

**СТАНОВИЩЕ**

от

проф. д-р Савина Петрова Хаджидекова, дм,  
Ръководител на Катедра по Медицинска генетика, Медицински факултет, МУ-София,

на

дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“

Област на висше образование: 4. „Природни науки, математика и информатика“

професионално направление: 4.3. Биологически науки (Клетъчна биология)

**Автор:** Елена Василева Маринова

**Форма на докторантурата:** задочна

**Катедра:** Катедра „Цитология, хистология и ембриология“, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“

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

**Научен ръководител:** Проф. д-р Росица Конакчиева, Катедра Цитология, хистология и ембриология, Биологически факултет, СУ „Св. Кл. Охридски“

Становището е изготвено съгласно Заповед РД38-26 -1089/14.01.2022 на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ и Закона за развитие на академичния състав в Република България (Обн. ДВ. бр.38 от 21 Май 2010г., изм. ДВ. бр.81 от 15 Октомври 2010г., изм. ДВ. бр.101 от 28 Декември 2010г., изм. ДВ. бр.68 от 2 Август 2013г.) във връзка с чл. 7 от Преходните и заключителните разпоредби на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски“.

**1. Общо представяне на докторанта**

Докторантът Елена Василева Маринова се дипломира като “Бакалавър” по специалността Биология в СУ „Св. Климент Охридски“ през 2013 г., а през 2015 г. – като магистър при същия университет. В периода май 2014 г. - февруари 2015 г. е стажант биолог в „РепроБиоМед“ ООД, а от април 2015 г. до момента работи като биолог в същия център. Сред професионалните й компетенции са молекулярно-генетична диагностика на пациенти в генетичната лаборатория, предимплатационна диагностика (PGS) - PGS с реално времеви PCR, NGS и микрочип платформи. Работи в клинична лаборатория и провежда анализи на кръв, сперма и т.н. Изучава методиките на работа в семиологична инвитро лаборатория – подготовка и микроманипулация на гамети и ембриони (ICSI) в асистираното излюпване, биопсиране на ембриони и др.

**2. Актуалност и значимост на дисертационната тема**

Подбраната тема е особено актуална, като се има предвид високата честота на репродуктивните проблеми и че в наши дни репродуктивните проблеми все по-често се решават с методите на асистираната репродукция. Инфертилитетът засяга средно 10-15% от индивидите в репродуктивна възраст и около 15-20% от двойките, желаещи бременност като около една трета от случаите са с т.нар. неизяснен стерилитет. Високата популационна честота и скъпото лечение в съчетание с демографската криза прави проблема много важен за медицинската практика и обществото като цяло. Броят на ин витро процедурите в световен мащаб непрекъснато се увеличава, но въпреки значителното развитие на ин витро технологиите в последното десетилетие, приблизително 70% от ин витро ембрионите не успяват да се имплантират. Успешна имплантация и достигане до живо раждане се постига при едва около 25% от IVF циклите. Процесите на имплантация зависят от три главни фактора – качеството на ембриона, ендометриалната рецептивност и ембрио-ендометриалния синхрон. Прогнозата за вероятността за имплантация е резултат от комплексен анализ, обхващащ оценка на матката и фалопиевите тръби, нивото на ДНК фрагментация в сперматозоидите, имунологични тестове, ендометриални имплантационни маркери, имплантационен прозорец, оценка на качеството на ембриона.

Откриването на нови биомаркери в репродуктивната генетика и изясняването на механизмите, свързани с имплантационните неуспехи ще позволи по-пълното разбиране на причините за инфертилитета и ще даде възможност за изработване на стратегии

за профилактика и лечение на репродуктивните проблеми. Откриването на тези механизми би довело до намаляване броя на процедурите и сериозно покачване на успеваемостта.

### **3. Оценка на структурата на дисертационния труд, получените резултати и приносите**

Дисертационният труд е съобразен с обичайното структуриране на работа от този тип, съгласно възприетите у нас стандарти за дисертация за получаване на научната степен „доктор“. Той включва върху 130 страници, в това число: Въведение – 2 стр., Литературен обзор – 37 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материал и методи – 20 стр., Резултати – 34 стр. и Дискусия – 6 стр., Изводи и Приноси - 3 стр., Цитирана литература - 14 стр. Трудът е онагледен с 25 фигури и 20 таблици в текста. Цитирани са 125 литературни източници. Термините са използвани коректно, текстът е структуриран логически правилно, оформлението на дисертационната работа е стилно, фигурите и таблиците са с високо качество и прецизно обяснение.

#### **Литературен обзор**

Структурата, съдържанието и обема на **литературния обзор** показват отлично познаване на проблема и отразяват изчерпателно проучванията на литературните данни, с логична постройка.. Литературният обзор е представен подробно и достатъчно информативно. Разгледани са основните моменти от анатомията, хистологията и физиологията на женската репродуктивна система и основните процеси на ангиогенезата в ендометриума. Обърнато е внимание на процесите на имплантация и децидуализация. Подробно е разгледана ролята на мелатонина и адаптивните механизми в женската репродукция.

#### **Цел и задачи**

**Целта** е правилно формулирана - да се проучи ролята на клетъчни и молекулни маркери, чиято генна експресия повлиява ендометриалната рецептивност и репродуктивното здраве при жени от българската популация. За постигането ѝ са поставени 8 основни задачи, които са логични и ясно формулирани и съответстват на целта на проучването.

#### **Материали**

Основната група от пациенти включва 307 пациентки с повтарящи се имплантационни неуспехи (134 жени) и повтарящи се спонтанни аборти (173 жени) на възраст между 23 и 43 години. Контролната група включва жени с поне една успешно реализирана бременност на възраст между 25 и 47 години. От 32 пациенти и 4-ри здрави жени в репродуктивна възраст е взета биопсия от ендометриум в средна лутеална фаза за култивиране на стромални ендометриални клетки и анализ на клетъчни протеинови маркери посредством имунофлуоресценция, FACS, Western blot на част от пробите и експресионен анализ на таргетни гени. От венозна кръв са изолирани високомолекулна ДНК за изследване на генетични полиморфизми и серум за ензим-имунологични анализи. Изследвани са и периферна кръв и фоликуларна течност за нива на полови стероиди, цитокини и растежни фактори (IL-1b, VEGF, EGF, TGF-b и др). В допълнение, за оценка качеството на фоликулите и яйцеклетките, от фоликулните пунктати на селектирана група са изолирани и култивирани гранулозни и кумулусни клетки за проучване нива на апоптоза, експресия на специфични маркери за пролиферация и диференциация, цитоскелетни компоненти и клетъчно-адхезивни молекули.

#### **Методи**

В методично отношение дисертационният труд се отличава с прилагането на съвременни методи за научни проучвания, като е представен много добре и подходящо онагледен. При изпълнението на горепосочената цел са използвани следните методи на изследване:

1. Полимеразна Верижна Реакция (Polymerase Chain Reaction – PCR)
2. Хоризонтална агарозна електрофореза
3. Рестрикционен (RFLP) анализ
4. Полимеразна верижна реакция в реално време (Real time PCR)
5. Генетичен експресионен профил на възпалителни маркери
6. Секвенционен анализ по Сангър
7. Бионформатична обработка на получените резултати
8. Моделни клетъчни анализи за проучване на молекулни маркери

9. Имунофлуоресценция и FACS анализи
10. SDS-PAGE и Western Blot анализи
11. Хормонални анализи за естрадиол, прогестерон, кортизол и АМХ
12. Статистическа обработка и анализ на данните

От прегледа на експерименталните техники, може да се заключи, че в процеса на обучението си докторантът е придобил качества на квалифициран изследовател. Усвоени и приложени са широк кръг от класически и съвременни молекулярно биологични методи. Очевидно е, че докторантът има достатъчно молекулярно-биологични познания и използваните методи са подробно описани и обяснени. Приложените методи съответстват на поставените цели и задачи.

### **Резултати и обсъждане**

Постигнатите резултати съответстват на задачите на проучването. Една от задачите на проучването е анализ за точкова мутация, +405 G/C полиморфизъм в 5' нетранслиращ участък от VEGF-A гена и асоциацията му с имплантационни неуспехи и спонтанни аборти при IVF пациенти. Получените резултати показват, че при пациентите с повтарящи се репродуктивни неуспехи се наблюдава висока честота на +405 C/C мутантния вариант (25%) в сравнение с контролната група (3%), което би могло да послужи като основа за разработване на тест за оценка на неизяснени репродуктивни неуспехи. Направен е и анализ на разпределението на генотипа на *MTNR1B* полиморфизмите rs1562444, rs10830962 и rs10830963, който не установява асоциация на комбинираните генотипове с разпространението на спонтанни аборти и/или неуспех на имплантиране.

Анализирана е експресията на някои цитокинови маркери - IL1b, IL10, IL18, TNFa, GATA3 и CD68 в ендометриума, като висока статистическа значимост е установена при CD68 и TNFa при пациенти с повтарящи се загуби на бременността. Не е открита съществена разлика между двете подгрупи пациенти в експресията на изследваните маркери.

Обсъждането е разгърнато адекватно на получените резултати и е в съответствие с литературните данни от използваната библиография.

### **Изводи и приноси**

Изведени и точно формулирани са пет извода, които отразяват резултатите и отговарят напълно на поставените задачи. Съгласна съм с авторската оценка за разработения принос на дисертационния труд.

### **4. Публикации във връзка с дисертационния труд**

Във връзка с дисертацията докторантът е представил 4 публикации, от които 3 са в списания с импакт фактор, реферирани в базата данни Web of Science. Една статия е под печат. В една от статиите Е. Маринова е първи автор, в останалите втори или следващ, Представените научни трудове покриват напълно тематиката на дисертационния труд и съдържат резултати от проведените изследвания. За периода на разработването на дисертационния труд докторантът е участвал в разработването на 3 научно-изследователски проекта, финансирани от Оперативна програма "Наука и образование за интелигентен растеж", Фонд Научни изследвания, МОН и Erasmus+ Capacity Building in Higher Education - EAC/A03/2016. Има пет научни съобщения с постерни презентации на национални и международни научни форуми по темата на дисертацията.

### **5. Автореферат**

Авторефератът е в обем 57 страници като отразява основните раздели и резултати в дисертационния труд.

### **6. Придобрита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”**

От прегледа на експерименталните техники, може да се заключи, че в процеса на обучението си докторантът е придобил качества на квалифициран изследовател. Усвоени и приложени са широк кръг от класически и съвременни молекулярно биологични методи. Трудът легитимира автора като отговорен и надежден изследовател.

### **7. Заключение**

Дисертацията отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (Обн. ДВ. бр.38 от 21 Май 2010г., изм. ДВ. бр.81 от 15 Октомври 2010г., изм. ДВ. бр.101 от 28 Декември 2010г., изм. ДВ. бр.68 от 2 Август 2013г.) във връзка с чл. 7 от Преходните и заключителните разпоредби на Правилника за условията и реда за придобиване на научни

степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски“.

Дисертационният труд “Клетъчни и молекулни маркери за ендометриална рецептивност” е посветен на важен медицински проблем и представлява задълбочено проучване с научна стойност и практическо приложение. При дискутирането на резултатите правят впечатление високата професионална зрялост и научна компетентност на докторанта. Трудът утвърждава автора като отговорен и надежден изследовател, който може да провежда самостоятелно изследвания на високо научно ниво и да интерпретира сложни научни резултати.

В заключение искам да подчертая, че ми беше изключително приятно в професионален план да изготвя становище на дисертацията на Е. Маринова. Познавам лично докторанта и мога да твърдя, че тя е отговорен специалист с изграден авторитет сред професионалните среди.

Всичко това ми дава основание да предложа на уважаваните членове на Научното жури да присъдят образователната и научна степен „Доктор“ на Елена Василева Маринова по докторска програма „Клетъчна биология“.

25 март 2022 г.

ИЗГОТВИЛ СТАНОВИЩЕТО: .....

**ПРОФ. Д-Р САВИНА ХАДЖИДЕКОВА, Д.М.**