

До Председателя на научното жури,
определено със Заповед NoPD 38-379/06.06.2018г.
на Ректора на СУ „Св. Кл. Охридски“ – София

СТАНОВИЩЕ

**от доц. Пламен Тодоров Тодоров, д.б.н., Институт по биология и имунология на
размножаването – БАН**

Относно: Дисертация на тема: *„Оценка на фенотипни и генетични биомаркери на човешки гранулозо-лутеинни клетки и фоликулна течност за успешно приложение на процедури за асистирана репродукция (АРТ)“*, представена от **д-р Георги Иванов Николов**, за присъждане на образователна и научна степен „доктор“, в професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност „Клетъчна биология“. Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита по предложение на Катедра „Цитология, хистология и ембриология“ на Биологически факултет, СУ-София. Процедурата е приета и журито е утвърдено на заседание на Факултетния съвет на СУ (Протокол № 07/29.05.2018 г.).

Биографични данни Георги Николов е роден 1970г. в София, където завършва основното си и средно образование. През 1995г. се дипломира като магистър по медицина в МУ-София, а през 2003г. получава специалност „Акушерство, гинекология и репродуктивна медицина“. Първоначално работи като АГ-специалист в САГБАЛ „Шейново“, а от 2005г. – в МЦ „Репрбиомед“, където понастоящем ръководи и лабораторията по асистирана репродукция. През 2006г. завършва икономика в УНСС – София (магистър, специалност „Здравен мениджмънт“). Владее английски и руски език. Член е на редица международни и наши научни асоциации. Многократно е специализирал в чужбина. От 2008г. е сертифициран „Senior Clinical Embryologist“ от Европейската асоциация по човешка репродукция и ембриология“. Извършва експертна дейност в помощ на различни държавни органи в областта на медицината. Женен, с две деца.

Актуалност на проблема Безплодието е важен медико-социален проблем, засягащ 10-15% от жените в репродуктивна възраст. При много от тях единствената опция за лечение на инфертилитета е използването на асистирани репродуктивни техники. За съжаление ефективността ин-витро оплождането е ниска, рядко надхвърля 25-30%. Това налага бъдещи изследвания по оптимизация на методите за диагностика, стимулационните протоколи и лабораторни техники. В този аспект считам, че представеният ми за рецензиране труд е особено актуален, тъй като не само води до по-добро разбиране на процесите, протичащи при фоликулогенезата, овогенезата, влиянието на различни интрафоликуларни и др. фактори, но и дава насоки за по-добра прогноза за успеваемостта на методите за асистирана репродукция и до възможност за тяхното оптимизиране.

Анализ и оценка на дисертационния труд

Структура Дисертацията е написана на 116 стр., като е структурирана съгласно възприетите стандарти за този вид научен труд. Тя включва основните раздели: Въведение – 2 стр., Литературен обзор - 35 стр., Мотиви, цел и задачи на дисертационния труд – 2 стр., Материали и методи – 14 стр., Резултати и дискусия – 24 стр., Изводи и приноси - 2 стр. и Литературен обзор – 11стр. Включен е и списък на 6 публикувани от д-р Николов научни статии и 6 участия с доклади на научни форуми. Налице е добър баланс в структурата между отделните части. Дисертационният труд е онагледен с 32 фигури и 11 таблици.

Литературен обзор Литературният обзор е балансиран като обем и съдържание и показва много добро познаване на публикуваната информация, свързана с темата на дисертацията. Използвани са общо 195 литературни източника. Направен е задълбочен преглед на структурата и функциите на яйчниците, като е отделено специално внимание на фоликулогенезата и нейната ендокринна и паракринна регулация. Разгледана е също така ролята на оксидативния стрес в яйчниковите фоликули и механизмите на антиоксидантна защита. Представени са съвременни данни, касаещи имунологичното безплодие и ролята на различните видове антиовариални антитела. В отделна глава е описана ролята на гранулозните клетки във фоликуло- и овогенезата, процесите на апоптоза и междуклетъчните интрафоликуларни взаимодействия. Голямото количество информация е добре систематизирано, обобщено и онагледено с четири подходящи фигури. Представянето на литературните данни е ясно, направено е професионално и включва всички основни постановки, които са необходими за обосноваване и разбиране на извършените изследвания.

Цел на работата е проучване на молекулярно-генетични и имунологични биомаркери при жени с безплодие, което би довело до по-добро разбиране на тези процеси, а също и до по-добра прогноза за успеваемостта на методите за асистирана репродукция. Така поставена цел предполага решаването на 11 експериментални **задачи**, които са ясно и точно дефинирани и отразяват основните моменти от съдържанието на дисертационния труд.

Материал и методи Проучванията са извършени на базата на МЦ „РепроБиоМед“, където работи дисертантът, ИБИР-БАН и Биологическия факултет на СУ. Считаю, че работата е пример за ползотворна колаборация между научни институции и частен медицински център.

Като изследователски материал са използвани кръвни проби, фоликуларна течност, гранулозни клетки, гамети и ембриони, получени от пациенти, участващи в програмите за асистирана репродукция. Експерименталните методики са описано достатъчно подробно, което дава възможност за тяхното възпроизвеждане. Използването на съвременна апаратура и среди и консумативи на водещи фирми производители гарантира достоверността на получените резултати.

Основна част по обем и по значимост в дисертацията е разделът **„Резултати и Дискусия“**. Получените експериментални данни са изложени и дискутирани в ред, който следва дефинираните задачи на дисертационния труд.

При голям брой пациенти са изследвани характеристики (включително диференциращи) на гранулозо-лутеинни клетки и състава на фоликулната течност от преовулаторни фоликули, като са идентифицирани потенциални биомаркери за статуса на субфертилитет при жени, участващи в програмите за ин-витро оплождане. Показано е, че наличието на AGA не повлиява значимо отговора към контролираната овариална стимулация, но е в негативна корелация с качеството на получените овоцити. Установена е позитивна връзка между наличието на AGA, степента на апоптоза в GLCs и концентрацията на Th1 цитокини във FFs на инфертилни жени. Повишените нива на апоптоза и на TNF-алфа и IFN-гама водят до смутена фоликулогенеза, изразяваща се намаляване на броя на качествените овоцити след контролирана овариална хиперстимулация и фертилизационната им способност, респективно до по-лоши резултати по отношение на получените бременности, особено при жени с овариален фактор за безплодие. Това потвържда хипотезата, че имунологични механизми, в частност анти-GLC антитела (и техните антигени) играят важна роля в случаи на инфертилитет.

Установено е, че матurationната компетентност на развиващия се овоцит зависи от експресията на специфични генни продукти в заобикалящите го гранулозни и кумулусни клетки, които осигуряват адекватна антиоксидантна защита. Високите нива на вътреклетъчните анти-оксиданти супероксид дисмутаза и каталаза се асоциират с ниска степен на апоптоза и с по-добри резултати след IVF-ET, което открива възможности за подобряване на резултатите чрез антиоксидантна терапия. Предвид установената връзка между нивата на апоптоза в GLCs и CCs и броя на предовулаторните фоликули, броя на добитите и оплодени овоцити, може да се приеме, че степента на апоптоза в GLCs/CCs е важен маркер, корелиращ с успеваемостта при IVF-ET.

Човешките гранулозни клетки експресират рецептори за мелатонин MT1 и MT2. Ин-витро мелатонин в концентрация 10 nM повишава експресията на ароматаза P450 в клетъчни култури на гранулозо-лутеинни клетки, което е съпътствано от интензивни промени в експресията на алфа-тубулин и рецептора за мелатонин. Резултатите показват, че експресията на P450 – ароматаза и динамиката на цитоскелетните промени зависят от наличието и активирането на рецептори за мелатонин тип MT1 и MT2.

Експресията на LOX в човешки кумулусни клетки предполага, че тя може да бъде важен индикатор за развитието на овоцитите и също да бъде потенциален биомаркер за тяхната фертилизационна компетентност, нещо което следва да бъде допълнително проучено. При жени с репродуктивни проблеми, особено при тези с вторичен стерилитет е установена повишена експресия и на транскрипционния фактор NF-κB.

Получените резултати са подкрепени със съответния доказателствен материал – снимки от Western-blot, електрофорези, фазово-контрастна и конфокална микроскопия и др. Много добро впечатление прави добрата статистическа обработка на данните.

В **Заключението** в обобщен вид са представени основните резултати от дисертационния труд и тяхното значение.

Изводи и приноси От извършените изследвания са изведени 10 обобщени извода и са формулирани 3 приноса, които приемам.

Книгопис Литературната справка е достатъчно изчерпателна. Цитирани са 195 литературни източника. 77 от тях (40%) са от последните 10 години.

Критички бележки На някои места съкращенията са на кирилица, на други на латиница. Подобна е ситуацията и с използваната терминология. На места има повторения и др. стилистични грешки. Бих желал да отбележа, че забележките ми са чисто технически и в никакъв случай не омаловажават достойнствата на дисертационния труд.

Публикации във връзка с дисертацията Резултатите са отразени в 6 научни публикации на английски език. За две от тях авторът не е представил доказателствен материал (едната е представена във вида, в който е подадена, но липсва документ, удостоверяващ, че е приета за печат, а на другата е представен само абстракта). Независимо от това, останалите четири, всичките в реномирано издание с импакт фактор, са напълно достатъчни за покриване на законовите изисквания и препоръчителните критерии на СУ (минимум 2 публикации). Следва да се отбележи, че кандидатът има значително по-голяма публикационна активност – общо над 40 публикации в наши и международни издания, голяма част от които са посветени на асистираната репродукция, и макар и непряко, имат отношение към темата на дисертационния труд.

Афторефератът отразява всички основни резултати и приноси на дисертационния труд и дава ясна представа за проведените изследвания. Според мен в него излишно подробно са описани използваните методики. Прилагането на списък на използваните литературни източници в автореферата също е ненужно.

Към кандидата имам следния **въпрос**: В материал и методи е написано, че жените от изследваните групи са с нива на ФСХ и ЛХ на 1-3 ден от менструалния цикъл под 12.5 МЕ/мл, а по нататък е указано, че в групата на пациентките с овариален фактор са включени и такива с намален яйчников резерв на база нивата на ФСХ 3-ти ден от цикъла. Не си ли противоречат двете твърдения?

Заключение Считам, че поставената цел и задачи са успешно изпълнени. Представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение, както и на препоръчителните критерии за придобиване на научни степени в СУ за професионално направление «Биологически науки». Отчитайки усвоените и приложени от докторанта широка гама методи на изследване, правилно планираните и проведени експерименти, получените резултати, направените обобщения и изводи, оценявам работата **ПОЛОЖИТЕЛНО**. Позволявам си да предложа на членовете на почитаемото Научно жури също да гласуват положително и да присъдят на Георги Иванов Николов образователната и научна степен „доктор“ по научна специалност „Клетъчна биология“.

Дата: 17.07.2018г.

Изготвил становището:

/доц. Пламен Тодоров, д.б.н./