

СТАНОВИЩЕ

на дисертационния труд на доц. Пламен Тодоров, дб, на тема „*Криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и фрагменти*“ за придобиване на научната степен „Доктор на науките“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност 01.06.18. “Клетъчна биология”

от проф. д-р Сорен Б. Хайрабемян, дбн, Институт по биология и имунология на науките „Акад. Кирил Братанов“

въз основа на издадена Заповед РД 38-694/17.11.2017 на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“

Характеристика на дисертационния труд

Разработеният дисертационен труд е актуален, третирайки проблема за надеждна криопрезервация на овариална тъкан от пациентки с онкологични или други заболявания, чието протичане или терапия водят до трайното и увреждане и загуба на репродуктивни функции. Целта е последваща авто-трансплантация на овариална тъкан и ефективно възстановяване на репродуктивната функция. Научния труд е изключително навременен, в контекста на нарастваща честота на онкологични заболявания, вкл. онкология на органи на репродуктивната система, като карцинома на млечната жлеза и шийката на матката. Очакваното нарастване на честотата на обща онкологична заболяемост се предвижда да надхвърли 66% в следващите 5-10 год., като в същото време нарастват и диагностичния и терапевтичен потенциал водещи до по-висока преживяемост на пациентите. Аналогично е нараснала значително и заболяемостта от авто-имунни заболявания, чийто обхват надхвърля 50 нозологични единици и изисква терапевтични подходи водещи до преждевременна овариална недостатъчност.

Конкретната цел на дисертационния труд е оптимизиране на технологията за криоконсервация на овариална тъкан, чрез задълбочени криобиологични и функционални изследвания върху човешки овариални клетки и фрагменти, с оглед на настоящото развитие на научното познание и технологиите, при което в световен мащаб има малко над 100 раждания след яйчникова криоконсервация и последваща трансплантация.

Това е накарало доц. Тодоров да избере комплексен подход със значителен набор от методи при разглеждането на проблема с технологичното криопрезервиране на овариална тъкан или само на отделни овариални клетки в смесена клетъчна култура. Изследванията обхващат значителен по време период 1996-2016 г. и вкл. колаборации с национални и европейски изследователски институции. Авторът има задълбочени познания в методологичните подходи на проведените изследвания, като не малка роля за формиране на изследователската му стратегия играе и дългогодишният му опит на ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) сертифициран старши клиничен ембриолог.

Дисертационния труд е разписан съгласно изискванията на ЗРАСРБ и има относително стандартната структура, с изключение на това, че резултатите са критично и аналитично

дискутирани при представянето им в смесена дискусия и резултати. Трудът обхваща 157 стр., като над 41% са посветени на експерименталните резултати.

Изследванията в по-голямата си част са проведени с използването на човешка овариална тъкан позволявайки бърза клинична трансляция на резултатите. Изследователската стратегия вкл. изследвания за оптимизация на култивирането на човешки овариални клетки в смесена култура с гранулозни клетки, целящо запазване на овариални клетки със стволов фенотип, които биха послужили за бъдеща пост-криоконсервационна регенерация на овариалната функция. Проследени са различни стратегии за криоконсервация, като програмно замразяване и витрификация, както и токсикологичните ефекти на клетъчно ниво на различни криопротектори. Проведени са изследвания за оптимизиране на *in-vitro* култивирането на овариални фрагменти и изолирани фоликули в 2D и 3D-условия, като са проучени промените настъпващи в условия на екзогенни артифициални микровибрации, както и тези настъпващи при ко-култивиране с мезенхимни стволови клетки. Изследвана е и ролята на запазването на медула в замразяваните фрагменти овариална тъкан върху показателите след размразяване и ксенотрансплантация. Проведени са комплексни, пионерски и особено за страната уникални до момента, валидиращи изследвания на криоконсервирана човешка овариална тъкан с използването на имунодефицитен миши SCID модел на ксенотрансплантация, както и изключително рядък, и в световната практика транслационен подход за автоложна трансплантация на човешка овариална тъкан с възстановяване на овариалната хормонална функция, след проведена химиотерапия.

Дисертационния труд представлява изключително предизвикателство, като се има в предвид малкия брой успешни трансплантации на криоконсервирана овариална тъкан в световен мащаб, липсата на сериозна финансова и нормативна подкрепа за провеждане на клинични транслиращи изследвания. Съществен принос в световната и националната литература представляват изследванията на ксено- и автотрансплантирана криоконсервирана човешка овариална тъкан. Представените данни показват предимствата на криоконсервацията на тъканни експланти в сравнение с единични овариални клетки или фоликули, ко-култивирани с различни “feeder cells”, включително с мезенхимни стволови клетки. Процеса на култивация е подсилен с иновативно приложение на механична вибро стимулация на култивираните клетки, като е разгледана и научната основа показваща многопланова промяна на клетъчната сигнализация подпомагаща развитието на култивираните клетки и евентуално ембриони. Критично е разгледан и експериментално провереният въпрос с култивиране на овариални тъканни експланти със запазена медула. Експериментално е валидирана и хипотезата за намаляването на овариалните клетки със стволови характеристики с напредване на възраст, подчертавайки необходимостта от разработване на криопротективни биотехнологии превантиращи намаляването или загубата на овариалния резерв.

Наукометрични показатели свързани с дисертационния труд

Резултатите от експерименталната работа отразена в дисертационния труд са включени в 31 публикации от които 11 с импакт фактор от 20.387 (17 в реферирани издания) и 17 съобщения на научни форуми у нас и в чужбина. Научните статии датират от 1997 до 2016, част от тях са публикувани в престижните списания Human Reproduction, Cell

Transplantation, Reproductive Biology and Endocrinology, PlosOne, и др. и са цитирани 189 пъти. Броят на всички публикации (31/25), реферираните такива (17/15), както и специфичните им цитирания (189/50) надхвърлят значително изискванията на ЗРАСРБ и специфичните допълнителни критерии при придобиване на научни степен "доктор на науките" в Софийски Университет „Св. Кл. Охридски” за професионално направление „Биологически науки” и Биотехнологии. Голяма част от проучванията са проведени у нас с финансиране на проекти за фундаментални научни изследвания, спечелено на конкурсен принцип, с ръководител доц. П. Тодоров. Ксенотрансплантационния мишки SCID модел и автоложната трансплантация са изцяло извършени у нас, с проектно финансиране осигурено от доц. Тодоров. Той е първи автор в 15/31 публикации, втори автор в 7/31, показващо подчертано личния принос на кандидата.

Критични бележки

Изследванията са придружени с множество професионално изпълнени флоуцитометрични имунофенотипизирания на овариални епителоидни клетки, както и на изолирани от единични фоликули прилежащи кумулусни и обграждащи ги гранулозни клетки. В тази връзка при изследванията свързани с клетъчна апоптоза основаващи се на феномена на екстернализиране на фосфатидилсерин, бих препоръчал замяната му с флоуцитометрично детектиране на специфично активиране на каспазите свързани със сигналната каскада на апоптоза, като каспаза-3, -6 и -9, в бъдещи изследвания. Това би показало фините детайли в настъпващата апоптоза/клетъчна смърт при различните условия на криопротекция и клетъчно култивиране.

Заклучение

Доц. Пламен Тодоров, дб, представя един обхватен, задълбочен, пионерски и уникален за страната научно-приложен труд, награден с престижната национална медицинска награда „“, с изключителен принос към клиничната практика. Доц. Тодоров е демонстрирал качества на изграден учен и научен ръководител на изследователски проекти, със сериозна публикационна активност, намерила широк отзвук в цитиранията на международната научна общност.

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 научната степен ‘Доктор на науките’** на Доц. Пламен Тодоров.

19.01.2018 г.

проф. д-р Сорен Б. Хайрабемян, дбн

Изготвил:

/подпис/