

СТАНОВИЩЕ

От проф. Красимира Олегова Тодорова-Хайрабедян, дбн

Ръководител Лаборатория по репродуктивни ОМИКс технологии при Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ – БАН

Относно защита на дисертационен труд на **Любослава Димитрова Вълкова**, Старши клиничен ембриолог в САГБАЛ”Д-р Щерев” ЕООД

За придобиване на **образователна и научна степен „Доктор“** в област на висше образование

4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, научна специалност Клетъчна биология 01.06.18

На тема **„Оценка и оптимизиране на витрификацията при човешки предимплантационни ембриони и яйцеклетки“**

С Научни ръководители: Проф. д-р Атанас Щерев, дм
Чл.кор. проф. дбн Румен Панков

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на хартиен /електронен носител е в съответствие с Процедура за придобиване на ОНС „доктор“ в Факултета по Биология (БФ) на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ (СУ) и съответния Правилник на БФ на СУ.

Докторантката е приложила 7 научни публикации, в реферирани и рецензирани списания, 3 от които са с импакт фактор/импакт ранг (SJR), и 11 заглавия на съобщения от научни форуми, от които 3 са представени устно от автора. Дисертационния труд е прилежно оформен.

Докторантката Любослава Димитрова Вълкова е завършила Магистърска програма „Клетъчна биология и биология на развитието“ в Биологическия факултет на Софийския Университет „Св. Климент Охридски“ Охридски”, София, България, с отличен успех.

В момента Любослава Вълкова е Старши клиничен ембриолог в САГБАЛ”Д-р Щерев” ЕООД, след като е работила 1 година като биолог-специалист в Институт по молекулярна биология, БАН, Секция „Структура и функция на хроматина“, където се запознава с методът RT-PCR, както и последователно 1 и съответно 16 години в АИПСМП „Д-р Атанас Щерев” ЕООД, и в САГБАЛ”Д-р Щерев” ЕООД, като ембриолог на различни експертни нива. Там тя се запознава с обработка на сперматозоиди, яйцеклетки, и ембриони с цел извършване на вътрематочни инсеминации, ин витро оплождане, ИКСИ, ембриотрансфер, замразяване, съхранение, размразяване и използване на сперматозоиди, яйцеклетки и ембриони. През този период Любослава Вълкова

става член на следните професионални организации в областта на асистираната репродукция: ЕВРОПЕЙСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО ЧОВЕШКА РЕПРОДУКЦИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ (ESHRE), БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО СТЕРИЛИТЕТ И РЕПРОДУКТИВНО ЗДАРВЕ (БАСРЗ), БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО ЧОВЕШКА РЕПРОДУКЦИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ (БАРЧЕ). Владее писмено и говоримо английски език на отлично ниво, както и испански език на средно ниво.

2. Актуалност на тематиката

През последните години настъпи промяна в демографското разпределение на населението, с нарастване на средната възраст за първа репродукция, поради кариерно развитие, докато в същото време се „подмладяват“ случаите на онкологични заболявания, което би довело до загуба на яйчниковата функция, а от там и до стерилитет, поради химио- или лъче- терапия. Това е особено голям проблем при нераждали жени без партньор и има не само медикобиологично, но и социално измерение. В тези и други случаи изискващи яйчникова криопрезервация поради очаквано последващо прилагане на асистирана репродуктивна технология, каквито са и донорските програми за яйцеклетки, налагат подобряване на ефективността на крио-съхранение на гаметите и на ембрионите, както и последващата оптимизация на процеса на ембриотрансфер.

Има редица индикации за криопрезервация на нетрансферирани ембриони, като предоставяне на допълнителна възможност за последващ трансфер при неуспех, или при желание за следваща бременност в по-късен етап, с цел избягване на хормоналната стимулация и фоликуларната пункция. Процедурата се налага и при противопоказания на ембриотрансфера, като развитие на усложнения на АРТ - овариален хиперстимуляционен синдром (OHSS), възникнал полип в кухината на матката по време на хормоналната стимулация, поява на маточно кървене, невъзможност за проникване в матката и пр. Криопрезервацията на яйцеклетки е важен етап от т.нар. „freeze all“ програми, както и от пренаталната генетична диагностика и скрийнинг за моногенни заболявания и анеуплоидии.

Настоящата дисертация представлява един много стойностен, продължил с години и обхващащ сигнификантно количество клинични случаи изследователски проект, който цели оптимизация на редица фактори, влияещи на криопрезервационния метод „*витрификация*“ приловен при човешки предимплантационни ембриони и яйцеклетки.

3. Познаване на проблема

Докторантката работи и изследва проблема в продължение на 17 години в ролята си на ембриолог в ин витро клиника. Събрани са данни от 2453 предимплантационни човешки ембриони, от 941 цикли, при 844 пациентки. В дисертационния труд са посочени 274 литературни източника, като въпреки че литературния обзор е разписан стегнато в 20 стр., използвания дидактичен подход и професионално структуриране, без излишни коментари е отражение на подхода на клиничния изследовател, т.к. са описани детайлно 25 различни топка. Данните от изследванията са представени на 15 научни форума за период от 9 години (2011-2020), както и в 9 научни публикации. В 11 от 15-те форума докторантката е първи автор, както и в 7 от 9-те статии по дисертационния труд.

Тези данни показват много добро познаване на проблема, което личи и от елегантното и точно въвеждане в проблема в главите въведение и литературен обзор, както и в професионалните коментари в глава обсъждане. В глава обсъждане докторантката е направила 72 цитирания на литературни източници при коментариането на своите данни.

4. Методика на изследването

Използвания методологичен подход е изключително професионален и показва едно много добре проведено клинично проучване. Изследвани са 844 пациентки, 941 цикли на размразен ембриотрансфер, при които са използвани общо 2453 предимплантационни човешки ембриони. Използвани са 10 метода прилагани в стандартната асистирана репродукция, както нови подходи. Използвани методи: класическо *in vitro* оплождане (IVF), денудация (оронване) на яйцеклетките и *интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоид* (ICSI), комбинация от двата метода за оплождане на яйцеклетките (IVF/ICSI), *биопсия* за изолиране на автоложни ендометриални клетки, *ко-култивиране на ембриони* с автоложни ендометриални клетки преди витрификацията, *свеж ембриотрансфер* (ET), *изкуствен колапс* (ИК), *витрификация* и размразяване на предимплантационни ембриони, витрификация и размразяване на яйцеклетки, размразен ембриотрансфер (PET).

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд е написан на 129 страници, онагледен е с 31 оригинални фигури, 34 таблици и 7 приложения. Цитирани са 274 литературни източника. Главите *Въведение* и *Литературен обзор* са разписани на 22 стр., глава *Материали и методи* е разписана на 10 стр., глава *Резултати* е разписана на 43 стр., разписана в 4 основни точки. Отчитане на преживяемостта на човешки предимплантационни ембриони след витрификация, Реализирани клинични бременности (КБ) след прилагане на криопрезервационния метод витрификация и последващ размразен ембриотрансфер (PET), анализ на преживяемостта на ембрионите и развиващите се бременности при "freeze all" програма. Анализа на резултатите от витрификация на яйцеклетки или предимплантационни ембриони по 24 параметъра са представени детайлно в главата *Резултати*. В глава *Обсъждане* на 15 стр. е представена връзката на получените данни с тези в публикуваната литература. Трудът е разписан и структуриран много добре, много лесен за четене и много разбираем. Логиката на изследването е лесно проследима, докторантката е самокритична и обективна към своите и литературните данни. Главите литературен обзор, материали и методи, резултати и обсъждането са впечатляващо подробни и информативни. Получените собствени данни са значителни и достатъчни за направените изводи. Приносите на автора са в изведените по елегантен начин алгоритми и критерии за подобряване на реалната успеваемост при клиничните бременности с над 31%.

В проучването се изследва до каква степен се засяга преживяемостта след размразяване на човешки предимплантационни ембриони замразени чрез витрификация в зависимост от 24 различни фактори, вкл. ко-култивиране на ембрионите с автоложни едометриални клетки преди витрификацията, прилагането на отворена и затворена система за витрификация, и прилагането на изкуствен колапс (artificial collapse) преди витрификацията. Данните са валидирани, чрез анализ на реализираните клинични бременности (КБ), като е използвано ко-култивиране на

ембрионите с автоложни едометриални клетки преди витрификацията, отворена и затворена система за витрификация, асистиран хетчинг след размразяването на ембрионите преди размразен ембрио-трансфер, или е приложен изкуствен колапс преди витрификацията на бластоцистите. Изследван е ефекта и на “freeze all” стратегията.

Получените от докторантката и нейните научни ръководители резултати потвърждават ефективността и сигурността на приложението на витрификацията на ембриони и яйцеклетки, особено в комбинация с допълнителни техники – АХЛ, ИК. Прилагането на програмата “freeze all” осигурява възможност, при определени групи пациентки, да се отложи ембриотрансферът, което да увеличи шансовете за бременност и раждане.

От голямо значение е и успешното прилагане на тази програма, при жени в напреднала репродуктивна възраст. Броят на пациентките в споменатата група, се увеличава постоянно, поради отлагането на бременността и майчинството във времето. Тази група жени са предизвикателство за реализиране бременност и живо раждане, поради което всички методи, помагачи за постигането на този резултат са изключително важни.

Посочени са и планове за продължаване на изследванията – последващо проследяване на родените деца след прилагане на витрификация и тяхното развитие, с цел оценка на сигурността на метода.

В настоящия дисертационен труд са направени следните **изводи** относно факторите, които оказват влияние върху преживяемостта на ембрионите след размразяване и реализираните КБ от PЕТ - качеството на ембрионите в деня от in vitro развитието, на който се извършва витрификацията, увеличаването на съдържанието на човешки серумен албумин в замразителните и размразителните разтвори при криопрезервация на бластоцисти, както и извършването на изкуствен колапс преди витрификацията им; прилагането на асистиран хетчинг с лазер (АХЛ) на ембрионите след размразяване води до статистически достоверно увеличаване на реализираните КБ при витрифицирани бластоцисти; възрастта на пациентката (под 35 год.) има отношение към процента реализирани КБ; при PЕТ на ембриони с преживели под 50% от клетките не се достига до клинична бременност; витрифицирането на бластоцисти води до статистически достоверно по-висок процент реализирани КБ в сравнение с ембриони на ден трети, при пациенти ≤ 35 години. За програмата „freeze all” възрастта на пациентките не оказва негативен ефект върху реализираните КБ.

По данните получени от прочуването направено в дисертационния труд, установяването на факторите с положителен ефект върху криоконсервацията на ембриони и рутинното им прилагане в практиката е довело до статистически достоверно увеличаване на реализираните КБ с 36% за периода 2003-2015 год.

Приносите на дисертационния труд са несъмнени и фокусирани до следните три **постижения**: първо в страната проучване на приложението и оптимизирането на метода витрификация, с дефиниране на факторите, влияещи върху преживяемостта на ембрионите след размразяване и клинично валидирани, чрез проследяване на реализираните клинични бременности при размразен ембриотрансфер; валидиране на оптимизирането на метода витрификация довело до статистически значимо и съществено увеличение (над 31%) на клиничните бременности след въвеждане в практиката на модифициран метод за криоконсервация на бластоцисти, контрол на

качеството с въвеждане на критерии за селекция на замразяваните ембриони (с максимално или добро качество за съответния ден) и критерии за провеждане на размразения ембриотрансфер (само с размразени ембриони, с преживели над 50 % от клетките); рутинно прилагане на изкуствен колапс преди криопрезервацията на бластоцисти и асистиран хетчинг с лазер след размразяване на ембрионите преди размразен ембриотрансфер. Прилагане на стратегията „freeze all“ при криоконсервирането на бластоцисти довело до сигнификантно увеличаване на реализираните клинични бременности.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Резултатите са представени в дисертационен труд, автореферат и 9 научни труда на английски и български език, като 3 са публикувани в реферирани и рецензирани издания с импакт фактор. Данните от изследванията са представени на 15 научни форума за период от 9 години (2011-2020), както и в 9 научни публикации. В 11 от 15-те форума докторантката е първи автор, както и в 7 от 9-те статии по дисертационния труд, което показва високото ниво на лично участие на докторантката.

7. Автореферат

Авторефератът е подробен, илюстративен и отразява основните резултати, постигнати в дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания, приети във връзка с Правилника за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че **Любослава Димитрова Вълкова** притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност „Клетъчна биология“, като докторант редовна форма на обучение, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор“ на **Любослава Димитрова Вълкова** в докторска програма по научна специалност „Клетъчна биология“, в професионално направление 4.3. Биологични науки, от областна висшето образование 4. Природни науки, математика и информатика.

24.11.2020

Изготвила становището:

проф. Красимира Тодорова, дбн