

## **СТАНОВИЩЕ**

от Проф. д-р Иванка Исталианова Димова, дм

Ръководител на Лаборатория по Геномна диагностика, ЦММ, МУ-София

Професор към Катедра по Медицинска генетика, МФ, МУ-София

на Дисертационния труд на Любослава Димитрова Вълкова на тема

**„Оценка и оптимизиране на витрификацията при човешки**

**предимплантационни ембриони и яйцеклетки“**

представен за присъждане на Образователната и Научна степен „Доктор“

**Докторска програма:** Клетъчна биология

**Катедра:** Цитология, хистология и ембриология

**Област на висшето образование:** 4.3. Биологически науки

**Научни ръководители:** Проф. Д-р Атанас Щерев, дм и Чл. кор. Проф.

Румен Панков, дбн

Изборът за член на научното жури е съгласно Заповед РД38-516/27.10.2020 г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“. Становището е съобразено с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото приложение, както и с Правилника за развитие на академичния състав на СУ.

### **1. Структура на дисертационния труд**

Дисертационният труд съдържа общо 129 страници, онагледен е с 31 фигури и 34 таблици. Библиографията включва 274 заглавия, от които 8 на български език и 266 на латиница. Има и 4 приложения – Приложение 1 (Информация за среда за градиентно разделяне на сперма), Приложение 2 (Информация за среди за витрификация на ембриони в стадий на делене), Приложение 3 (Информация за среди за витрификация на ембриони в стадий на бластоцист) и Приложение 4 (Протоколи за замразяване и

размразяване на яйцеклетки и ембриони). Дисертационният труд е структуриран съгласно общоприетите стандарти и включва следните основни раздели: Въведение – 2 стр.; Литературен обзор – 20 стр.; Цел и Задачи – 2 стр.; Материали и методи – 10 стр.; Резултати – 45 стр.; Обсъждане – 15 стр.; Изводи и Приноси – по 1 стр. В началото е представено Съдържание и Списък на използваните съкращения.

## **1. Актуалност на избраната тема**

Асистираниите репродуктивни техники се превърнаха в неделима част от модерната медицина и днес те играят ключова роля за репродуктивното здраве и семейното планиране. В много страни, вкл. и България, непрекъснато нараства пропорцията на раждания след АРТ, като вече надхвърля 5% от общия брой. Голямото значение на АРТ за обществото и решаването на демографските проблеми превърна тази област на медицината в една от най-силно развиващите се научни области с непрестанно усъвършенстване на технологиите и нови достижения. Наред с големите достижения в имунологията, андрологията, генетиката, в последните години значително нарасна интереса към криобиологията – науката, която изучава методите за замразяване на клетки и ембриони и тяхното приложение. Днес се счита, че методите за криопрезервация на ембриони не са само начин за съхраняване на ембрионите, но и вид терапевтична интервенция, която има потенциал да подобри успеваемостта на репродуктивните техники при инфертилни двойки. Те са тясно свързани с генетичния скрининг на ембрионите и предотвратяването на спонтанни аборти след АРТ, по-голяма безопасност след овариална хиперстимулация и други причини за отлагане на трансфер. Криопрезервацията на яйцеклетките има съществено значение за запазване на фертилитета при химио- и лъчетерапия, както и при използване на донорски яйцеклетки в решаването на сложни репродуктивни проблеми. Подобно на другите



области в АРТ медицината, технологиите на криопрезервация непрекъснато се усъвършенстват, като в момента за по-съвършена техника се счита витрификацията – процес на бързо замразяване, което не позволява на водните молекули да формират кристали, а вместо това моментално се консолидират върху стъклоподобна структура.

Без съмнение темата, посветена на оценка и оптимизиране на витрификацията при човешки предимплантационни ембриони и яйцеклетки е актуална, съвременна и с голямо научно-приложно значение.

## **2. Представяне на дисертационния труд**

**Литературният обзор** показва отлично познаване на проблема – стъпките и техниките на асистирана репродукция, криопрезервацията с нейните физико-химични характеристики и видовете криопротектори, както и процесите на витрификация. Значително внимание е отделено на частта, строго свързана с АРТ - замразяване на гаметите, ембриони и репродуктивни тъкани. Подробният обзор на тези техники показва принадлежността на докторантката към една от най-добрите репродуктивни школи в България. Общото ми впечатление е, че обзорът е написан задълбочено, синтезирано и ясно показва, че оптимизирането на криопрезервацията на яйцеклетки и ембриони би повишило ефективността на АРТ, а оттам и неговото здравно социално значение.

На фона на добре представения обзор, логично е формулирана **ЦЕЛТА** на дисертационния труд, а именно - да се направи обстоен анализ, на базата на собствени резултати, на криопрезервационния метод „витрификация“ и да се оптимизира процесът при човешки предимплантационни ембриони и яйцеклетки.

**Задачите** са 4 на брой и правилно отразяват пътя за постигане на целта.

В главата **Материали и Методи** са описани броя на изследваните ембриони и яйцеклетки и целия използван арсенал от методи. В

изследването са включени 2931 предимплантационни човешки ембриони замразени чрез витрификация. От тях размразени с цел извършване на размразен ембриотрансфер (РЕТ) са 2453 ембриони. Изследваните цикли РЕТ са 941, при 844 пациентки. Витрифицирани са 64 яйцеклетки при 14 пациентки, които са съхранявани по същия начин като предимплантационните ембриони. Без съмнение това е най-голямото за България проучване върху приложението на витрификацията и нейните ефекти за изхода от АРТ. Методите са описани подробно и разбираемо, така че да бъдат възпроизведени.

Разделът **Резултати** е съставен от няколко подраздели. В първия подраздел докторантката прави подробно описание на всички разглеждани параметри при изследваните ембриони и яйцеклетки – морфология на размразените витрифицирани ембриони; преживяемост; връзка с показатели преди замразяването; деня от ембрионалното развитие, в който е извършена витрификацията; модификации на витрификационните и размразителните разтвори; типа на фертилитета; срока на съхранение на витрифицираните ембриони; ко-култивиране на ембрионите с автоложни едометриални клетки преди витрификацията; прилагане на отворена и затворена система за витрификация; извършване на изкуствен колапс на бластоцистите преди витрификацията. Във втория подраздел докторантката описва реализирани клинични бременности (КБ) след прилагане на криопрезервационния метод витрификация и последващ размразен ембриотрансфер (РЕТ). Установени са близо 36% реализирани КБ спрямо извършен РЕТ. Разгледани са факторите, които влияят върху процента реализирани бременности. Последната част от Резултатите е свързана с оценка на преживяемостта, последващото оплождане и развитие на човешки яйцеклетки при прилагане на витрификация.

Прави впечатление изключително доброто онагледяване на резултатите с много ясни представителни снимки, фигури и таблици. Всичко това



показва един много богат, повече от 10-годишен, опит в областта на ембриологията и криобиологията, който дава сериозни научни и статистически значими резултати.

В раздела **Обсъждане** е направено критично обсъждане на получените резултати във връзка с литературните данни. Като цяло дискусията е направена обстойно и задълбочено, показва отлична способност за научна интерпретация на получените данни.

Представянето на резултатите и обсъждането дава възможност на докторантката да обобщи 8 важни **изводи**. Първите два касаят преживяемостта на витрифицираните ембриони след размразяване, следващите 5 са свързани с процента реализирани бременности и факторите, които ги повлияват. Витрифицирането на бластоцисти води до статистически достоверно по-висок процент реализирани КБ в сравнение с ембриони на ден трети, при пациенти  $\leq 35$  години. Установяването на факторите с положителен ефект върху криоконсервацията е довело до значимо увеличаване на реализираните КБ през годините (от 11,1% през 2003 година до 47,2% през 2015 година). Последният извод отразява, че витрификацията на донорски в сравнение със собствени яйцеклетки води до достоверно по-висок процент преживяемост след размразяване.

Докторантката извежда 3 **приноси** с оригинален и научно-приложен характер.

**Авторефератът** обхваща 51 страници, като по-голямата част представя собствените резултати и обсъждането. Съдържанието отговаря напълно на представеното в дисертацията и дава ясна представа за основните достижения на докторантката.

### **3. Публикации и принос на докторанта**

Резултатите от дисертационния труд са представени в 9 публикации – едната е под печат в списание с импакт фактор, едната е резюме в списание

с импакт фактор, 2 публикувани пълен текст в списание с импакт фактор и 5 в български списания. Представени са 7 абстракти от конгреси, публикувани в списания и 8 участия в научни форуми. В 7 от публикациите, 3 от конгресните абстракти и във всички участия в научни форуми докторантката е водещ автор, което подчертава нейния основен принос в направеното проучване.

**В заключение**, дисертационният труд на Любослава Вълкова е актуално и съвременно изследване, което допринася за оптимизиране на методите за витрификация на ембриони и яйцеклетки, изясняване на техните ефекти и причинно-следствени връзки и разширяване на възможностите за тяхното приложение в репродуктивната медицина. Резултатите са представени обстойно и са обсъдени критично. Показани са сериозни теоретични и практически познания в областта и капацитет за самостоятелни научни търсения. Всичко това ми дава основание да препоръчам на членовете на Научното жури да присъдят на Любослава Димитрова Вълкова научно-образователната степен „Доктор” в професионално направление 4.3. Биологически науки.

26.11.2020 г.

София

Рецензент:



Проф.д-р Иванка Димова, дм