

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд на тема: **“Оценка и оптимизиране на витрификацията при човешки предимплантационни ембриони и яйцеклетки”**, на Любослава Димитрова Вълкова, докторант на самостоятелна подготовка към Катедра „Цитология, хистология и ембриология“ за придобиване на ОНС "Доктор" в научно направление **4.3. Биологически науки (Клетъчна Биология 01.06.18)**

Научни ръководители: Проф. д-р Атанас Щерев, дм, Чл.кор. проф. дбн Румен Панков

Рецензент: Проф. дбн Росица Конакчиева, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“

Рецензирането на материалите, представени в настоящата процедура, се основава на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилниците за неговото приложение, на Заповед № РД 38-516/27.10.2020 год. на Ректора на СУ „Св. Кл. Охридски“ за назначаване на Научно жури, и е съобразено с препоръчителните изисквания, приети от Академичния съвет на СУ“ Св. Кл. Охридски“ за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности. Докторантката Любослава Вълкова е представила за процедурата по защитата всички необходими материали, справки и документи. Приложена е Справка от доц. Таня Топузова-Христова – оторизиран представител на за първичното звено според която дисертационният труд е съответствие и надвишава минималните държавни изисквания съгласно ППЗРАСБ. Приложена е декларация за авторство и съ/авторство на трудовете включени в дисертацията. Декларирам, че нямам конфликт на интереси, вкл. съавторство в публикациите на кандидатката.

Биографични данни

Любослава Вълкова се дипломира през 2002 в СУ „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, като магистър по Клетъчна биология и Биология на развитието. Трудовият и стаж от 2002 до момента бележи възходящи позиции в избраната научна специалност вкл. биолог – специалист в Институт по молекулярна биология, БАН, Секция „Структура и функция на хроматина“, ембриолог и страши ембриолог в

АИПСМП „Д-р Атанас Щерев“ЕООД и САГБАЛ ”Д-р Щерев” ЕООД където работи и в момента. Професионалният и опит е изграден почти изцяло в звена за ин-витро асистирана репродукция и включва пълната гама на СОП за обработка на сперматозоиди, яйцеклетки, и ембриони с цел извършване на вътрематочни инсеминации, ин витро оплождане, ИКСИ, ембриотрансфер, замразяване, съхранение, размразяване и използване на сперматозоиди, яйцеклетки и ембриони. Има множество участия в специализирани научни конференции в областта на асистираната репродукция вкл. престижните 17th World Congress on Human Reproduction, Rome, 2017; 21st COGI Congress: Innovation in Reproductive Medicine, Frankfurt, Germany, 2015; the 3rd International Congress on Controversies in cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue & Organs (CRYO), Berlin, Germany, 2013.

Любослава Вълкова е редовен член в български и международни професионални асоциации като ЕВРОПЕЙСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО ЧОВЕШКА РЕПРОДУКЦИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ (ESHRE), БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО СТЕРИЛИТЕТ И РЕПРОДУКТИВНО ЗДАРВЕ (БАСРЗ), БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО ЧОВЕШКА РЕПРОДУКЦИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ (БАРЧЕ). Притежава диплом за СТАРШИ КЛИНИЧЕН ЕМБРИОЛОГ издаден от ESHRE от 2018год.

Актуалност на разработвания проблем

Представеният дисертационен труд попада в актуална медикобиологична област със значителни социални измерения. Отнася се до приложни аспекти и иновации в репродуктивната медицина и асистираната репродукция които все повече заемат територия в решаване на демографски и социално-етични проблеми. Дисертационният труд е мотивиран от състоянието на дейностите по преодоляване на безплодието при човека чрез ин-витро подходи и методи, където съществуват огромни възможности за повишаване ефективността на IVF – процедурите и преодоляване на безплодието с постигане на бременности при различни условия и медицинска предистория, подобряване качеството на клинични и лабораторни практики, икономически съображения и др. Дисертацията е подчинена на задачата за проучване на различни клинични и ембриологични фактори които оказват влияние върху замразяването и размразяването на яйцеклетки и ембриони, както и върху реализираните бременности. Дисертацията си поставя за цел да анализира такива параметри, да определи ефекта им върху резултата от криопрезервацията, което да бъде използвано за нейното оптимизиране. Оптимизирането на методите за замразяване и съхранение на яйцеклетки и ембриони

има конкретен принос за по-голямата сигурност на пациентите, постигането на по-добри резултати и съответно повече родени здрави деца след АРТ. В нейната цялостност разработката представлява пионерен за България принос в актуална научно-приложна област съчетаваща едновременно възможностите на модерните клинични подходи в репродуктивната медицина с иновации в лабораторните ин-витро практики на АРТ.

Обща характеристика на дисертационния труд

Представената дисертация е структурирана и оформена според изискванията. Дисертационният труд е написан на 129 страници, съдържа 31 фигури, 34 таблици и 7 приложения. Въведението в темата съдържа мотивите за разработване на дисертацията и е последвано от Литературен обзор от 19 стр. , следван от Цел и задачи – 2 стр. Глава Материали и методи – 9 стр. Най-голяма част от труда заема глава Резултати – 45 стр., следвана от подробно Обсъждане върху 14 стр. Изводи – 1 стр., Приноси – 1 стр., Списък на научните трудове и участия в конгреси, Списък на използваната литература – 15 стр. Използвани са 274 литературни източника, включващи както класическа библиография в областта на репродуктивната медицина и асиситираната репродукция така и най-нови – от 2019 г., изследвания по темата. Това е свидетелство за актуалността на представения труд и стремежа на кандидатката да допълва и усъвършенства професионалния си опит. Като недостатък по отношение на библиографията мога да отбележа неправилния начин на подреждане на рефернтната справка. Източниците не са подредени по азбучен ред и има смесване на автори на кирилица и латиница, което не е прието за подобен род научни трудове, и би могло да доведе до неточности в цитирането. Представени са приложения, свързани с предмета на дисертацията включващи описания и спецификации на хранителни среди и технологични указания за използване на китове от съответните производители.

Авторефератът е изготвен според изискванията и отразява коректно материала и основните достижения в дисертационния труд. Номерата на таблиците, фигурите и цитиранията в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд поради наложеното пререструктуриране.

Оценка на литературния обзор

Литературният обзор е достатъчно информативен, фокусиран и компетентно съставен. В него поотделно се разгледани въпроси свързани с темата на дисертацията в области като репродуктивна биология и медицина, клетъчна биология и биология на

развитието. Подробно са описани достижения с научни и приложни приноси в областта на асистираната репродукция при човека. Подробно са разгледани въпросите свързани с контролирана овариална хиперстимулация (КОХ), пункция и аспирация на фоликулите, добри практики и иновативност при класическо *in vitro* оплождане (IVF) и трацитоплазмено инжектиране на сперматозоид (ICSI), системи за ко-култивиране на ембрионите с автоложни ендометриални клетки, условията и подходите за ембриотрансфер (ЕТ), използването на асистиран хетчинг за повишаване успеваемостта на ин-витро процедурата. Специално внимание е отделено на теорията и практиките за криоконсервация което е свързано с основната цел на дисертацията. В този раздел прави впечатление изключително добрата информираност и интерпретация на съществуващите данни, което е дало възможност да бъдат адекватно формулирани по-нататък целта и задачите на дисертацията. В тази връзка важно място заема анализът на световния опит върху влиянието на важни ембриологични и клинични фактори върху преживяемостта на човешките предимплантационни ембриони и реализираните бременности при витрифицирани ембриони, замразени на различни дни (от втори до шести ден, включително) от *in vitro* развитието им. В интерес на дисертационния труд би било допълнително анализиране на научната основа на разглежданите процеси, което е сравнително оскъдно. В предложения анализ преобладава елементът на учебно ръководство, което е свързано донякъде и с подчертано научно- приложния характер на дисертацията.

Цел и задачи на дисертационния труд

Целта на дисертационния труд е кратко и ясно формулирана: да се извършат собствени проучвания върху криопрезервационния метод „витрификация“ и да се оптимизира процесът при човешки предимплантационни ембриони и яйцеклетки. Поставени са четири основни, логично свързани и изчерпващи предмета задачи като: 1/ Установяване преживяемостта човешки предимплантационни ембриони замразени чрез витрификация след размразяване в зависимост от различни параметри с критично значение в АРТ практиките вкл. собствени нововъведения; 2/ Установяване процентът реализирани клинични бременности (КБ) спрямо същите фактори описани в 1 зад; 3/ Анализиране на преживяемостта на ембрионите и развиващите се клинични бременности в случаите, когато не се извършва свеж ембриотрансфер, а всички развиващи се ембриони се замразяват и се използват в последващ размразен ембриотрансфер (“freeze all” програма или стратегия); 4/ Извършване на оценка с цел

оптимизиране ефективността на витрификацията при замразяване на яйцеклетки, чрез оценка на преживяемостта им след размразяване и оценка на оплождането и развитието на получените ембриони.

Оценка на глава Материал и методи

Разделът е изложен върху 19 страници и отразява изработването на значителен по обем и богат в методично отношение изследователски материал. Използван е значителен по количество клиничен материал: 2453 предимплантационни човешки ембриони, получени след информирано съгласие, като изследваните цикли PЕТ са 941 при 844 пациентки. За задача 4 са използвани 64 яйцеклетки при 14 пациентки, които са съхранявани по същия начин като предимплантационните ембриони. Всички пациенти са третирани в САГБАЛ „Д-р Щерев“ – София, където са получени, обработвани, криопрезервирани чрез витрификация, съхранявани и размразени анализирани ембриони и яйцеклетки. Използван е пълен арсенал от методи на клетъчната биология и криобиология, и методология за работа с човешки ембриони и гамети, репродуктивни клетки. Кандидатката е овладяла пълноценно класически метод за *in vitro* оплождане (IVF); денудация (оронване) на яйцеклетките и интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоид (ICSI); комбинация от двата метода за оплождане на яйцеклетките (IVF/ICSI); биопсия за изолиране на автоложни ендометриални клетки; ко-култивиране на ембриони с автоложни ендометриални клетки преди витрификацията; свеж ембриотрансфер (ЕТ); изкуствен колапс (ИК); витрификация и размразяване на предимплантационни ембриони; витрификация и размразяване на яйцеклетки; размразен ембриотрансфер (PЕТ). За богатия професионален и научен опит на авторката свидетелства коректното и ясно формулиране на методичните описания, което е един съществен принос за българската приложна репродуктивна медицина.

Методите са описани добросъвестно и достатъчно информативно без излишни подробности, Приложени са описания на апаратурата, химикалите и китовете, които говорят за висок клас оборудване и съвременно професионално ниво и експертиза. Свободното и ясно боравене с терминологията и адекватното описание на методите говорят за натрупания от дисертантката богат експериментален и методичен опит.

Описанието на този раздел дава кратка представа за извършената огромна по обем и трудоемкост работа, в резултат на която са получени убедителни данни позволяващи да бъдат формулирани приносите от този труд.

Оценка на получените резултати

Резултатите от дисертационния труд са представени върху 45 страници и следват адекватно поставените задачи. Отделно е обособена глава Обсъждане върху 14 страници, където авторката е проявила отлична способност за задълбочен и критичен анализ и интерпретация на получените резултати в светлината на собствените и чужди научни доказателства. По-важните резултати се отнасят до проучването на клинични и ембриологични фактори върху преживяемостта на витрифицирани ембриони и постигнатите бременности и получаването на статистическа значимост за фактори като качеството на ембрионите преди замразяване, модифицирането на метода за витрификация на бластоцисти, както и прилагането на изкуствен колапс (ИК) преди витрификацията на бластоцисти. Важен резултат със социално и етично звучене е установената липса на статистическа значимост по отношение преживяемостта на ембрионите за фактори като: възраст на пациентката, метод за оплождане на яйцеклетките: IVF или ICSI, тип на инфертилитета (първичен или вторичен), ден от развитието на ембрионите, на който е извършена витрификацията, както и на срока за съхранение на ембрионите. Особено ценни са данните получени от анализа на витрификацията на яйцеклетки, където кандидатката е проявила избирателност и познаване на основни криобиологични процеси. От съществено значение е фактът, че в резултат на това обстойно проучване са променени и усъвършенствани редица практики в лабораторията по ин-витро оплождане и АРТ методологията, което е бесспорен приложен принос на дисертационния труд.

Въз основа на обобщението на огромен брой данни по отделните задачи са формулирани 8 извода, които отразяват коректно изследователската работа и получени резултати и приемам по същество. Намирам, че в Извод 7 е необходимо известно уточнение на „факторите с положителен ефект върху криоконсервацията на ембриони“ - от полза би било тяхното обобщено назоваване. По отношение на извод 8 намирам, че е неподходящо формулиран – в този си вид звучи неубедително и дискриминиращо като не носи полезна информация. (*Цитат*: „Витрификацията на донорски в сравнение със собствени яйцеклетки води до достоверно по-висок процент преживяемост след размразяване“).

Формулираните приноси са три с подчертано приложен характер и социално и икономическо значение. Те адекватно отразяват същността на дисертационния труд и неговото значение за научната общност в областта на асистираната репродукция.

Безапелационното им звучене очертава профила на авторката и я откроява като перспективен специалист по човешка ембриология, криоконсервация и по специално витрификация на ембриони и репродуктивни клетки. Тези качества придобиват особено значение в съвременната ситуация на пандемия с повишени изисквания за съхранение и безопасно манипулиране с човешки материал, като потвърждават приноса на авторката в създаването на добри практики и алгоритми в тази област.

Изложените бележки не омаловажават качествата на един последователно и отлично разработен изследователски труд в трудно достъпна и непроучена област каквато е човешката репродукция. В съвкупност, получените резултати дават основание той да бъде възприеман като значително обещаващо постижение за българската репродуктивна биология и медицина с богато приложение в методологията на АРТ.

Заключение

Рецензираният дисертационен труд отразява задълбочена самостоятелна научна разработка, реализирана с широк арсенал от методи на съвременната клетъчна биология и човешка ембриология, които са позволили реализирането на научно-приложни резултати чрез получаването на информация на съвременен научно ниво. Използвайки последователен и целенасочен подход изследванията са довели до получаването на оригинални данни с медико-приложно значение. Имайки предвид професионалните качества на докторантката и научните постижения в настоящия труд, изразявам своята положителна оценка за представения дисертационен труд и убедено препоръчвам на членовете на Научното жури, назначено със Заповед № РД 38-516/27.10.2020 год. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ да присъдят на Любослава Димитрова Вълкова образователната и научна степен ”Доктор” в професионално направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност Клетъчна биология 01.06.18.

21.11.2020 год.

Рецензент:

София

проф. дбн Росица Конакчиева