

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Христо Стефанов Гагов  
Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”  
на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'  
в професионално направление 4.3. Биологически науки  
(Клетъчна биология)

**Автор:** Елена Василева Маринова

**Форма на докторантурата:** задочен докторант към СУ „Св. Климент Охридски“ –  
София.

**Тема:** „Клетъчни и молекулни маркери за ендометриална рецептивност”

**Научен ръководител:** проф. дбн Росица Конакчиева.

**Общо представяне на материалите.** Представеният комплект материали включва следните документи:

- автобиография
- дипломи за висше образование (бакалавърска и магистърска степени) и приложенията към тях
- заповеди за записване в докторантура, за нейната трансформация от редовна в задочна форма на обучение и за отчисляване с право на защита
- удостоверение за проведените и издържани изпити от индивидуалния план с оценките от тях
- дисертационен труд
- автореферат
- списък на научните публикации по темата на дисертацията
- копия на 3-те научни публикации по темата на дисертацията
- списък на участията в научни форуми
- протокол и становище от проверката за плагиатство
- други документи, свързани с хода на процедурата.

**Кратки биографични данни за докторанта.** През 2013 г. Елена Маринова завършва бакалавърска степен със специалност „Биология“ в Биологически факултет (БФ) на СУ, а през 2015 г. завършва магистратура по „Биология на развитието“ към катедрата по „Цитология, хистология и ембриология“, към БФ на СУ „Св. Климент Охридски“. От април 2015 г. е до днес е биолог в „Офис технологичен трансфер за молекулярна генетика и диагностика“ към “РепроБиоМед“. В периода 2016-2021 г. е задочен докторант към катедрата по „Цитология, хистология и ембриология“, БФ на СУ с научен ръководител проф. Росица

Конакчиева, дбн, през което време изпълнява задачите на дисертационен труд на тема „Клетъчни и молекулни маркери за ендометриална рецептивност”. Владее английски език, като е представен сертификат за ниво В2.

**Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи.**

Усъвършенстването на диагностиката за установяване причините за инфертилитет при жени с неизяснена етиология и на методите за асистирана репродукция според индивидуалните причини за безплодието е от голямо психологическо и социално значение. Тежката демографска криза в страната може в някаква степен да се реши чрез повишаване ефективността на процедурите за оплождане *in vitro* с последващо имплантиране на получените ембриони. Затова намирам тематиката на представения ми за рецензиране дисертационен труд за изключително актуална и с голямо практическо значение, предвид ролята на възпалителните процеси в ендометриума за неуспешната имплантация и за отхвърлянето на плода чрез ранни и повтарящи се спонтанни аборти.

**Познаване на проблема.** Обзорът на този дисертационен труд е задълбочен и едновременно с това много стегнато написан. Той обхваща 36 страници и съдържа 6 фигури. Подробно са разгледани структурата на репродуктивната система на жената, хормоналната регулация на месечния ѝ цикъл и свързаните с него промени в ендометриума. Особено внимание е обърнато на спецификите на ангиогенезата в този орган, на ролята на съдовия ендотелен растежен фактор (VEGF), на неговите изоформи, регулацията на генната му експресия, както и вътреклетъчните сигнални пътища в ендотелните и гладкомускулните клетки на ендометриума. В дисертацията са цитирани общо 196 литературни източника, като всичките са на английски език. По години те са разпределени както следва – преди 2000 г. – 58, през 2000 – 8, 2001 – 7, 2002 – 7, 2003 – 9, 2004 – 10, 2005 – 7, 2006 – 8, 2007 – 7, 2008 – 9, 2009 – 9 (общо за периода 2000 – 2009 - 81); 2010 – 9, 2011 – 6, 2012 – 7, 2013 – 7, 2014 – 2, 2015 -5, 2016 – 4, 2017 – 3, 2018 – 6, 2019 – 5 и 2020 – 3 (общо общо за периода 2010 –

2020 - 57). Намирам, че докторантката добре познава литературата по тематиката на дисертационния труд. Качеството на цитираните публикации е адекватно на неговата тематика, на целта и задачите, на използваните методики, както и за обосноваването на получените резултати.

**Цел и задачи.** Целта е формулирана кратко и ясно. От нея произтичат осем отлично формулирани задачи, които са във връзка с: а) подбор на подходящи пациенти със съответните им клинични досиета и анамнеза, и на участници в контролната група, като всичко това изпълнено според изискванията на закона за информирано съгласие; б) подбор и оптимизация на протоколите за работа с проби от биопсична тъкан и кръв; в) извършване на планираните генетични анализи и на маточния инфламаторен профил в средно-лутеалната фаза на цикъла и г) разработването на подходящи клетъчни модели за проучване на молекулни маркери *in vitro*. Биоинформатичен анализа на данните също е включен към задачите.

**Методика на изследването.** Този дисертационен труд впечатлява с броя и сложността на използваните методики. Те включват подбор, клинични данни и снемане на анамнеза на пациентки с реродуктивни проблеми, ендометриална биопсия, изследване на полиморфизми в гена VEGF-A, кодиращ съдовия ендотелен растежен фактор (VEGF) и в гена, кодиращ рецептора за мелатонин 1B (MT1B). Освен това са използвани PCR и PCR в реално време, рестрикционен (RFLP) анализ, изолиране и култивиране на стромални клетки от ендометриална тъкан, на първични клетъчни култури от 3T3 фибробласти и на клетки от фоликулната течност, определяни са нивата на естрадиол, прогестерон, кортизол и анти-мюлеров хормон, и др. В култивирани клетки са изследвани протеинови маркери чрез имунофлуоресценция, флуоресцентно активирано клетъчно сортиране (FACS) и Western blot, а в супернатантите на цели клетъчни лизати е определяно наличието на важни про- и анти-инфламаторни цитокини. Всичко това е довело до натрупването на голям брой данни, включително и на такива за биоинформатичен анализ.

**Резултати и дискусия.** Това е основният раздел на дисертационния труд. Резултатите и тяхното обсъждане вървят паралелно, което считам за удачно предвид използваните многобройни методики и като резултат от това - получените разнообразни резултати, които в този случай е най-добре да се пояснят веднага в текста, за да бъдат по-добре осмислени и да се подчертаят аргументите, които подкрепят направените изводи. Резултатите в този дисертационен труд са отлично илюстрирани с 18 фигури и 9 таблици. Тук са представени данни за успешно култивирани клетки от стромата на ендометриума, които са формирали смесени култури от стромални фибробласти и лимфоцити, и със запазани паракринни комуникации между тях. При тези условия са регистрирани адекватни регулаторни реакции - добавянето на прогестерон стимулира секрецията на хепарин-свързващ епидермален растежен фактор, активиращ експресията на интегрини, които са важни модулатори на ендометриалната и ембрионалната функция. Използването на различни маркери е позволило определянето на култивираните клетки като типични стромални фибробласти с мезенхимен произход. Количественото определяне нивата на експресия на няколко инфламаторни маркери - IL-1b, IL-10, IL-18, TNF $\alpha$ , GATA3 и CD68 при изследвани 163 пациентки с повтарящи се имплантационни неуспехи или спонтанни аборти показва статистически достоверно повишени нива на TNF $\alpha$  и CD68. Тези резултати предполагат значително нарастнала активност на мактофагите и са добра основа за бъдещи изследвания и нови терапевтични подходи.

Изследванията в този дисертационен труд показаха още, че +405 C/C хаплотипа в гена за VEGF допринася за репродуктивен провал поради неуспешна имплантация на ембриона или последващи спонтанни аборти.

Към дисертационния труд спада и задълбоченото изследване на ефектите на мелатонина чрез рецептор-медирана вътреклетъчна сигнализация, за които колегите в групата под ръководството на проф. Конакчиева имат голям опит и значим принос.

Установено, че комбинираните генотипове на мелатониновия рецептор тип 1 (MT1) не се асоциират със спонтанни аборти или с неуспех при имплантиране на ембриони. Други опити показват, че в присъствие на 10 nM мелатонин MT1 стимулира метаболитния транспорт в култивираните 3T3 фибробласти. Подобно третиране с мелатонин на гранулозни клетки води до амплификация на транскриптите за Klf-4, c-Myc и Nanog.

Отделен раздел е **Дискусия**. Там на 6 страници са разгледани физиологични аспекти на ангиогенезата при възрастни и патологичните отклонения при него с фокус върху процесите в ендометриума. Компетентно са коментирани най-новите виждания за участието на мелатонина, на неговите рецептори MT1 и MT2, на важни цитокини и на полиморфизмите на VEGF-A за успеха на имплантацията на ембриона и на бременността при хора. Този сравнително кратък раздел допълва направеното при представянето на резултатите обсъждане, затова го намирам за необходим и в достатъчен обем.

**Изводи и принос. Значимост на разработката за науката и практиката.** Петте извода много добре обобщават получените данните. Изводите и приносът са формулирани достатъчно ясно. Голям успех на докторанта и неговия научен ръководител е установяването на пълна корелация между разработените ДНК тестове за доказване на полиморфизми в гена VEGF-A за целите на асистирания репродукция при пациентки с повтарящи се спонтанни аборти и имплантационни неуспехи, и данните, получени чрез секвенционен анализ.

**Преценка на публикациите по дисертационния труд.** Дисертацията се базира на 4 научни статии – три вече публикувани и една приета за печат, за която получих копие от известието за нейното приемане за печат. От тези четири статии три са на английски език в научни списания с импакт фактор (две в *Доклади на БАН* и една в *Biotech. Biotech. Eq.*) и една в специализираното българско списание „*Ембриология*“. В една от публикациите Елена Маринова е първи автор, а в другите три - втори. Данни от изследванията на Елена Маринова

са представени в пет международни научни форума, един от които е в България, а другите са в Италия, Франция, Тайланд и Испания. Няма отбелязани цитирания на тези статии, което е очаквано предвид скорошното им публикуване.

**Лично участие на докторантката.** Моята оценка за личното участие на докторантката в проведените изследвания се базира изцяло върху предоставените ми материали. Елена Маринова е водещ (първи или втори) автор в публикациите по този дисертационен труд. Това ми говори, че експерименталната работа, както и дейностите по обработката и представянето на получените данни са в значителна степен нейна заслуга.

**Автореферат.** Авторефератът се състои от 55 страници, които точно отразяват основните теми и достижения на докторантския труд, представят и обсъждат много добре получените най-важни резултати, както и съдържат 5-те извода, научно-приложния принос, списък с 4-те публикации по темата на дисертацията, петте участия в международни научни конференции и трите участия в научни проекти на обучаващата я институция, които са помогнали за изготвянето на дисертацията. Авторефератът съдържа най-важните фигури и резултати и напълно отговаря на утвърдените изисквания и стандарти.

**Критични забележки и препоръки.** Нямам критични забележки или препоръки към начина на провеждане на изследванията, тяхното интерпретиране или към комплекта предоставени ми материали във връзка с този конкурс. В дисертационния труд могат да се направят някои корекции:

- списъкът със съкращенията е добре да е подреден по азбучен ред като първо се дадат тези на кирилица, а след това - останалите на латиница;

- съкращенията (абривиатурите) за анти-мюлеров хормон на кирилица (AMX) и латиница (AMH), както и означенията за мелатониновите рецептори 1A и 1B - MEL-1A-R и MEL-1B-R (стр. 67), които дублират обозначенията MT1 и MT2, не са въведени в списъка с използваните съкращения;

- забелязват се грешки при изписването на някои думи или липсата на интервали;
- на стр. 85 едно и също изречение се повтаря в началото на втория и третия параграф.

Тези технически по своя характер пропуски не намаляват високата ми оценка за този много интересен, отлично изпълнен, перфектно илюстриран и добре написан труд със значим научно-приложен принос.

**Лични впечатления.** Не познавам Елена Маринова. Съдя за нея изцяло по предоставените ми материали, състоящи се от докторски труд, автореферат, научни публикации и от представянето на проекта за дисертация пред катедрения съвет на кат. „Цитология, хистология и ембриология“.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Рецензията от мен дисертационен труд на Елена Маринова на тема „Клетъчни и молекулни маркери за ендометриална рецептивност” **съдържа оригинални научни и научно-приложни резултати с принос за науката.** Той напълно отговаря на изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ. Представените резултати и публикации напълно съответстват на наукометричните изисквания за такъв труд.

Поради гореизложеното, **убедено** давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, публикации, резултати и принос. **Предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’** на Елена Василева Маринова в професионалното направление 4.3. Биологически науки (Клетъчна биология).

16.03.2022 г.

**Рецензент:** .....

(проф. д-р Христо Гагов)