

РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационен труд, представен от доц. д-р Пламен Тодоров Тодоров за получаване на научна степен „доктор на науките“ на тема:

„Криобиологични изследване върху човешки овариални клетки и фрагменти“.

От проф. д-р Бойчо Лазаров Биволарски, катедра „Фармакология, физиология на животните и физиологична химия“, ВМФ при Тракийски университет, Стара Загора

Информация за кандидата

Доцент Пламен Тодоров е роден на 25.04.1963г. в гр. София. Висшето си образование завършва в Московската ветеринарна академия, Русия. През периода 1989-1993г. е аспирант в Института по проблемите на криобиологията и криомедицината в гр.Харков, Украйна, където успешно защитава кандидатска дисертация и получава научно-образователната степен „доктор“ по специалност „Криобиология“. Следва да се отбележи, че темата и съдържанието на кандидатската му дисертация в никакъв случай не се припокриват с представения ми за рецензиране труд. От 1994г. е назначен в Институт по биология и имунология на размножаването на БАН, където понастоящем е доцент и Завеждащ секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите“. Работи и на допълнителен трудов договор като главен ембриолог в Инвитро МЦ „Димитров“. Председател е на Българската асоциация по репродуктивна човешка ембриология и главен редактор на списание „Ембриология“. Сертифициран е като главен ембриолог (Senior Clinical Embryologist) от Европейската асоциация по човешка репродукция и ембриология (ESHRE). Бил е ръководител на множество научно-изследователски проекти. Под негово ръководство успешно са защитени две дисертации. И в момента ръководи докторанти и дипломанти. Има 85 научни труда, голяма част от които са публикувани в реномирани международни издания и са многократно цитирани.

Актуалност на темата

Дисертационният труд на доц. Пламен Тодоров е посветен на важна тема в човешката репродукция и е фокусиран върху провеждане на криобиологични изследвания на човешки овариални клетки и фрагменти с цел оптимизиране на технологията за криоконсервация на овариална тъкан. На фона на съвременните постижения в тази област, все още остава не напълно решен въпросът относно възможностите за раждане на деца от жени с някои проблемни заболявания (онкологични, хематологични, автоимунни и др.). Известно е, че в много случаи химио/лъчетерапията при раковоболни пациенти води до увреждане на гонадалните функции. Ето защо на тях се предлагат възможности за криоконсервация и съхранение на гаметите или ембриони (технологията е много добре отработена и се използва в клиниките за асистирана репродукция както у нас, така и в чужбина). При момичета, не достигнали полова зрялост, криоконсервацията на ооцити и ембриони е неприложима, поради което единственият начин за фертилно застраховане е замразяване на овариална тъкан. Този метод, макар и да се води все още експериментален, вече намира приложение в развитите страни, а ефектът от него е доста обнадеждаващ (има родени над 100 деца след криоконсервация на овариална тъкан). Въпреки това успеваемостта на метода е твърде ниска, което е голямо предизвикателство пред научната общност за по-нататъшни задълбочени изследвания в тази област. В този аспект считам, че представената ми за рецензиране работа е актуална не само в национален, но и в световен мащаб.

Структура на дисертацията

Дисертационният труд на доц. Пламен Тодоров е написан на 159 стандартни машинописни страници, илюстриран със 7 таблици и 47 фигури. Той се е съобразил с изискванията за отпечатване на дисертационен труд и последователно е представил уводна част, литературен обзор, цел и задачи на изследването, материал и методи, резултати и обсъждане, заключение, изводи, приноси, списък на използваната литература и приложение. В структурно отношение са спазени съответните пропорции, което ми дава основание да приема дисертационния труд като балансиран.

Литературният преглед на дисертацията третира и анализира достатъчен брой източници. Последователно са представени и обобщени въпроси, свързани със структурата на яйчниците, овогенезата и фоликулогенезата, строежа на фоликулите и тяхната класификация, ендокринната стимулация на фоликулогенезата, хормоналната

функция и регулацията на репродуктивните процеси в яйчниците, както и влиянието на химио/лъчетерапията върху физиологичните процеси в яйчниците. Успоредно с това е акцентирано върху факторите, които влияят на биологичните обекти по време на замразяването им, подходите за тяхната защита и методите за криоконсервация. Акцентира се и върху криоконсервация на предимплантационни ембриони, на ооцити, както и на криоконсервация и трансплантация на овариална тъкан. В този раздел са използвани достатъчен брой съвременни литературни източници, което ми дава основание да отбележа, че използваната информация е актуална и конкретно свързана с проблема, и което е по-важно – дава се възможност за обективно поставени цел и задачи на изследванията.

Въз основа на набелязаните в обзора проблеми е поставена конкретна **цел** – провеждане на криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и фрагменти с оглед оптимизиране на технологията за тяхната криоконсервация. Поставените **задачи** са точно формулирани и произтичат логично от поставената цел.

Собствените изследвания са планирани и проведени целенасочено, като е потърсен отговор на въпросите, поставени в целта на изследването. Позволявам си да отбележа, че изследванията са проведени в продължение на 20 години в колаборация на научни работници от БАН, Медицински център „Димитров” и Университета в гр. Кьолн, Германия, което придава още по-голямо значение на представените резултати в дисертацията. При това са използвани достатъчно на брой съвременни методични единици при реализацията на поставените от автора задачи (криоконсервация, морфологични, хистологични, имунохистохимични, радиоимунологични и др. изследвания). Използваните методики са добре описани и позволяват да бъдат възпроизведени.

Резултатите и обсъждането на дисертационния труд, както вече споменах, с достатъчно на брой таблици и фигури, са най-съществената, най-обемистата и впечатляваща част. В нея са представени задълбочено и компетентно получените от автора резултати. Прави впечатление стриктната последователност на изложените данни, които по безспорен начин свидетелстват за реално извършена продължителна практическа научно-изследователска работа, както и последователна интерпретация на получените резултати с конкретика на статистически доказани разлики. Трудно мога да посоча всичко, тъй като резултатите са многобройни с високо съдържателна информация, поради което ще обобща няколко ключови примери.

Задълбочено са изследвани морфологичните и функционалните характеристики на овариалните клетки и е предложена ефикасна методика за култивирането им ин-витро. Наблюдавана е хетерогенност по отношение морфологията на клетките, с присъствие на епителоидна и фибробластоподобна форма, като при култивиране за по-дълъг период от време, се установява тенденция с придобиване на фибробластоподобна форма. След култивиране на овариалните клетки в среда, в която е добавен тестостерон, се наблюдават промени в морфологията на клетъчните ядра. Този феномен за сега не е проучен и може да бъде обект за по-нататъшни допълнителни изследвания. При самостоятелно добавяне на препаратите Gonal-F и Puregon се предизвиква повишен синтез на естрадиол от гранулозни човешки клетки, отколкото при клетки, инкубирани в хранителна среда. Постановката на експериментите, касаещи базалната и стимулирана секреция на естрадиол и ароматазната активност на клетките ин-витро, е оригинална и може да бъде използвана като тест за изследване на функционалната им активност.

Установено е, че човешките овариални клетки експресират стадий-специфичен ембрионален антиген (SSEA – 1 и -4), октамер-свързан транскрипционен фактор (Oct 3/4), Nanog и транскрипционен фактор, свързан с регулацията на ембрионалното развитие (Sox – 2).

Макар и малко встрани от основната криобиологична тематика на дисертационния труд, направени са опити за култивиране на овариални фоликули ин-витро – въпрос, особено важен за репродуктивната медицина. Наблюдавано е по-добро запазване на структурата на тъканта и развитието на фоликулите ин-витро при 2D-култивиране на овариални фрагменти в условията на микровибрации. Ко-култивирането със стромални овариални клетки или мезенхимни стволови клетки в 3D-система „висяща капка“, се явява ефективен метод за оптимизиране на условията за матурация на овариалните фоликули. Препоръчвам на автора да задълбочи в бъдеще изследванията в това направление.

От криобиологичните проучвания особено внимание според мен заслужава резултатите, свързани с токсичността на различните криопротектори. Етилен-гликолят е най-слабо токсичен в сравнение с другите тествани криопротектори, а успоредно с това има добро криозащитно действие, което дава основание да бъде препоръчано за практично приложение в репродуктивната медицина, особено в случаите на витрификация.

Получените резултати показват, че при криоконсервация, е добре да се замразяват фрагменти не само от кортикалния слой, а в тях да присъства и част от медулата, която има значение за реваскулизацията и подхранването на фоликулите при последваща бъдеща трансплантация на размразената тъкан. От практична гледна точка се препоръчва преинкубацията на овариалните фрагменти при 5⁰ С преди замразяване в продължение на 24 h. Това не само не уврежда фоликулите, но и намалява експресията на фосфатидилсерин след размразяване. Последните две групи експерименти имат пряко отношение към внедряването на метода в практиката.

Препоръчва се като по-ефективен метод за криоконсервация програмното (бавно) замразяване на овариални фрагменти, тъй като това води до по-добро запазване на морфофизиологичните показатели на тъканта в сравнение с витрификацията. Авторът отбелязва факта, че ксенотрансплантацията е ефективен метод за преценка на функционалното състояние на размразената овариална тъкан.

Оценявам този раздел като богат на експериментални данни, многоспектърен, с висока степен на анализ и обобщеност, ценна фундаментална и практична стойност, както и насочено информативен и разкриващ големия потенциал на изследванията. Посочените общи характеристики са сериозна основа за разнообразни и многобройни приноси, а така също и добра основа за бъдещи изследвания в областта на репродукцията при човека.

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

Изводите (10 на брой) са коректно формулирани, отразяват получените резултати и като цяло съответстват на поставените задачи.

Съгласен съм с предложените от автора научни **приноси** (5 броя), които показват, че за първи път в нашата страна, са проведени комплексни криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и фрагменти, осъществена е криоконсервация на тези биообекти, както и е реализирана автотрансплантация и ксенотрансплантация на замразена човешка овариална тъкан. За тези научни изследвания и за получените резултати научният екип, в който е и доц. Тодоров, е удостоен с наградата „Signum Laudis Pro Scientiae Meritis“ за най-добра разработка в областта на медико-биологичните науки за периода 2002-2003 г.

Списъкът на използваната литература обхваща 293 заглавия, от които 12 на кирилица и 281 на латиница. Приятно впечатление прави фактът, че голяма част от цитираните източници са от последните 5 години.

Забележки към дисертационния труд

Независимо от силата на аргументите, свързани с актуалността на разглежданите проблеми, незначителните празноти в литературата, осветляващи проблемите в криобиологията, правилната постановка и коректното изпълнение на изследванията, ще си позволя да посоча някои бележки и виждания, които не трябва да бъдат третираны като несъгласие от моя страна за бъдещата дейност на доц. Тодоров:

1. В заключението (стр.125) е отбелязано, че програмното замразяване е по-ефективен метод за криоконсервация на човешка овариална тъкан в сравнение с витрификацията, а в извод № 4 (стр.126) се посочва, че витрификацията е по-ефективен метод в сравнение с програмното замразяване или конвенционалния метод (на парите на азота). Кое е вярното?

2. На някои места в дисертацията, отделни мерни единици са дадени в системата SI, а в други са изписани на кирилица. Моето скромно мнение е , че всички тези единици трябва да бъдат представени в системата SI.

Публикационна активност на автора

Авторът е представил 31 научни работи по темата на дисертационния труд. Две от работите, макар и публикувани в реномирани международни издания, не са в пълен текст, а са резюмета от участия в конгреси. От останалите 29 публикации 19 са отпечатани в реферирани списания. 11 от представените работи са с общ импакт фактор – 20.837, като са цитирани 189 пъти. Доц. Тодоров е докладвал свои резултати на 17 наши и международни научни форуми. Публикационната активност на автора напълно покрива препоръчителните критерии на Биологическия факултет на СУ за придобиване на научната степен „доктор на науките“.

Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и макар и в съкратен вид, точно отразява получените резултати и дава ясна представа за дисертационния труд.

Заклучение

В заключение ще отбележа, че извършената многогодишна експериментална работа, е достатъчна по обем и отговаря на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България, Правилника за приложението му и Препоръки за критериите при придобиване на научни степени и заемането на академични длъжности в СУ за професионално направление „Биологически науки и Биотехнологии“. Проучвайки актуални проблеми по криобиология на човешки овариални клетки и фрагменти, доц. Пламен Тодоров е показал литературна осведоменост, правилен методичен подход, коректност и аналитична способност при представяне и обсъждане на получените резултати. В резултат на това са представени конкретни изводи и приноси с важно научно приложение. Всичко това ми дава достатъчно основание да оценя положително постигнатото в дисертационния труд и да препоръчам на почитаемите членове на Научното жури да гласуват „За“ присъждане на научната степен „доктор на науките“ на доц. Пламен Тодоров по професионално направление 4.3 Биологични науки.

10.01.2018 година

Стара Загора

Рецензент:

/Проф. Бойчо Биволарски/