

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Сорен Бохос Хайрабедян, дбн

Институт по биология и имунология на размножаването - БАН

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'  
професионално направление 4.3. Биологически науки (Клетъчна биология)

**Автор:** Елена Маринова

**Форма на докторантурата:** задочна подготовка

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

**Тема:** „КЛЕТЪЧНИ И МОЛЕКУЛНИ МАРКЕРИ ЗА ЕНДОМЕТРИАЛНА РЕЦЕПТИВНОСТ“

**Научен ръководител:** Проф. Росица Конакчиева, дбн – СУ „Св. Кл. Охридски“

### 1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на електронен носител е в съответствие с ЗРАСРЗ, ППЗРАСРБ и препоръчителните изисквания, приети от Академичния съвет на СУ „Св. Климент Охридски“ за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности на СУ „Св. Кл. Охридски“, и включва следните документи: административни документи свързани с разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд; автобиография в европейски формат с подпис на докторанта; копие от диплома за висше образование; дисертационен труд; автореферат; списък на научните публикации по темата на дисертацията; копия на научните публикации; списък на участията в научни форуми; списък на забелязани цитирания; декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи. Докторантът е приложил 4 публикации и 5 съобщения от научни форуми. Документите са изрядно подредени и представени в лесно достъпен дигитален вид.

### 2. Кратки биографични данни за докторанта

Докторантката Елена Маринова е завършила магистратура по „Биология на развитието“ през 2013 в Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“. От 2015 до момента заема длъжност „Биолог“ в Медицински Център Репробиомед, София, където работи в Офис за технологичен трансфер за молекулярна генетика и диагностика. Паралелно е зачислена като задочен докторант към Катедра „Цитология хистология и ембриология“ на БФ на СУ от 2016 до 2020.

Освен рутинна диагностична работа, по време на провеждане на свободната си докторантура, Елена Маринова участва в три проекта, свързани със създаване на нови образователни програми в репродуктивната медицина, където води курсове за медицинска генетична

диагностика за специалисти от Университета Нови Сад (по Оперативна програма “Наука и образование за интелигентен растеж“; проект Erasmus+ Capacity Building in Higher Education на тема: Curricula Development in the Fields of Reproductive Biology/Assisted Reproductive Technologies and Regenerative Medicine in Serbia), както и в научни проекти финансирани от Фонд „Научни изследвания“ (с Р-л проф. дбн Росица Конакчиева). Има над 7 участия в научни конференции в по асистираната репродукция - Международна конференция по Преимплантационна Генетика (Италия, Испания, Тайланд), както и в Международна конференция по Генетика и ембриология (Франция).

Елена Маринова е член на ЕВРОПЕЙСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО ЧОВЕШКА РЕПРОДУКЦИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ (ESHRE), БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО СТЕРИЛИТЕТ И РЕПРОДУКТИВНО ЗДРАВЕ (БАСРЗ), БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО ЧОВЕШКА РЕПРОДУКЦИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ (БАРЧЕ), като е завършила програма за сертифициран „КЛИНИЧЕН ЕМБРИОЛОГ“ с диплом издаден от ESHRE.

### **3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи**

Разработения научен труд е изключително актуален с изследването на нови биомаркери позволяващи оценка на ендометриалната рецептивност и фактори свързани с нейното нарушаване водещи до имплантационен дефицит, с последващи резултати като повтарящи се имплантационни неуспехи (Recurrent Implantation Failure, RIF), и повтарящи се спонтанни аборти (Recurrent Pregnancy Loss, RPL). Актуалността и приносите са свързани от една страна с борбата с обществено предизвикателство като намалената раждаемост, свързана с напредналата възраст на част от родилките, както и с неизяснени причини съпътстващи промени в ендометриалния проинфламаторния статус и микробиом, а от друга страна са свързани с търсене на нови биомаркери за персонализиране на терапевтичното поведение при RIF, RPL и др., и изясняване на процесите свързани с, и прогнозиране на успеваемостта на една бъдеща нативна или АРТ индуцирана имплантация, с по-добър шанс за успешно износване на бременността.

Поставените цели са много конкретни и позволяват добро дефиниране и изпълнение на произтичащите задачи. Организирано е и е проведено много добре клинично и ин витро изследване на полиморфизми в съдов ендотелен растежен фактор, свързан с потенциала на ендометриума да образува нови съдове (физиологична ангиогенеза, ключова за успешната имплантация, при развитието на спиралните артерии), полиморфизми свързани с рецепторите на мелатонин в ендометриума, имащи значение за регулацията на диференциацията на МСК, вероятно и в ендометриума, синхронизацията на циркадните ритми и медираните от ГТФ-азни протеини сигнални пътища, както и експресионен анализ на панел от проинфламаторни и анти-инфламаторни гени, нивата на продуктите на които могат да имат важно значение за ендометриалната рецептивност и респективно наличието на рекурентни аборти или имплантационни провали.

### **4. Познаване на проблема**

Докторантката работи дълги години рутинно редица молекулярно биологични методи за оценка на фактори свързани с ендометриалния статус, както и маркери за оценка на риск

от имплантационен провал и прогнозиране на успешна бременност. Събраната клинична извадка и богатството на молекулярно-биологичните методи е значително. RIF и RPL са чести проблеми в клиничната практика с висока значимост поради липсата на изяснена етиология, което е основен двигател на изследвания в тази посока, каквато донякъде е и настоящата разработка.

Литературния обзор по темата е с най-голям обем, без да се подценяват останалите глави, и включва въведение в проблема, представяне на маркерите и обосновка за използването им.

Докторантката е придобила познания и умения свързани с молекулярно-генетичната диагностика на пациенти в генетичната лаборатория, провеждане на изследвания по предимплатационната диагностика, извършване на генетичен анализ при процедури по асистирана репродукция – предимплатационен скрининг с количествен RT-PCR, новогенерационно секвениране (NGS) и микрочипов анализ, работа в клинична биохимична лаборатория, както и методи за работа в ин витро лаборатория за подготовка и микроманипулация на гамети и ембриони (ICSI) в асистираното излюпване, биопсиране на ембриони и пр., които са помогнали значително при изработване и оформяне на научния труд.

## **5. Методика на изследването**

Методично дисертационния труд е представен от мини-клинични проучвания за валидиране на предварително селектирани полиморфизми в гените кодиращи ендотелния растежен фактор VEGF – ключов компонент в ремоделирането на еднометриалната микроваскулатура, рецептора на мелатонин, кодиран от гена MTNR1B, както и ендометриалната експресия (иРНК) на гените кодиращи про-инфламаторните цитокини IL1B, IL18, TNFa, GATA3, маркерите за моноцитна/макрофагиална инфилтрация и ендотелна (лизозомална) активация - CD68, рецептора от семейството на вродената имунна сигнализация TLR4, и анти-инфламаторния цитокин - IL10. Приложените молекулярни методи върху извадка от над 300 пациента са много и разнообразни, вкл. изолиране на ДНК и РНК, синтеза на копи-ДНК, полимеразна верижна реакция PCR/RT-PCR, рестрикционен анализ RLFP, SANGER секвениране, агарозна електрофореза и софтуерен анализ на данните.

Отделно са проведени обширни ин витро изследвания изследващи ролята на епифизния хормон мелатонин като имуноенвродокринен модулатор на репродуктивната система, чрез проследяване на клетъчна пролиферация, миграция и цитоскелетна динамика. Фенотипизирани са и първични клетки изолирани от ендометриум.

## **6. Характеристика и оценка на дисертационния труд**

Представената дисертация е структурирана и оформена според изискванията на Закона и на СУ. Дисертационният труд е разписан в 130 страници, съдържа 25 фигури и 20 таблици. В Приложения са посочени списъци на публикации свързани с дисертацията, участия в конгреси и научни проекти. Труда е структуриран по следния начин: въведение в темата с мотивите за разработване на дисертацията, последвано от Литературен обзор от 35 стр., Цел и задачи – 1 стр., Глави Материали и методи – 20 стр., Резултати и обсъждане – 33 стр., Диску-

сия на най-важните резултати върху – 4 стр., Изводи – 2 стр., Приноси – 1 стр., Списък на научните трудове и участия в конгреси, Списък на използваната литература. Цитирани са около 190 литературни източника, включващи и най-нови изследвания по темата от 2020.

Авторефератът е изготвен според изискванията и отразява коректно материала и основните достижения в дисертационния труд.

Литературният обзор е достатъчно информативен, представени са проблеми като рецептивност на ендометриума и ролята на генетични маркери за оценката му; механизми на сигнализация участващи в комуникацията ембрион – ендометриум, децидуализация и ангиогенеза; генетични полиморфизми на ангиогенни фактори; инфламаторни реакции в яйчника и отношението им към рецептивността и имплантацията; роля на инфламаторните процеси в ендометриума, водещи до неговата нарушена рецептивност; потенциална роля на хормона мелатонин като нов маркер за физиологична адаптация и клетъчен модулатор в процесите на диференциация и др.

Целта на дисертационния труд е кратко и ясно формулирана – валидиране на потенциални биомаркери за ендометриална рецептивност, въз основа на което са дефинирани и задачите. Материал и методи отразява изработването на значителен по обем и богат в методично отношение изследователски материал. Резултатите от дисертационния труд са представени върху 35 страници и следват адекватно поставените задачи. Отделно е обособена глава Обща дискусия върху 6 страници, където докторантката е направила в много сбит, но информативен вид критичен преглед на своите резултати в светлината на данните от литературата. Изводите са представени отделно. Анализа на резултатите и Изводите ще направя заедно с анализа на Приносите.

## **7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката**

Основните постижения на труда са от научно-приложен характер и са свързани с анализа на нови биомаркери за ендометриална рецептивност.

Първите приноси са свързани с показани корелации на полиморфизми +405 G/C в гена кодиращ ангиогенен растежен фактор VEGF, като е използвана комбинация от PCR амплификация на изследвания фрагмент, RFLP рестрикционен анализа за идентифициране на комбинациите на изява на полиморфизма и Санджер секвениране за валидиране на резултатите анализирани с RFLP (агараозна гел електрофореза на рестриктаза обработени фрагменти от получените ампликони). Един от основните изводи и приноси от работата е свързан именно с този метод – установено е асоциация на +405 C/C хаплотип в гена VEGF-A с репродуктивни неуспехи дължащи се на липса на имплантация след извършен вътрематочен трансфер на ембриони или ранни повтарящи се спонтанни аборти. Методът е валидиран и приложим в рутинната практика, което го прави сериозен принос за внедряване, особено като се има в предвид и модифицирането му за приложение на RT-PCR вместо RFLP.

Вторият много интересен и сериозен извод е свързан с изследването на асоцииране на полиморфизмите rs1562444, rs10830962 и rs10830963 в гена MTNR1B, кодиращ мелатонинов рецептор и изследващ възможни нарушения на циркадните ритми свързани с ендометриалната рецептивност. Подходът за изследване е аналогичен – PCR/RFLP. Установява се, че индивидуалното разпределение на посочените полиморфизми не се различава сигнификантно

между пациенти с репродуктивни нарушения (спонтанни аборти или неуспех на имплантиране) и здрави жени с реализирана бременност, но наличието на хаплотип rs1562444 AA / rs10830962 GG е значително по-рядко при жени със спонтанни аборти или неуспех на имплантиране, отколкото при жени с поне едно раждане (2,9% срещу 22,2%,  $p=0,028$ ). Анализа показва асоциация на генотипи rs1562444 (AG) или (GG) с повтарящи се аборти (RPL) и много ниска честота при генотип AA. Според мен подходът е много интересен и трябва да се разшири с функционални изследвания ин витро на вариантите на рецепторите за определяне на функция, както и с NGS за по-пълно характеризиране на клъстери гени асоциирани с RPL.

Третия принос е свързан с пилотното изследване на връзката м/у ендометриалната рецептивност, отразена като разпространеност на повишена експресия на иРНК на цитокинови и имунни маркери при жени с RPL/RIF и здрави родилки, и сигнификатно повишената експресия на гените IL1b, IL18, TNF $\alpha$ , TLR4, GATA3 и CD68. Посочени са като важни само CD68 и TNF $\alpha$ , и е направена връзка с ендометриалното възпаление. Бих препоръчал използването на термини като „про-инфламаторни“ процеси вместо възпалителни процеси, поради факта, че докторантката открива сигнификатно повишени и иРНК на цитокините IL1b, IL18, което може да доведе до компрометирана ендометриална рецептивност и без да се наблюдава клинично/хистологично манифестирано възпаление (на ендоскопия). Това е така, поради факта, че открития феномен от проф. Сара Робъртс за подготовка на ендометриална популация от Т-регулаторни клетки представляващи ало-антигените на сперматозоидите се изгражда при определен локален цитокинов профил, с участието на ендометриалните НК клетки. Повишението на IL1B/IL18, както и за активността на НК кл., манифестирано чрез CD68 е предпоставка за нарушен баланс в изграждането на локалните Т-рег. клетки и ще доведе до имплантационен провал. Данните от IL1B/IL18 показват превеса им, макар и с малко (несигнификатно) за спонтанни аборти и неуспешни имплантации, което отразява различния афинитет на IL1 рецепторите към тези цитокини. Повишението на TLR4 може да е свързано с директна стимулация на рецептора или с повишено ниво на локални миелоидни клетки, свързано с инфламаторен процес. За мен панелът е много интересен като резултат и има голям прогностичен потенциал. Това е съществен принос, на който би трябвало да се обърне повече внимание.

Четвъртата група изводи и приноси са свързани с ин витро изследвания, както на клетъчни култури, така и на първично изолирани смесени клетъчни култури от биопсичния материал използван и за експресионния анализ на про-инфламаторните гени посочен по-горе, както и за оценка на експресията на интегрин  $\alpha\beta3$ , характерен за периода на повишена възприемчивост на ендометриума, наличието на лимфоцитна инфилтрация и пр. Флоуцитометричен анализ на стромални клетки изолирани от ендометриума показва характерни мезенхимни маркери. Ин витро изследванията на клетъчни култури са комбинирани с имунофлуоресценция или имуноблот и показват ролята на мелатонина при клетъчната диференциация и възможността да бъде използван за клетъчно диференциране на пластичните стромални клетки, както и профилите на експресия на двата основни типа мелатонинови рецептори. Тези данни могат да послужат за основа на бъдещи ин витро моделни изследвания за приложението му в моделиране на ендометриалната рецептивност.

Като обобщение за приносния характер на труда може да се каже, че има 2 генетични и 1 експресионен теста с потенциал за директно клинично приложение, както и ин витро данни с фундаментален характер, които биха били добра основа за създаване на бъдещи модели за приложението на мелатонин при моделиране на ендометриалната рецептивност.

## 8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Представени са общо 4 публикации, 3 от които са с ИФ, като приноса на докторанта е значителен и е свързан с молекулярно-биологичните методи за оценка на полиморфизми в гени на мелатониновия рецептор в клинична кохорта пациенти, както и в ин витро моделни системи от гранулоза-лутеинови клетки.

Публикациите могат да бъдат класифицирани по вид (статии – 4 броя; доклади – 5 броя), по значимост (статии в издания с импакт-фактор – 3 броя), по място на публикуване (статии в реферирани международни списания – 3 броя, доклади в трудове на международни научни конференции в чужбина – 5 броя; статии в национални списания – 1 броя).

Личното участие на докторанта в проведеното дисертационно изследване е повече от явно и е водещо в молекулярно-биологичните подходи, което прави в голяма степен формулираните приноси и получени резултати, негова лична заслуга.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд *съдържа научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката* и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ. Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания на БФ на СУ.

Дисертационният труд показва, че докторантката Елена Маринова **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност **Клетъчна биология** като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’ в професионално направление 4.3. Биологически науки (Клетъчна биология)** на Елена Василева Маринова.

15.03.2022 г.

Рецензент: .....

проф. д-р Сорен Хайрабемян, дбн