

АВТОРСКА СПРАВКА ЗА ПРИНОСНИЯ ХАРАКТЕР НА ТРУДОВЕТЕ

Доц. Пламен Тодоров Тодоров, дбн

Авторът е представил списъци с 95 научни публикации и 98 участия в научни форуми. Общият брой на цитиранията е 306. Общ импакт фактор 50.

За участие в конкурса за заемане на академичната длъжност „професор“ авторът участва с 36 научни труда. От тях 18 са в международни и чуждестранни, а 18 – в наши научни списания и сборници материали от научни форуми. Авторът е представил и автореферат на дисертация – за придобиване на научната степен „доктор на науките“

В представените по конкурса научни трудове се очертават следните тематични направления:

1. СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

1.1. Мезенхимни стволови клетки (МСК)

Проведени са експерименти по изолиране, характеризиране, култивиране, криоконсервация и диференциация на МСК от хора, селскостопански и лабораторни животни.

- *Изследвания върху фетални клетки*

В сравнение с „възрастните“ феталните клетки се отличават с по-ниска степен на диференциация, по-висок потенциал за миграция и репопулация, ниска имуногенност, (слаба експресия на антигените на главния комплекс за тъканна съвместимост МНС-1 и МНС-2), възможност за дълготрайно култивиране ин-витро, без промяна на нормалния кариотип на клетките, притежават висока теломеразна активност, както и по-голяма дължина на теломерите, сравнително бърз растеж и скорост на делене, синтезират уникален комплекс от цитокини и растежни фактори, притежават имуномодулиращи свойства. Всичко това ги прави обещаващ обект за нуждите на клетъчната терапия и регенеративната медицина. Представените от автора трудове са посветени на изследвания върху фетални клетки от човек и овца.

Изолирани и култивирани са човешки фетални чернодробни клетки (от абортен материал). Получена е информация относно морфологичното и функционалното състояние на клетките (адхезивни свойства, пролиферативен потенциал, морфология – светлинна и електронна микроскопия, имунофенотипизиране, ниво на апоптоза, епигенетичен статус). Показано е, че клетките от адхезивната фракция морфологично съответстват на мезенхимни стволови клетки, способни са да се диференцират в адипоцити и остеобласти и са положителни по CD13, CD73, CD90 и CD105 (типични за мезенхимните стволови клетки) и отрицателни по хематопоеичните маркери CD34 и CD45. Сравнителните криобиологични изследвания показват, че програмното замразяване е по-добър метод за криоконсервация на този вид клетки в сравнение с витрификацията и конвенционалното замразяване (6,30).

За първи път са изолирани мезенхимни стволови клетки от овчи фетален черен дроб. Резултатите показват, че този вид клетки могат да бъдат многократно пасажирани и дълготрайно култивирани

без промяна в степента на диференциация, което ги прави удобен модел за изследвания върху МСК (13).

Резултатите са докладвани на редица наши и международни научни форуми. По темата е защитена една дисертация под ръководството на доц. П.Тодоров.

- *Изследвания върху МСК, изолирани от мастна тъкан*

Отработени са методи за изолиране и култивиране на човешки МСК от мастна тъкан. Проведени са сравнителни изследвания върху цитотоксичния ефект и криозащитното действие на различни проникващи и непроникващи криопротектори и техни комбинации, на базата на които е предложен подходящ метод за криоконсервация на МСК под защитата на 8.5% DMSO и HES (12). Показано е, че изолираните от мастна тъкан МСК са криотолерантни и запазват експресията на специфичните за тях маркери и способността си за диференциация след размразяване (23). Отработен е подходящ за практиката метод за криоконсервация на МСК. На тази база е създадена, регистрирана и лицензирана от Изпълнителна агенция по трансплантация (ИАТ) криобанка за човешки мезенхимни стволови клетки.

Изолирани и характеризирани са мезенхимни стволови клетки от подкожна и висцерална адипозна тъкан от зайци, като е изследвана способността им за индуцирана диференциация в адипогенно, остеогенно и хондрогенно направление (8).

По темата е защитена една дисертация под ръководството на доц. П.Тодоров

- *Изследвания върху МСК, изолирани от фоликуларна течност*

Показано е, че фоликуларната течност, получена при аспирация на фоликулите в хода на процедури за ин-витро оплождане, може да служи като източник на стволови клетки, които успешно се диференцират в различни клетъчни линии (24). Установен е селективен ефект на мелатонина (във физиологични концентрации) върху транскрипцията на фактори, регулиращи плурипотентността и диференциацията на клетките ин-витро (11).

В момента се разработва дисертационен труд под ръководството на доц. П.Тодоров, посветен на изследвания върху овариални стволови клетки

1.2. Хематопоеични стволови клетки (ХСК)

Проведени са експерименти по изолиране, характеризирание, култивиране и криоконсервация на ХСК от умбиликална кръв. Отработена и внедрена в практиката е методика за криоконсервация на ХСК, на базата на което е регистрирана и акредитирана от ИАТ банка за човешки ХСК. В момента в банката се съхраняват замразени проби на 419 пациента. Стволовите клетки са характеризирани по %CD34+ (и съответни субпопулации), колонообразуваща активност и др. показатели (18).

Изследван е ефектът на нискодозирани физични въздействия (микровибрации) върху клоногенния потенциал на ХСК. Показано е, че инкубирането в условия на вибрации ускорява формирането на колонии, но не влияе върху процентното им съотношение (7).

В сравнителни изследвания върху човешки и миши хематопоеични стволови клетки и миеломни клетъчни линии е изследвано действието на Erufosine като потенциален антираков препарат (antimieloma drug) и страничните му въздействия върху хематопоезата (3).

По темата е защитена една дисертация под ръководството на доц. П.Тодоров

1.3. Ембрионални стволови клетки

Отработена е методика за изолиране (чрез имунохирургия и микроманипулационни техники) и култивиране на клетки от вътреклетъчната маса на човешки бластоцисти, получени ин-витро. Показано е, че митотично-инактивирани (с митомицин) човешки МСК могат да се използват като фидерен слой за колонии ембрионални клетки. Проведени са сравнителни криобиологични изследвания върху колонии човешки ембрионални клетки (21,35). Установено е, че при използваните методи за замразяване клетките в най-висока степен запазват биологичните си свойства след витрификация под защитата на комбинация от проникващи и непроникващи агенти (етиленгликол и Фикол-70).

2. АСИСТИРАНА РЕПРОДУКЦИЯ

2.1. Оптимизация на методите за оплождане на ооцити чрез микроманипулационни техники (ICSI)

Внедрена е техника за оплождане на яйцеклетки чрез ICSI с помощта на Пиезо-микроманипулатор. Пиезо-асистираната манипулация намалява уврежданията на ооцита в процеса на инжектиране на сперматозоида. Родено е първото бебе в България и едно от малкото такива в света с помощта на новата технология (10).

2.2. Увеличаване на успеваемостта чрез изкуствена активация на яйцеклетки при пациенти с предишни неуспешни ICSI-процедури

Функцията на сперматозоида е не само да „предостави“ бащиния хаплоиден набор хромозоми, но и да активира яйцеклетката към делене и последващо развитие на ембриона (предаване на сигнал, който я освобождава от мейотичния арест). В тази връзка е изследвана възможността за изкуствена активация на ооцитите чрез инкубиране в среда, съдържаща калциев йонофор. За първи път е показано е, че освен за активиране на яйцеклетката към делене, активацията с йонофор след ICSI може да се използва за корекция на локализацията на пронуклеусите, което повишава качеството на получените ембриони (1,16). Методът е внедрен и се използва рутинно в Инвитро АГ медицински център Димитров.

2.3. Оптимизиране условията на култивиране на предимплантационни ембриони

В естествени условия оплождането става в ампулата на яйцепровода. С оглед имитиране на механичните процеси, протичащи при оплождане и преминаване на зиготата през маточните тръби (контракции на яйцепроводите и трептене на ресничките на овидукталния епител) е предложена и внедрена в лабораторната практика техника за култивиране на предимплантационни ембриони в условията на микровибрации, подобряваща успеваемостта на програмите за ин-витро оплождане. В рамките на клинично проучване е изследван ефектът на такъв вид култивиране върху различни показатели на новородените (2).

2.4. Оптимизиране на техниките за криоконсервация на гамети и ембриони

Внедрен в практиката в България е метод за витрификация на човешки ооцити. Родено е първото бебе в България след ин-витро оплождане на замразен ооцит и трансфер на получения ембрион (19).

Предложен е нов метод за витрификация на човешки зиготи (пронуклеарни ооцити), позволяващ избягването на риска от контаминация и кросконтаминация при контакта им с азот. Резултатите показват, че витрификацията чрез директно потапяне на оплодените ооцити в течен въздух е добра алтернатива на използването на нестерилен течен азот (4).

Разработен е достъпен и неизискващ специално оборудване метод за криоконсервация на мъжки гамети, позволяващ запазване на морфофункционалните им свойства. Направена е техническа обосновка на скоростта на охлаждане при конкретния метод. Проби семенна течност, замразени с помощта на предложената технология, са използвани в центрове за асистирана репродукция в България и Украйна, като са получени положителни резултати (32).

Предложен е подходящ за практиката метод за витрификация на мъжки гамети (17). Технологията е асептична и се използва при пациенти с ограничено количество сперматозоиди и предстоящо ICSI. За първи път в света са родени бебета след оплождане със сперматозоиди, получени чрез MESA TESE и замразени чрез витрификация (36).

3. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ЧОВЕШКИ И ЖИВОТИНСКИ СПЕРМАТОЗОИДИ

3.1. Стимулатори на мотилитета

Изследван е ефектът на вещества от групата на метилксантините върху мотилитета (различни кинетични параметри) на мъжки гамети. Установено е, че пентоксифилинът и вефилинът, както и оригиналните новосинтезирани метилксантини N61, T-1, VZ-5, AF-11, AF-12 и етофилин увеличават подвижността и преживяемостта на сперматозоидите както в нативна, така и в обработена семенна течност (14). Действието на препаратите е потвърдено и върху сперматозоиди от животни (15). По темата се разработва дисертационен труд под ръководството на доц. П.Тодоров.

Изследвано е влиянието на околонулевите температури и цитохром С върху активността на ензима сукцинатдеhidрогеназа (СДХ) в мъжки гамети. Установено е, че цитохром С повишава подвижността на сперматозоидите и активността на СДХ на 30% на етапа на рехабилитация след хипотермия. Подобен ефект има и добавянето на холинхлорид. Съвместното използване на двата препарата позволява да се намали тяхната действаща концентрация и да се усили стимулиращия им ефект (28,29). На тази база е предложен метод за подобряване на качеството на гаметите преди интраутеринна инсеминация.

Показано е, че системите за ко-култивиране на мъжки гамети със соматични или мезенхимни стволови клетки, освен за подобряване мотилитета на гаметите, могат да се използват и като тест за функционална активност на клетките от фидерния слой преди и след замразяване (25).

3.2. Кробиологични изследвания

Проведени са експерименти по изучаване влиянието на широка гама проникващи и непроникващи криопротектори и техни комбинации (концентрация на криопротектора, температура и време на експозиция) върху морфокинетични характеристики на човешки сперматозоиди (22).

Изследвано е влиянието на хипотермията (съхранение при температура 10°C в продължение на 24 и 48 часа върху активността на акрозина на сперматозоидите. Показано е, че ниските положителни температури водят до необратимо понижаване на активността на ензима (27).

Показано е, че нискоинтензивното лазерно третиране (дължина на вълната 638,7 нм) на сперматозоиди от бик увеличава криорезистентността на гаметите (31). Понастоящем под ръководството на доц. П.Тодоров се разработва дисертационен труд, касаещ влиянието на нискодозирани физични въздействия върху гаметите.

Изследвани са промени в мотилитета, капацитацията, акрозомната реакция и мембранния потенциал на митохондриите след различни методи на криоконсервация на човешки сперматозоиди. Показано е, че витрификацията на гаметите (включително такива, получени чрез MESA и TESE) без използването на криопротектори е подходящ метод за замразяване (36).

3.3. Влияние на мелатонина

Изследвано е действието на мелатонина и наличието на рецептори за мелатонин върху сперматозоидите. Демонстрирана е локализация на рецептор за мелатонин тип 1 (MT1) върху мембраната на човешки сперматозоиди. Изследван е ефектът на семенната плазма върху експресията на рецептора (9). Въпросът относно молекулните механизми на действие на хормона е дискутиран във водещото списание в областта на репродуктивната медицина *Fertility and Sterility* (5).

3.4. Проучвания върху сперматозоиди от търтеи

За първи път са изследвани морфологични и функционални характеристики на сперматозоиди от медоносна пчела (*Apis Mellifera L.*). Проучено е влиянието на различни начини на обработка и условия на съхранение върху биологичните свойства на сперматозоиди от търтеи (33,34). На базата на получените резултати са предложени методи за хипотермично съхранение и криоконсервация на гаметите. Това е важно с оглед производството на пчели-майки чрез инструментално осеменяване рано пролетта и късно есента, когато в семейството липсват търтеи, както и за създаването на генетична банка с търтеева сперма от различни селектирани породи, линии и хибриди, която по-късно може да се използва в селекционния процес като бащин материал.

4. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ НА ОВАРИАЛНА ТЪКАН

За първи път в нашата страна са проведени комплексни кробиологични изследвания върху овариални клетки и фрагменти. Проведени са експерименти по ксенотрансплантация на свежи и замразени човешки овариални фрагменти (на имунодефицитни мишки). Предложен е метод за криоконсервация и е осъществена първата и засега единствена в страната автотрансплантация на човешка овариална тъкан. По темата през 2018г. е защитен дисертационен труд за придобиване на научната степен „доктор на науките“ по специалност клетъчна биология (автореферат).