

До Председателя на научното жури
определено със Заповед NoPД 38-694/17.11.2017 г.
на Ректора на Софийски университет „Св. Кл. Охридски – София

Становище

от проф. д-р Виктор Борисов Златков, дм

акушер-гинеколог, онколог

Катедра по Акушерство и гинекология, МФ, МУ-София

Ректор на Медицински университет-София

Относно: Дисертация на тема: „**Криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и фрагменти**“, представена от **доц. Пламен Тодоров Тодоров дб**, за присъждане на научната степен „доктор на науките“, в професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност 01.06.18. „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-София (Протокол № 13, т. 9. 07.11. 2017 г.)

БИОГРАФИЧНИ ДАННИ

Доц. Пламен Тодоров е роден на 25.04.1963 година. Висшето си образование (1983-1988 г.) завършва в Московската ветеринарна академия в Москва, Русия като зооинженер. За периода 1989-1993 г. е редовен докторант – Институт по проблемите на криобиология и криомедицина – НАНУ, Харков, Украйна, Там през 1993 г. защитава научно-образователната степен „доктор“ по специалност „криобиология“ на тема: „Влияние методов размораживания на морфофункциональную сохранность сперматозоидов и эмбрионов млекопитающих, замороженных в условиях сверхбыстрого охлаждения“, Същата е призната от ВАК с Решение № 610/ 06.10.1994 г. От 1994 г. и понастоящем работи в Института по биология и имунология на размножаването – БАН, където последователно преминава през различните етапи на научното си развитие, първоначално като специалист (1994-1995), научен сътрудник/асистент (1995-2007), доцент/ ст.н.с. II ст. (2007), зам. директор на ИБИР-БАН (2014-2017) и от юли 2017 ръководител секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите“ към ИБИР.

Наукометричните му показатели са значими: публикации – 85, цитирания – 264, ИФ-43 и Х-индекс – 8. Ръководител е на 12 бр. научни проекти вкл. международни. Ръководител е на 14 защитили дипломанти и 2-ма – докторанти, а към момента на други 3 докторанти и 1 –дипломант. Научен консултант на 3 проекта за млади учени.

Изграждането му като специалист се осъществява чрез участие в значителен брой курсове и специализации у нас и в чужбина. Сертифициран е като главен ембриолог на Европейската асоциация по човешка репродукция и ембриология (ESHRE). Председател е на Българската асоциация по репродуктивна човешка ембриология. Главен редактор на сп. ”Ембриология“. Член е на престижни международни асоциации. Носител на наградата „Signum Laudis Pro Scientiae Meritis“ за най-добра разработка в областта на медико-биологичните науки (2002-2003).

АКТУАЛНОСТ НА ПРОБЛЕМА

Съвременните тенденции за отлагане на родителството след 35 годишна възраст е реална предпоставка за повишен риск от появата на скрити, латентни вкл. генетично детерминирани заболявания. Соматичните и психо-социалните последици свързани с откриването и лечението на неопластични, автоимунни и др. системни заболявания са значими, особено при риск от загуба на фертилните възможности на пациента.

През последното десетилетие се дискутира въпроса за провеждане на радикално лечение на онкологичното заболяване при запазване на фертилитета на семейната двойка. Известни са различни стратегии. При едните се използват така наречените органосъхраняващи операции, където радикалността на оперативното лечение се подсигурира с адюватни методи на лечение. При другите - се извършва фармакологична протекция, хирургична транспозиция или криопрезервация на фертилен тъкан или ембрион.

В тази връзка, представеният за становище дисертационен труд е актуален. Той е насочен към оптимизиране технологията за криоконсервация на човешка овариална тъкан с цел запазване фертилитета при определени групи пациентки (с предстояща химио/лъчетерапия, автоимунни заболявания и др.). В България подобно системно проучване се извършва за първи път като направлението е сравнително ново и в световен мащаб (родени са малко над 100 деца).

АНАЛИЗ И ОЦЕНКА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Дисертационният труд е написан на 159 страници печатен текст и структуриран, както следва: въведение - 2 стр, литературен обзор - 38 стр; цел и задачи -2 стр.; материали и методи -15 стр.; резултати и обсъждане - 60 страници; заключение – 2 страница; изводи и приноси - 2 страници; книгопис – 26 стр. и приложения – 6 стр.

• Литературен обзор.

Обзорът е обширен, като изчерпателно обхваща всички аспекти на проблема и дава информация, която обслужва избраната научна тема и има приносен характер. Той включва проблеми описващи структурата и функциите на женските гонади, регулацията на репродуктивните процеси, влиянието на медикаментозната и лъчетерапия; факторите водещи до основни увреждания, които възникват в клетките в процеса на криоконсервация и методите за тяхната протекция. Особен интерес представлява обсъждане на възможните подходи за фертилно застраховане при определени групи пациенти като подробно и коректно са описани недостатъците и преимуществата на различните използвани в практиката методи.

Въз основа на набелязаните в обзора проблеми, авторът обосновава целта и задачите на настоящия дисертационен труд.

• Цел и задачи

Целта на дисертационния труд е *да проведе криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и фрагменти с оглед оптимизиране на технологията за криоконсервация на овариалната тъкан*. За изпълнение на поставената цел авторът си е поставил 5 основни задачи, които по структура включват последователно изпълнение на основните етапи на дисертационния труд.

• Материали и методи

Изследването е проведено през периода 1996-2016 г. на база ИБИР-БАН, Института по микробиология на БАН и Университета в гр. Кьолн, Германия.

Използвани са яйчници от 59 жени, надлежно отразени в съответните публикации. Половината от тях (28 бр.) са получени в Университетската клиника в Кьолн, Германия. В България овариални клетки и фрагменти от яйчниците на жени са добивани от участващи в програмите за ин-витро оплождане на МЦ „Димитров“ или след планови гинекологични операции на яйчниците в различни софийски АГ болници. Количеството фрагменти, получени от една пациентка, зависи от размера на парчето яйчник. От цял яйчник са добивани над 100 фрагмента за замразяване, от по-малките парчета – средно по 30-тина. Всички пациентки са дали предварително информирано съгласие и имат разрешение на Комитета по медицинска етика към съответното лечебно заведение.

Изследванията са извършени с помощта на широк набор от съвременни методи, включващи клетъчни и тъканни култури, ко-култивиране, хистологични изследвания, имунохистохимия, тестове за виталност, радиоизотопен анализ, флоуцитометрия, различни техники за криоконсервация, трансплантация на овариална тъкан и др. Особен интерес представлява култивирането ин-виво на човешка овариална тъкан с помощта на ксеногенна трансплантация (на имунодефицитни мишки). Методиките са достатъчно добре описани и позволяват да бъдат възпроизведени. Използването на съвременна апаратура и среди и консумативи на водещи фирми гарантира достоверността на получените резултати. Получените резултати са обработени с подходящи и разнообразни статистически методи.

- **„Резултати и обсъждане”**

Доц. Тодоров представя получените от него резултати в три обобщени раздела: изследвания върху овариалните клетки, върху фрагменти овариална тъкан, криоконсервация и автоложна трансплантация на човешка овариална тъкан. Всеки от тях се разглеждат различни аспекти на поставения проблем:

Той доказва, че при ин-витро култивирането на овариални клетки и фрагменти получената култура се отличава с умерена пролиферативна активност като изследователя описва особеностите на растежа и морфологията на клетките. С помощта на радиоизотопен анализ е установено, че клетките запазват базалната и стимулирана секреция на естрадиол и ароматазната си активност ин-витро. Тези резултати могат да се използват като функционален тест за секреторната им активност.

Ко-култивирането с мъжки гамети и ембриони също показва запазване на функционалната активност на клетките. На базата на сравнителни експерименти е доказано, че етиленгликолят е по-слабо токсичен за клетките от глицерола и ДМСО, което дава основание да бъде препоръчан в средите за криоконсервация. Сравнени са различни техники за замразяване. Независимо, че е налице известна разлика в полза на витрификацията спрямо програмното замразяване или конвенционалния метод (на парите на азота), изследователят смята, че като цяло овариалните клетки се отличават с добра криотолерантност и към трите метода.

Изследването за експресия на маркери за плурипотентност в човешки овариални клетки (SSEA-1, SSEA-4, Oct3/4, NANOG и Sox2) са важни с оглед разразилата се в последните години дискусия за наличието на овариални стволови клетки. Резултатите от сравнителни изследвания върху методи за криоконсервация на човешка овариална тъкан, по отношение на запазване на морфологията и развитието на фоликулите, степен на апоптоза и реваскуларизация на фрагментите след размразяване и трансплантация на имунодефицитни мишки показват, че програмното замразяване е по-ефективен метод от витрификацията;

Авторът доказва, че влиянието на периода на преинкубация при ниски положителни температури на овариалната тъкан преди замразяване е признак за по-добро запазване виталитета на клетките. Подобна стойност има и наличието на медула в замразяваните тъканни фрагменти, като според автора това е основен фактор осигуряващ по-добрата им преживяемост след размразяване и трансплантация.

Последните две групи експерименти имат пряко отношение към практическото приложение и оптимизирането на отделни етапи от технологията за криоконсервация на човешка овариална тъкан. Авторът добре интерпретира получените резултати, като ги съпоставя с тези на други изследователи, работещи в тази област.

Следва да се спомене, че описаният в дисертацията случай на автотрансплантация на замразена овариална тъкан при пациентка с раково заболяване на кръвта е не само първи (и засега единствен в България), но и един от първите в световен мащаб.

- **Заключение**

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

- **Изводи**

Представените изводи са 10 на брой. Те са формулирани ясно и се възприемат лесно, като напълно точно и обобщено отразяват получените резултати и са свързани логично с разработката на дисертационния труд.

- **Приноси**

Посочени са 5 приноса и те имат, както потвърдителен (научно-приложен), така и оригинален научен (теоретичен) характер, на базата на извършените конкретни проучвания.

- **Книгопис**

Приложен е библиографски списък от 293 заглавия, като от използваната литература 171 източника (58.56%) са от последните 10 г. От тях 13 на кирилица и 280 на латиница. Всички цитирани автори имат непосредствено отношение към проучването. Те са цитирани коректно там където трябва, съобразно задачите на дисертационния труд.

- **Онагледяване**

Цялостното представяне на дисертацията е много добро. Тя съдържа 7 таблици, 47 фигури, 7 графики и 3 приложения, отразяващи представената теза и добавящи нужната допълнителна информация.

КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ

- На някои от снимките не е посочено използваното микроскопско увеличение, и липсват съответните барове;
- На фиг.23 отразена статистическата значимост, макар че в текста е описана разлика в токсичния ефект на изследваните криопротектори;
- В някои серии на извършените експерименти са използвани различни методи за оценка степента на апоптоза на овариалните клетки (напр. с помоща на флуоцитометричен анализ, а в други – на базата на каспаза-3 имунофлуоресценция). Смятам, че в един експеримент могат да се използват и двата метода, като се съпоставят получените резултати).

Искам да отбележа, че направените от мен забележки и не намаляват научно-практическата стойност на така подготвения дисертационния труд. В някаква степен те са свързани преди всичко със структурата, което се дължи на разлика в изискванията на отделните учебно-научни организации.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Във връзка с дисертацията доц. Тодоров е представил 31 реални публикации, от които 17 в наши и 14 в чужди научни издания. Първи автор е на 15, като списанията с IF са 11, с общ индекс на цитиране – 20.387 при регистрирани към момента 189 цитата. Научната му активност по темата се допълва с 17 научни доклади от 15 научни прояви, от които 4 в чужбина.

АВТОРЕФЕРАТ

Той е изграден по структура, подобна на дисертационния труд, като в него са разгледани основните цели и задачи, както и методите за тяхното реализиране. Включена е значителна част от получените резултати и някои основни теми свързани с обсъждането на данните. Авторефератът в съкратен обем дава ясна представа за цялостния облик на дисертационния труд на доц. Тодоров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният дисертационен труд на доц. **Пламен Тодоров**, на тема: **„Криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и фрагменти“** показва, че тя е актуална от научна и практическа гледна точка. Налице е добър баланс в структурата между отделните части на научния труд, с преваляване на обема на научните резултати и тяхното обсъждане. Има достатъчен брой публикации по темата на дисертационния труд, голяма част от които са отпечатани в реномирани международни издания с импакт фактор и са многократно цитирани. Резултатите са представени и на редица научни форуми в страната и чужбина.

В тази връзка, достойнствата на дисертационния труд и изпълнените изисквания за необходимите количествени и качествени критерии съгласно ЗРАСРБ, ППЗРАСРБ и Правилника за развитие на академичния състав на Софийския университет - София, ми дават право да предложа на уважаемите членове на научното жури да присъдят на **доц. Пламен Тодоров Тодоров, дб** научната степен **„ДОКТОР НА НАУКИТЕ“** по специалност 01.06.18 „Клетъчна биология“.

06.01.2018 г.

Изготвил становището:

/Проф. д-р Виктор Златков, дм/