика за ко-култивиране и др.

Яйчниковите фрагменти и съдържащите се в тях или изолирани фоликули са сравнително „по-труден“ обект за култивиране. Независимо от постигнатите от нас успехи



в оптимизиране на условията за *ин-витро* матурация (чрез използване на ко-култивиране и нискодозирани физични въздействия), необходими са по-нататъшни изследвания за разработката на подходяща технология. Ксенотрансплантацията (на имунодефицитни мишки) дава възможност за *ин-виво* матурация на фоликулите и изследване на процесите, протичащи в овариалната тъкан.

## ***2. Сравнителни изследвания върху методи за криоконсервация на овариални фрагменти***

Получените от нас резултати показват, че програмното замразяване е по-ефективен метод за криоконсервация на човешка овариална тъкан в сравнение с витрификацията. Независимо от това, изхождайки от чисто технологическите преимущества на технологията за витрификация (икономия на време, не е необходима скъпоструваща апаратура и др.), считаме, че са необходими допълнителни изследвания, позволяващи адаптирането на метода за практически нужди. Надяваме се, че получените от нас резултати и предложените експериментални постановки ще са от значение в тази област.

## ***3. Изследвания, имащи пряко отношение към практическото приложение и оптимизиране на отделни етапи от технологията за криоконсервация на овариална тъкан***

Експерименталните ни данни показват, че е добре да се замразяват фрагменти не само от кортикалния слой, а в тях да присъства и част от медулата. Това е особено важно за практическото приложение на метода, тъй като медулата има значение за реваскуларизацията и подхранването на фоликулите при евентуална бъдеща трансплантация на размразената тъкан.

Преинкубацията на овариалните фрагменти при 5<sup>0</sup>C преди замразяване не само не уврежда фоликулите, но и намалява експресията на фосфатидилсерин след размразяване, което е признак за по-добро запазване виталитета на клетките. Това е важно от практическа гледна точка, тъй като показва, че не е нужно да се пристъпи веднага след получаване към обработка и консервация на тъканта, а тя може да бъде съхранявана (и евентуално транспортирана) при хладилна температура за срок от 24 часа. Надяваме се проведените от нас експерименти и получените резултати да допринесат за задълбочаване на изследванията в тази област и практическото приложение на метода в медицината.

## ИЗВОДИ

1. Човешките овариални клетки (смесена култура) при култивиране *ин-витро* (монослой клетки) се характеризират с умерена пролиферативна активност, секреция на стероидни хормони (естрадиол и прогестерон) и ароматазна активност (способност да ароматизират тестостерон). Добавянето към средата за култивиране на гонадотропни хормони води до увеличаване на секрецията на естрадиол от овариалните клетки и може да се използва като функционален тест за секреторната им активност.
2. Краткотрайното инкубиране на човешки овариални клетки с криопротекторите глицерол, етиленгликол и диметилсулфоксид не влияе върху способността им за пролиферация, но води до снижаване на тяхната секреторна и ароматазна активност. Етиленгликолят е по-слабо токсичен за клетките от глицерола и диметилсулфоксида.
3. Човешките овариални клетки експресират SSEA-1, SSEA-4, Oct3/4, Nanog и Sox2. Количеството клетки, експресиращи маркери за плюрипотентност, намалява с напредване на възрастта на жената.
4. Овариалните клетки се отличават с добра криотолерантност. Витрификацията е по-ефективен метод за консервацията им в сравнение с програмното замразяване или конвенционалния метод (на парите на азота).
5. Култивирането на овариални фрагменти в условията на микровибрации води до по-добро запазване на структурата на тъканта и развитието на фоликулите *ин витро*.
6. Ко-култивирането със стромални овариални клетки или мезенхимни стволови клетки в 3D-система „висяща капка“ е ефективен метод за оптимизиране на условията за матурация на овариалните фоликули.
7. Програмното (бавно) замразяване на овариални фрагменти е ефективен метод за криоконсервация и води до по-добро запазване на морфофункционалните показатели на тъканта в сравнение със замразяването чрез витрификация

8. Преинкубацията на овариалните фрагменти при 5<sup>0</sup>С преди замразяване не уврежда фоликулите, но намалява експресията на фосфатидилсерин след размразяване, което е признак за по-добро запазване виталитета на клетките
9. Наличието на медула в замразяваните овариални фрагменти спомага за по-добрата им преживяемост след размразяване и трансплантация
10. Ксенотрансплантацията е ефективен метод за преценка на функционалното състояние на размразената овариална тъкан

## **ПРИНОСИ**

1. За първи път в България са проведени комплексни криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и фрагменти и е осъществена криоконсервация на тези биообекти
2. За първи път в България е осъществена автотрансплантация и ксенотрансплантация на замразена човешка овариална тъкан
3. Изследвани са процесите, протичащи при култивиране *ин-витро* на овариални клетки и фоликули и са предложени методи за оценка на функционалната им активност, основаващи се на базалната им и стимулирана секреция на естрадиол и способността им да модифицират средата в системи за ко-култивиране.
4. За първи път е изследвано влиянието на периода на инкубация преди замразяване и наличието на медула във фрагментите върху ефективността на процеса на криоконсервация, което е важно от практическа гледна точка.
5. Предложени са нови подходи за *ин-витро* култивиране и криоконсервация на овариални клетки и фрагменти.

## Публикации по темата на дисертационния труд

1. Isachenko V., **TODOROV P.**, Isachenko E. et al. Cryopreservation and xenografting of human ovarian fragments: medulla decreases the phosphatidylserine translocation rate. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2016, 14, 1: 79-88 *IF=2,849*
2. Isachenko V., Sterzik K., Maettner. R., **TODOROV P.** et al. In vitro micro-vibration increases implantation rate after embryonic cell transplantation. *Cell Transplantation* 2016, 12 *IF=3,57*
3. Isachenko V., **TODOROV P.**, Isachenko E. et al. Long-time cooling before cryopreservation decreased translocation of phosphatidylserine (Ptd-L-Ser) in human ovarian tissue. *PlosOne* 2015, 6, 1-14 (DOI: 10.1371/journal.pone.0129108) *IF=3,534* 3 цитирания
4. **TODOROV P.**, Petrova N., Mihova A., Guenova M., Arabadzhiev B., Hristova E. The female age influences expression of pluripotent stem cells markers in human ovarian cells. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 2015, 68, 1: 65-70 *IF=0,284* 1 цитиране
5. Rahimi G, Isachenko V, Kreienberg R, Sauer H., **TODOROV P.**, Tawadros S, Mallmann P, Nawroth F and Isachenko E. Re-vascularisation in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2010, 149(1): 63-67 *IF=1,974* 55 цитирания
6. **TODOROV P.**, Hristova E., Konakchieva R., Michova A., Dimitrov Y. Comparative studies of different cryopreservation methods for mesenchymal stem cells derived from human fetal liver. *Cell Biol. Int.* 2010, 34: 455-462 *IF=1,64* 20 цитирания
7. Rahimi G., Isachenko V., **TODOROV P.**, Tawadros S., Mallmann P., Nawroth F. and Isachenko E. Apoptosis in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *CryoLetters* 2009, 30, 4:, 300-309 *IF=1,245* 30 цитирания
8. Isachenko V., Isachenko E, Weiss J.M., **TODOROV P.** and Kreienberg R. Cryobanking of human ovarian tissue for anti-cancer treatment: comparison of vitrification and conventional freezing. *CryoLetters* 2009, 6: 449-454 *IF=1,245* 60 цитирания
9. **ТОДОРОВ П.** Витрификацията – ефективен метод за криоконсервация на човешки ооцити. *Ембриология* 2009, 4, 1: 13-17

10. Isachenko V., **TODOROV P.**, Dimitrov Y., Isachenko E. Integrity rate of pronuclei after cryopreservation of pronuclear-zygotes as a criteria for subsequent embryo development and pregnancy. *Human Reproduction* 2008, 23, 4:819-826 *IF=3,86* 20 цитирания
11. Тодрин А.Ф., Чуб Н.Н., Липина О.В., Чеканова В.В., Нипот Е.Е., Пиняев В.И., **ТОДОРОВ П.Т.**, Горобченко О.А. Биофизические характеристики фолликулярной жидкости яичника человека до и после низкотемпературного консервирования. *Problems of cryobiology* 2008, 4: 420-422
12. Hristova, E., **TODOROV. P.**, Mihova, A., Taskov, H., Dimitrov, Y. Characterization of mesenchymal stem cells from human fetal liver. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, 2007, **60** (12) pp. 1321-1326. *IF=0,106*
13. **ТОДОРОВ П.**, Конакчиева Р., Димитров Й., Славчев Б., Новачков В. Криоконсервация на човешка овариална тъкан – нашият опит. *Ембриология* 2006, 1: 4-8
14. **TODOROV P.**, Konakchieva R., Dimitrov J., Chub N., Petrenko Y. Vitrification of human embryonic stem cells. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 2005, 58, 9:1095-1100
15. Чуб Н.Н., Грищенко В.И., Демина Л.Г. **ТОДОРОВ П.Т.** Влияние субнизиких температур на морфофункциональную сохранност овариальной ткани человека. *Problems of Cryobiology* 2005, 15, 3: 250
16. **ТОДОРОВ П.**, Конакчиева Р., Димитров Й. Ефект на рекомбинантен ФСХ върху синтеза и секрецията на естрадиол-17-бета от човешки гранулозни клетки ин-витро. *Ендокринология* 2005, 10, 3: 149-153
17. **ТОДОРОВ П.** Криоконсервацията на репродуктивни клетки и тъкани – важно звено програмите за асистирана репродукция. *Репродуктивно здраве* 2004, 2
18. **ТОДОРОВ П.**, Стаменов Г., Димитров Й. Криоконсервация на човешка овариална тъкан – поглед в бъдещето. *Репродуктивно здраве* 2002, 3: 12
19. **TODOROV P.**, Konakchieva R., Stamenov G., Todorov I., Novachkov V., Dimitrov Y. In vitro stimulation of the secretion of 17-b –estradiol and progesterone in a primary ovarian cell culture. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 2002, 55, 6: 111-115

20. **TODOROV P.**, Stamenov G., Todorov I., Novachkov V., Dimitrov Y, Konakchieva R. Evaluation of the secretory capacity of ovarian tissue after treatment with different cryoprotectants by in vitro culture system. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 2002, 55, 3: 103-108
21. Stamenov G., **TODOROV P.**, Konakchieva R. et al. Functional viability of human ovarian tissue before and after freezing at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Gynecological Endocrinology* 2002, 16 (Suppl.1): 53
22. Stamenov G., **TODOROV P.**, Konakchieva R. In vitro evaluation tests of the functional viability of human ovarian tissue before and after exposure to cryoprotectants. *Climacteric* 2002, 5 (Suppl.1): F-01-04
23. **Тодоров П.**, Димитров Й. Витрификация на човешки ембриони, получени ин-витро. *Андрология* 2001, 10 (1): 10-11
24. **ТОДОРОВ П.**, Иванова Е., Димитров Й., Начев А., Стаменов Г. Влияние на различни системи за ко-култивиране върху мотилитета и преживяемостта на човешки сперматозоиди. *Акушерство и гинекология* 2001, 42, 2: 26-28
25. **ТОДОРОВ П.**, Димитров Й. Възможности за използване на системи за ко-култивиране в асистираните репродуктивни технологии. *Акушерство и гинекология* 1998, 37, 2: 43-45
26. **TODOROV P.**, Isachenko V., Isachenko E. Cryoconservation of oviductal epithelial fragments. *Annuaire de l'Univrsite de Sofia "St Kliment Ohridski"*, 1998, 88: 300-303
27. Isachenko V., Isachenko E., **TODOROV P.**, Soler C. Effect of bovine trophoblastic vesicles on rat embryo culture. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 1997, 50, 4: 115-116
28. Isachenko V., Isachenko E., **TODOROV P.** On the role of permeable cryoprotectants in ultrarapid freezing of rat embryos. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 1997, 50, 1: 95-96
29. **ТОДОРОВ П.**, Димитров Й., Лачев В., Цветков Й. Ко-култивиране на предимплантационни ембриони от плъхове с човешки овидуктални епителни фрагменти. *Ветеринарна медицина* 1997, 3 (1-2): 81-83

30. Gristchenko V., Isachenko E., Ostashko F., Khromushkin N., Kramar M., Gerodes A., **TODOROV P.** Cryopreservation of the epithelial tissue of the human oviduct by direct immersion into liquid nitrogen. *Problems of Cryobiology* 1996, 1: 47-50
31. Isachenko V., Isachenko E., **TODOROV P.**, Ivanova K. Vitrification and ultrarapid freezing of mammalian embryos. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 1992, 45, 6: 101-104 IF=0,08

#### Доклади на научни форуми по темата на дисертационния труд

1. Stamenov G., **TODOROV P.**, Konakchieva R., Novachkov V., Dimitrov Y. The functional viability of human ovarian tissue before and after freezing at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *10-th World Congress of Gynecological Endocrinology, Wroclaw, Poland, September 21-24 2002*
2. **TODOROV P.**, Stamenov G., Konakchieva R., Dimitrov Y., Novachkov V. Cryobanking of human ovarian tissue – experience from Bulgaria. *1<sup>st</sup> World Congress on Ovarian Cryopreservation & Ovarian Transplantation, 27-28 June 2003, Brussels*
3. **ТОДОРОВ П.Т.**, Чуб Н.Н., Грищенко В.И., Демина Л.Г. Влияние субнизиких температур на морфофункциональную сохранность овариальной ткани человека. *Международная конференция “Структурная и функциональная организация стволовых клеток в условиях низких температур”. Харьков, Украина, 22-24 ноября 2005г.*
4. Грищенко В.И., Чуб Н.Н., Чадаев В.Е., Демина Л.Г., **ТОДОРОВ П.Т.** Низкотемпературное консервирование ткани яичника человека. *III Всероссийский симпозиум „Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии”, Москва 25-26 мая 2007г.*
5. Стаменов Г., **ТОДОРОВ П.**, Димитров Й., Новачков В., Конакчиева Р. Криоконсервацията и трансплантацията на човешка овариална тъкан – завръщане от бъдещето. *IX Национален Конгрес по акушерство и гинекология (с международно участие), 27-30 Септември 2001, Варна: 1.5.7*

6. **ТОДОРОВ П.**, Стаменов Г., Новачков В., Димитров Й., Конакчиева Р. Култивиране на човешки овариални клетки и фрагменти. *IX Национален Конгрес по акушерство и гинекология (с международно участие), 27-30 Септември 2001, Варна: 1.5.8*
7. **ТОДОРОВ П.**, Стаменов Г., Новачков В., Димитров Й., Конакчиева Р. Криоконсервация на човешка овариална тъкан. *IX Национален Конгрес по акушерство и гинекология (с международно участие), 27-30 Септември 2001, Варна: 1.5.9*
8. Стаменов Г., **ТОДОРОВ П.**, Димитров Й., Новачков В., Конакчиева Р., Тодоров Я. Криоконсервираната човешка овариална тъкан при жени с малигнени хематологични заболявания – новата надежда. *7-ми Национален Конгрес по клинична и трансфузионна хематология. 9-10 Октомври 2003, София*
9. **TODOROV P.**, Stamenov G., Konakchieva R., Dimitrov Y., Novachkov V. In-vitro evaluation tests of the functional viability of human ovarian tissue before and after freezing. *X Ybilee International Symposium of Immunology of Reproduction. 4-6 September 2003, Varna*
10. Стаменов Г., Доганов Н., **ТОДОРОВ П.**, Димитров Й., Лазаров Р. Ортотропна автотрансплантация на човешка овариална тъкан на жена след лечение на Ходжкинов лимфом. *Шести Национален Конгрес по Стерилитет, Контрацепция и хормонзаместителна терапия с международно участие, Боровец 2005.*
11. Тодоров П., Димитров Й. Първи случай на бременност в България след оплождане и трансфер на размразени яйцеклетки. *10-ти Национален Конгрес по стерилитет, контрацепция, хормонзаместителна терапия и гинекологична ендоскопия с международно участие, 23-26 Април 2009, Несебър*
12. **ТОДОРОВ П.** Криоконсервацията на репродуктивни клетки и тъкани – важно звено в програмите за асистирана репродукция. *Обучителен курс за ембриолози, Организиран от Българска асоциация по човешка репродуктивна ембриология, 10 декември 2010, София, България*
13. **ТОДОРОВ П.**, Исаченко Е, Димитров Й, Исаченко В. Криоконсервация на човешка овариална тъкан – програмно замразяване и витрификация. *12-ти Национален*



*конгрес по стерилитет, контрацепция, хормонозаместителна терапия и гинекологична ендоскопия с международно участие. Боровец, 17-20 март 2011.*

14. **TODOROV P.** Ovarian stem cells. Ovarian Tissue Cryobanking: An Option for Fertility Preservation. *BARHE Workshop "Focus on stem cells in reproduction", 13<sup>th</sup> October 2012, Vitosha Hall, Kempinski Hotel Zografski Sofia*
15. **TODOROV P.,** N. Petrova, E. Hristova, B. Bivolarski . Cryopreservation of Ovarian Tissue. *Международна юбилейна научна конференция „90 години ветеринарномедицински факултет и висше ветеринарномедицинско образование в България”. Стара Загора, май 2013г.*
16. **ТОДОРОВ П.,** Христова Е., Петрова Н., Чорбанов А. Ксенотрансплантацията като метод за изследване на човешка овариална тъкан след криоконсервация. *XVII Национален конгрес по стерилитет и репродуктивно здраве с международно участие, Боровец, 10-13 май 2016*
17. **ТОДОРОВ П.,** Христова Е., Чорбанов А. Ксенотрансплантацията като модел за изследване на функционалните показатели на човешка овариална тъкан. *Осма Работна среща „Експериментални модели и методи в биомедицинските проучвания” .14-16 юни 2017 г., София.*