

РЕЦЕНЗИЯ

ОТ ПРОФЕСОР Д-Р СЛАВЧО ТОМОВ ТОМОВ, Д. М. Н.

РЕКТОР НА МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛЕВЕН

Относно представения за публична защита дисертационен труд на тема:

„Оценка на фенотипни и генетични биомаркери на човешки гранулозо-лутеинни клетки и фоликулна течност за успешно приложение на процедури за асистирана репродукция (АРТ)”, разработен от д-р Георги Иванов Николов за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ в професионално направление 4.3. Биологически науки (Клетъчна биология)

Д-р Георги Николов завършва медицина в Медицинския факултет на Медицински университет, гр. София, през 1995 г. Специалност „Акушерство и гинекология” придобива през 2003 г. Старши клиничен ембриолог, сертифициран от ESHRE, е от 2008 год. Получването на този сертификат изисква много сериозни познания и умения в областта на клетъчната биология и асистираната репродукция. Д-р Николов е защитил успешно и магистратура по специалност „Здравен мениджмънт”.

Разнообразните интереси, отличната теоретична подготовка и големият практически опит в интердисциплинарната област на асистираната репродукция представят д-р Г. Николов като специалист от много висока класа. Акушер-гинеколог от 15 години, владее почти всички методи в тази специалност, вкл. ендоскопската хирургия на женския

репродуктивен апарат и е напълно изграден специалист в асистираниите репродуктивни технологии, признат експерт в тази област.

Това става ясно и от различните позиции, които е заемал и заема в момента:

Директор на Медицински център по репродуктивна биология и медицина „Репробиомед“; старши ембриолог и ръководител на Лабораторията по асистирана репродукция в същия Център;

Лектор и татор в Център за телемедицина ТеЛЕЦ, Медицински университет, гр. Плевен;

От 2016 г. води специализиран магистърски курс по ембрио-биотехнологии в Биологически факултет (МП Биология на развитието);

Експерт към наши и международни Агенции: Изпълнителна Агедия по трансплантация (ИАТ) и МЗ по проблемите на АРТ стандартите, законодателството и стратегията за репродуктивно здраве на нацията; национален представител на България в ESHRE; експерт в Съвета на Европа в Страсбург и др.;

Съсновател и секретар на Българската асоциация по гинекологична ендоскопия (2006-2011), а след това е в УС на Българската асоциация по мининвазивна гинекологични хирургия. Съсновател и председател на Българската Асоциация по репродуктивна човешка ембриология (2006-2012). Председател е на Българската асоциация по регенеративна медицина от 2015 г.

Д-р Николов е специализирал във водещи европейски научни структури в посочените области – в Англия, Холандия, Белгия и др.

Дисертационният труд е структуриран съгласно законовите норми и отговаря на изискванията на една съвременна научна разработка. Написан е на 116 стр., илюстриран е с 32 фигури и 11 таблици. В библиографския списък са цитирани 195 литературни източника.

Трудът е представен в следните глави:

Литературен обзор;

Мотиви, цел и задачи;

Материали и методи;

Резултати и дискусия;

Изводи

Авторска справка;

Използвани литературни източници.

За улеснение на читателя авторът е изготвил индекси на фигурите, таблиците и съкращенията.

Научно-изследователската и научно-приложната дейност по дисертационния труд са осъществени както следва: всички пациенти и контроли са третирани в Медицински Център „РепроБиоМед“ – София, а обработката на материалите и експерименталната работа по дисертационния труд са извършени в МЦ „РепроБиоМед“, ИБИР-БАН и Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

Във **Въведението** към предложения ми за рецензиране труд авторът посочва данни на СЗО, базирани на системно проучване на публикувани в 277 демографски и репродуктивно-медицински изследвания, от които става ясно, че честотата на първичния стерилитет сред жените в репродуктивна

възраст е около 2%, а на вторичния достига до 10,5%. У нас няма добре извършени проучвания по въпроса, но оскъдните източници сочат данни в интервала от 120 до 250 хиляди двойки. Тези факти, както и наличието на тежка демографска криза в страната са особено тревожни и показват голямата социална значимост на проблема безплодие при човека.

При значителна част от двойките с репродуктивни проблеми се използват съвременни методи на асистирана репродукция. По данни на Изпълнителната агенция по трансплантация (ИАТ), в България през 2017 г. са взети репродуктивни клетки от мъже и жени на 22 258 лица, обработени са 55 416 овоцита и 17 670 единици семенна течност и са създадени 45 377 предимплантационни ембриона.

Следва обаче да се отбележи, че успеваемостта на методите за асистирана репродукция е относително ниска – в рамките на 8-12% за инсеминациите и 15-35% за ин витро методиките и зависи от редица фактори: възраст на жените и овариален резерв, наличие на предходни оперативни интервенции върху яйчниците, ендометриозата, тазово-възпалителната болест, хипотрофичен ендометриум, някои генетични фактори (напр. вродените тромбофилии), както и имунологични състояния, имащи отношение към фоликуло- и овогенезата и/или към имплантацията.

Редица изследвания в тази насока сочат, че имунната система играе значителна роля в редица процеси от физиологията на яйчника, а именно фоликулогенеза, овогенеза, овулация, оформяне и функциониране на жълтото тяло, овариалната онкогенеза и др.

Авторът счита, че изследователска дейност в посочените области при жени с безплодие би могла да доведе до по-добро разбиране на тези процеси, а също и до по-добра прогноза за успеваемост на методите за асистирана репродукция и до възможност за тяхното оптимизиране.

Това дава основание да се твърди, че проблемите, разглеждани и разработвани от д-р Николов в дисертационния труд са особено актуални.

Обзорът на литературата заема 35 страници. Изключително интелигентно поднесен, той дава представа за отличната теоретична подготовка на автора. Сам по себе си обзорът е една успешна студия в областта на асистираната репродукция, на клетъчната биология и молекулярно-биологичните механизми на репродукцията. Логично следва извода за критичното значение на пролиферацията и диференциацията за нормалния растеж на фоликула и последващата овулация и лутеинизация. Важни са констатациите за “диалог” между овоцита и гранулозните клетки, опосредствен чрез редица ендокринни и паракринни фактори, с краен резултат - диференциация, генна експресия и матурация на овоцита. Особено внимание изследователят отделя на интрафоликуларните сигнални взаимодействия, на генетичния и протеиновия профил на фоликулните компоненти. Според автора това е един интересен и перспективен модел за изследване на пролиферативната активност на клетките, на тяхната диференциация и планирана клетъчна смърт при определяне на качествата на овоцита, респ. на бъдещия ембрион.

Дисертационният труд е **мотивиран** от разбирането на автора за ключовото значение на интрафоликуларните междуклетъчни сигнални взаимодействия, формиращи потенциала на яйчниковия фоликул и качеството на зрелия овоцит, който е обект на процедурите за ин витро оплождане.

Основна цел на дисертационния труд е да бъдат проучени потенциални молекулярно-генетични и имунологични биомаркери при жени с безплодие.

В съответствие с основната цел и проверка на хипотезата, че GLCs биха могли да представляват ресурс на таргетни молекули при имунологичен инфертилитет у жената, авторът е планирал проучвания върху фенотипни характеристики на GLCs и състава на преовулаторна фоликулна течност, имащи отношение за наличието на anti-GLC антитела при безплодни пациенти в програмите за асистирана репродукция.

Като друга важна задача е поставено изследването на корелативни връзки между анти-гранулозни антитела, честотата на апоптозни GLCs и нивата на TNF-alfa и INF-gama във фоликуларните течности на инфертилни жени, отнесени към резултатите от *in vitro* процедурите – брой и качество на получените ембриони.

Изясняването на тезата, че матурационната компетентност на овоцита зависи от генетичния профил на околните гранулозни и кумулусни клетки е друга важна задача, поставена от автора. В този експеримент се цели извършване на експресионен анализ на генни транскрипти на някои важни протеини в кумулусните клетки при жени с първичен и вторичен стерилитет.

За решаване на тези основни задачи авторът е определил **единадесет конкретни експериментални задачи**, включващи прецизиране на експерименталните и контролни групи пациенти, протоколите за хормонална стимулация, обработката на биологичните материали, изследване на нивата и активността на различни антитела, ензими, цитокини, рецептори за мелатонин и др., както и методи за оценка на корелационните зависимости между изследваните параметри.

В методичната част прави впечатление богатата палитра от модерни методики и техники, които са описани изчерпателно: подготовка на антигени за ELISA и имуноблотинг, морфологична оценка на апоптозата,

количествено определяне на цитокини, SDS-PAGE и Western блотинг, количествен RT-PCR, изследване на супероксид дисмутаза и каталаза (SOD и CAT) и статистически анализ на получените данни. Намирам, че подобрите от дисертанта методики са адекватни за решаване на планираните научно-изследователски задачи.

В глава **Резултати** виждаме един интересен подход – извежда се извод, подкрепя се със съответни аргументи от проведения експеримент и анализ и се преминава веднага към дискусия на резултата и съпоставяне с данни на други изследователи. Подобна конструкция улеснява читателя при оценка на резултатите и цялостния труд.

Установена е корелация на повишен титър анти-АГА и намаления фертилизационен индекс с последваща раждаемост при възрастни пациентки с инфертилитет, особено вторичен.

Намерени са промени в антиоксидантния потенциал в КОК, отразен чрез нивата на SOD и CAT, който има директен ефект върху ефективността на асистираните репродуктивни технологии, като високите нива на SOD и CAT са клинично валидирани превентори на апоптоза в КОК, водещи до повишена IVF-ET успеваемост.

Установена е засилена апоптоза на кумулусни и гранулозни клетки с краен резултат - намален репродуктивен потенциал, вкл. нарушения във фоликулогенезата при КОХС и намален фертилизационен индекс.

Открити са клинично-приложими маркери с предстоящо валидиране като LOX1, за оценка на овоцитната компетенция, както и кумулуса експресия на NF-κB като предиктор на вторичен стерилитет

Изследването върху активирането на мелатониновите рецептори и модулацията на експресията на алфа-тубулин и ароматазата чрез ин витро третиране на гранулозо-лутеинови клетки с мелатонин са интересно допълнение към предложения труд и разкриват възможности за целенасочени и обстойни бъдещи проучвания.

Като основни приноси бих посочил следните:

1. Установено е, че антиоксидантната защита на развиващия се овоцит и неговата матurationна компетентност са функция от експресията на специфични генни продукти в гранулозните и кумулусни клетки.

2. Идентифицирани са потенциални биомаркери за оценка на субфертилитет при жени, участващи в програма за асистирана репродукция, изведени от някои характеристики на GLCs и състава на фоликулната течност от преовулаторните фоликули.

3. Експресията на P450–ароматаза и динамиката на цитоскелетните промени зависят от наличието и активирането на рецептори за мелатонин тип MT1 и MT2.

Няма съмнение, че тези приноси имат не само научно-теоретичен, но и значим научно-приложен аспект с готовност за незабавно прилагане в клиничната практика в областта на асистираната репродукция.

Наукометрични критерии. Научните трудове във връзка с дисертационния труд са общо 6, вече издадени – 5; под печат – 1. Една от публикациите е в престижното американско списание *American Journal of Reproductive Immunology*. Цитирани са от редица други международни автори. Дисертантът е първи автор в 1 от 6 статии в списания с импакт фактор и в 2 доклада на международни научни конференции на ESHRE и ICCIR. Оригиналните научни статии са на английски език, като личното

участие на дисертанта е безспорно – в подбора на експерименталните и контролни групи, събирането и подготовката на материалите за изследване, дизайна на проучванията и в активното участие в експериментите по клетъчна и молекулярна биология.

Трябва да отбележа, че авторефератът показва най-важните аспекти на настоящия труд и приносите от него, като е онагледен с 20 фигури и 10 таблици.

Критични забележки имам по отношение на броя на съкращенията, използвани в настоящия труд, но направеният „Индекс на съкращенията” улеснява до известна степен читателя. Намирам, също така и за доста голям наборът от използвани методи, но това вероятно се налага от широкия спектър на проучваните проблеми. Бих препоръчал в бъдещи научни разработки да се доразвият темите за генната експресия на LOX1 и NF- κ B като предиктивни маркери, а така също и за активирането MT1 и MT2 рецепторите и модулацията на експресията на P450-ароматазата и алфатубулин от прилагането на мелатонин ин витро или ин vivo, тъй като в рамките на този труд тези насоки за проучвания стоят малко изолирани.

В заключение считам, че посочените критични бележки не омаловажават ни най-малко научната значимост на дисертационни труд на д-р Георги Николов. Представеният ми за рецензия труд е всеобхватна разработка върху един изключително важен медико-биологичен проблем. Тя включва задълбочени анализи и дискусии, използва съвременни научни методи, онагледена е великолепно и решава успешно поставените цели и задачи.

Ето защо, предлагам на членовете на Научното жури да подкрепят с положителен вот дисертационния труд на д-р Георги Иванов Николов, д.м.

за придобиване на научната степен „Доктор“ в професионално направление 4.3. Биологически науки (Клетъчна биология).

Рецензент: _____

Проф. д-р Славчо Томов, д. м. н.