

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на научната степен  
„Доктор на науките” в професионално направление 4.3. Биологически науки  
(Клетъчна биология)

**Тема на дисертацията:** „Криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и фрагменти”

**Автор:** доц. д-р Пламен Тодоров Тодоров

**Рецензент:** чл. кор. проф. дбн Румен Георгиев Панков, Биологически факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, член на научното жури, определено със заповед на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ РД38-694/17.11.2017 год

### Кратки биографични данни за кандидата

Доц. Пламен Тодоров е роден през 1963 год. в гр. София. През периода 1983-1988 год. завършва висше образование в Московската ветеринарна академия със специалност зооинженер. От 1989 год. е редовен докторант в Института по проблемите на криобиологията и криомедицината към Националната академия на науките на Украйна, където, след успешна защита през 1993 год. получава научната и образователна степен „доктор“ по специалността „криобиология“.

През 1994 год. постъпва на работа в Института по биология и имунология на размножаването при БАН, където работи и до днес. В този институт той преминава последователно през длъжностите специалист (1994-1995), асистент/научен сътрудник (1995-2007), а през 2007 е избран за старши научен сътрудник II ст. (доцент). От края на 2014 год. до средата на 2017 год. доц Тодоров е бил зам. директор на ИБИР, а от 2017 год. досега е ръководител на секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите“ към същия институт.

Доц. Пламен Тодоров е сертифициран главен ембриолог от Европейската асоциация по човешка репродукция и ембриология (ESHRE)), председател е на Българската асоциация по репродуктивна човешка ембриология и е главен редактор на списание „Ембиология“. Ръководил е множество национални и международни научно-изследователски проекти, а в резултат от активното му участие във втората и третата степен на обучение на студентите, под негово ръководство има защитени две докторски тези и четиринадесет магистърски дипломни работи.

### Актуалност на дисертационната тема

Възстановяването на женските репродуктивни функции, увредени вследствие на остаряване, химиотерапии, лъчетерапии или лечение на заболявания, изискващи прилагане на имunosупресивни, цитотоксични и противовъзпалителни лекарствени средства е интензивно разработвана област на съвременната репродуктивна медицина. Заедно с вече установените техники за замразяване и съхранение на гамети или ембриони, криопрезервацията на овариална тъкан е подход, който може да подсили възобновяване на фертилността. Този, все още експериментален метод, създава възможности за третиране и на пациенти, при които по физиологични или клинични причини хормоналната стимулация за получаване на овоцити е неприложима. Въпреки тези пречки и докладваните

положителни резултати, методът е все още в процес на разработване и се нуждае от допълнителни изследвания и данни за най-подходящите условия на ин-витро култивиране на овариалната тъкан, уточняване на методиките за криоконсервация, установяване на най-подходящия хистологичен състав на замразяваните препарати и пр. Дисертационният труд на доц. Тодоров разработва именно тези, все още нерешени въпроси, което дава убедително основание, избраната тематика да бъде определена като актуална.

### **Структура, цели и методичен подход на дисертационния труд**

Дисертацията на доц. Пламен Тодоров е написана на 159 страници, като е структурирана съгласно възприетите стандарти за този вид научен труд. Тя включва основните раздели: Литературен обзор от 38 стр., Цел и задачи на дисертационния труд – 2 стр., Материали и методи – 14 стр., Резултати и обсъждане – 60 стр., Заключение – 2 стр. и Изводи и приноси, представени на 2 стр. Дисертационният труд е онагледен с 47 фигури и 7 таблици. Включен е и списък на 31 публикувани от доц. Тодоров научни статии и 17 участия с доклади на научни форуми, всичките във връзка с дисертационния труд.

Литературният обзор е балансиран като обем и като съдържание и показва много добро познаване на публикуваната информация, свързана с темата на дисертацията. Използвани са общо 293 литературни източника, от които 281 на латиница и 12 на кирилица. Направен е задълбочен преглед на структурата и функциите на яйчниците, като е отделено специално внимание на влиянието на химио- и лъчетерапията върху тях. Във втория раздел – „Криоконсервация“ са описани факторите, които имат ефект върху биологичните обекти в процеса на замразяване, третиранията за предотвратяване на неблагоприятните въздействия, както и използваните методи за криопрезервация. В третия раздел на обзора са разгледани различните подходи за запазване на фертилитета, като са отразени както по-старите сведения, така и най-новите факти. Голямото количество информация е добре систематизирано, обобщено и онагледено с десет подходящи фигури и две таблици. Представянето на разглежданите данни е ясно, направено е професионално и включва всички основни постановки, които са необходими за обосноваване и разбиране на извършените изследвания. Много добрият стил на изложение прави прочита на обзора, както и останалите части на дисертацията, лек и увлекателен.

Целта е формулирана ясно и касае „криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и фрагменти с оглед оптимизиране на технологията за криоконсервация на овариална тъкан“. Тя е прецизирана в пет комплексни задачи, които ясно очертават периметъра на проведените изследвания. За решаването на поставените задачи са използвани удачно подбрани експериментални техники. В разделът „Материали и методи“ са описани различни методики за получаване, култивиране, съхранение, характеризиране и трансплантиране на фрагменти и/или клетки от репродуктивната система, включително и ембриони. Представянето на повечето от експерименталните процедури съдържа достатъчно информация, необходима за оценка на проведените експерименти.

Описаните експерименти обхващат двадесет годишен период на изследвания, при които са използвани лабораторни животни и контингент от жени с планови операции на яйчниците или участващи в програмите за ин-витро

оплождане в Медицински център Димитров. Отбелязано е, че изследванията са извършени с разрешение на съответните комитети по медицинска етика и след получаване на информирано съгласие от страна на пациентите.

### **Анализ на експерименталните резултати, изводи и приноси**

Основна част по обем и по значимост в дисертацията е разделът „Резултати и обсъждане”. Получените експериментални данни са изложени и дискутирани в раздела в ред, който следва дефинираните задачи на дисертационния труд. В разглеждането си аз също ще спазя този ред, като ще обобща основните достижения.

Първата група резултати включва изследвания върху овариални и гранулозни клетки от човек. Чрез създаване на първична клетъчна култура, представляваща смес от основните клетъчни типове на яйчника, доц. Тодоров получава възможност да изследва някои аспекти от функционалната активност на тези клетки, да ги използва за подобряване условията за ин-витро култивиране на сперматозоиди и предимплантационни ембриони (чрез прилагане метода на ко-култивиране), както и за идентифициране на най-щадящите криопротектанти, подходящи за криопрезервация на яйчниковия тъкан. С помощта на чувствителен радиоимунологичен тест е демонстрирано, че както овариалните, така и първичните култури от гранулозни клетки запазват базалната и стимулираната секреция на естрадиол. В допълнение е отбелязана и съхранена ароматазна активност, която е показана експериментално чрез добавяне на тестостерон към културалната среда. В резултатите от тези експерименти отново са отчетени повишени нива, както на базалната, така и на стимулираната секреция на естрадиол. Данните дават основание на доц. Тодоров да предложи изследването на индуцираната секреция на естрадиол, като функционален тест за определяне секреторната активност на културите от овариални клетки.

Дългосрочното съхранение на разработените първични култури изисква информация за ефектите на криопротекторите и метода на замразяване, оказвани върху овариалните и гранулозните клетки. За изясняване на тези въпроси, доц. Тодоров изследва токсичните ефекти на най-често използваните криопротектанти – глицерол, диметилсулфоксид и етиленгликол, като демонстрира, че и трите агента не повлияват пролиферативната активност на овариалните клетки, но инхибират базалната и стимулираната секреция на естрадиол и прогестерон. Най-слаб потискащ ефект е регистриран за етиленгликола, което е в съгласие с литературните данни за други репродуктивни клетки и е позволило на автора да определи този криопротектант като най-подходящ при работа с човешки овариални клетки. Към тази група данни трябва да бъдат причислени и резултатите, показващи, че витрификацията, макар и без статистическа значимост, все пак превъзхожда програмното и конвенционалното замразяване по отношение запазване виталитета на човешките гранулозни клетки.

Разработването на добре пролиферираща първична култура от овариални клетки, както и възможността за съхранението ѝ чрез криопрезервация са добри предпоставки за практическото ѝ приложение като подхранващ слой при култивиране на други ценни видове клетки и ембриони. Доц. Тодоров експлоатира тази възможност като изследва ефектите на овариалните клетки върху сперматозоиди и предимплантационни ембриони. И в двата случая са регистрирани

положителни въздействия. Ко-култивирането с овариални клетки стимулира статистически достоверно съхраняване на мотилитета на гаметите, както при нормоспермични еякулати така и при пациенти с астенозооспермия. Стимулиращ ефект е отчетен и в развитието на ембриони, ко-култивирани с овариални клетки, където достигането на стадий бластоцист е установено с около 11 часа по-рано в сравнение с контролите. Този резултат, макар и неподкрепен със статистика е интересен и заслужава да бъде разработен в последващи проучвания.

Интерес представляват и резултатите, демонстриращи експресия на плюрипотентни маркери (SSEA-1, SSEA-4, Oct3/4, Nanog и Sox2) от клетки от овариалните култури, както и отчетеното снижаване процента на позитивните клетки с напредване възрастта на пациентите. Доколкото присъствието на стволови клетки в яйчниците е все още дискутабилен въпрос, разработените овариални култури могат да бъдат използвани като удобна ин-витро експериментална система за допълнителни проучвания в тази посока, както и за търсене на въздействия, противодействащи на загубата на клетките, носители на плюрипотентните маркери.

Втората група експерименти е фокусирана върху установяване на най-ефективните методи за ин-витро отглеждане и криопрезервация на фрагменти от овариална тъкан. Описани са различни методи на култивиране на тъканни фрагменти, съдържащи множество фоликули или отделни малки фоликули, като е отдадено предпочитание на два от използваните методи. Първият включва микровибрации (честота на трептене 35Hz за 5 сек. през 30-минутни интервали) и води до по-добро запазване структурата на тъканта и развитието на фоликулите в сравнение с класическото култивиране. Вторият е комбинация от метода „висяща капка“ и ко-култивиране на фоликулите с овариални клетки или мезенхимни стволови клетки. И при двете смесени култури е отчетено формирането на единна структура и подобро съзряване на фоликулите.

Използването на овариални фрагменти с цел трансплантация и възстановяване на фертилността задължително изисква разработването на методи за криоконсервирането им, при това с минимални увреждания. За установяване на оптималните условия, довеждащи до най-добро съхранение на клетките от овариалните фрагменти, доц. Тодоров провежда серия от експерименти, в които изследва морфологичните промени във фоликулите, предизвикани от различни методи за криоконсервация; степента на апоптоза в овариалната тъкан; интензивността на реваскуларизация; ефектите на преинкубация върху ефективността на кроеконсервацията; както и влиянието на присъствието на медула в замразяваните фрагменти. Във всички споменати изследвания е използван сходен експериментален подход – крайната оценка за ефективността на третирането е извършвана върху овариални фрагменти след ксенотрансплантация, което повишава стойността на получените резултати, приближавайки ги максимално до ин виво ситуацията. Установено е, че в сравнение с витрификацията, програмното замразяване осигурява по-ниски нива на атрезия и по-добро последващо развитие на фоликулите от овариалните фрагменти. Въпреки, че процесът на реваскуларизация не се повлиява от използваната техника на замразяване, са демонстрирани статистически достоверни по-ниски нива на апоптоза в овариалните клетки, отново, след програмно замразяване. Намалени нива на апоптоза са установени и при преинкубация на овариалните фрагменти на 5°C за 24 часа, предхождаща програмното замразяване. Това третиране не оказва ефект

върху фоликулите, но очевидно спомага за общата преживяемост на клетките от тъканните фрагменти след криопрезервация и ксенотрансплантация. Подобна обща по-добра преживяемост, оценена по статистически значимо снижаване на апоптотичните клетки, е намерена и за тъканни фрагменти, които включват в състава си и части от медулата.

В последната част на дисертацията е описан случай на ортотропна трансплантация на яйчникови експланти (запазени в замразено състояние за две години) и възстановяване на естрадиоловата секреция при пациентка, преминала успешно лечение на Ходжкинов лимфом. Въпреки оскъдната информация, представеният случай е добра илюстрация на възможността за скорошно въвеждане в практиката на метода на трансплантация на криоконсервирани овариални фрагменти.

От извършените изследвания са изведени 10 обобщени извода и са формулирани пет приноса, които приемам.

Афторефератът е изготвен съгласно изискванията и отразява всички основни резултати и приноси на дисертационния труд.

### **Критични бележки**

Към представената дисертация имам и някои забележки, които са предимно от техническо естество. В някои от разделите, особено тези, свързани с морфологични изследвания, е заложено на обстойно описание, но не е представен достатъчно илюстративен материал (напр. разделите описващи култивирането на овариални фрагменти в 2Д и 3Д условия). Включването на репрезентативни образи от наблюдаваните промени в културите би спомогнало за по-доброто разбиране и оценка на описателната информация. По-подробно описание на някои от методите (напр. радиоимунологичният анализ), както и цитиране на статиите, в които са публикувани представяните в дисертацията резултати би предоставило необходимата конкретика и би спомогнало за коректното възприемане на информацията.

### **Съответствие на представената документация със ЗРАСБ и наукометрични показатели**

Представеният дисертационен труд и съпътстващата документация отговарят на изискванията на ЗРАСБ и Правилника за приложението му. Доц. Тодоров притежава диплома за научната и образователна степен „Доктор“ и е представил списък от 31 публикации по темата на дисертационния труд. В 18 от тях (58%) той е водещ автор (първи или последен), което е индикация за активното му участие в проведените изследвания. Четиринадесет от статиите са публикувани в списания с импакт фактор и/или са реферирани в ISI Web of Knowledge или SCOPUS. Общият ИФ на статиите по дисертационния труд е 20,3, а отбелязаните цитирания са 189. Тези наукометрични данни покриват допълнителните критерии на Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, изискващи най-малко 25 научни статии включени в дисертацията. Считаю, че съществуващия недостиг от една статия в критерия за броя на статиите реферирани в ISI Web of Knowledge или SCOPUS (допълнителните критерии изискват 15 бр.) може да бъде компенсирани, както с по-големия общ брой статии, така и със значително по-големия брой цитати (допълнителните критерии изискват 50), представен от доц. Тодоров.

**Заклучение:**

Представеният от доц. Тодоров труд „Криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и фрагменти” е хомогенен монографичен труд, който отговаря на изискванията, предявявани към дисертация за получаване на научната степен „Доктор на науките”. Той е резултат на повече от 20 годишна целенасочена изследователска дейност и разработва съществени въпроси, свързани с актуалната тема за успешното съхраняване и приложение на човешките овариални клетки и тъкани. Въпреки **естествените** ограничения, които налага избраният обект на проучване, са проведени поредица от пионерни за България изследвания, резултатите от които са намерили широк отзвук, както в нашата, така и в международната научни общности. Те характеризират своя автор като висококвалифициран професионалист в тази специфична област на клетъчната биология.

Всичко отбелязано по-горе ми дава основание да дам своята положителна оценка и да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят на доц. д-р Пламен Тодоров Тодоров научната степен „Доктор на науки”.

21.01.2018 г.

Рецензент:

/чл. кор. проф. дбн Румен Панков/