

СТАНОВИЩЕ

от професор д-р Сорен Бохос Хайрабедян, дбн

Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“, БАН

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'

професионално направление 4.3. Биологически науки

докторска програма „Клетъчна биология“ на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, Катедра „Цитология, хистология и ембриология“

Автор: Д-р Георги Николов

Форма на докторантурата: самостоятелна подготовка

Катедра: Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, Катедра „Цитология, хистология и ембриология“

Тема: Оценка на фенотипни и генетични биомаркери на човешки гранулозо-лутеинни клетки и фоликулна течност за успешно приложение на процедури за асистирана репродукция (АРТ)

Научен ръководител: Професор Росица Конакчиева, дбн - Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет

(акад. дл., име, презиме, фамилия, н. ст. – научна организация)

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на хартиен /електронен носител е в съответствие с Чл.115 (1) от Процедура за придобиване на ОНС „доктор“ в Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, Катедра „Цитология, хистология и ембриология“; Правилник на СУ:

- автобиография 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

Докторантът е приложил 5+1 публикации, автореферат и пълнотекстов формат на дисертационния труд, изпълнен в луксозна подвързия.

Д-р Георги Николов демонстрира сериозни професионални интердисциплинарни умения, като завършва медицина през 1995 с отличие, придобива специалност Акушерство и гинекология и репродуктивна медицина през 2003, а от 2008 год. е сертифициран от ESHRE Старши клиничен ембриолог. Трябва да се отбележи, че последната квалификация е свързана със сериозни познания и умения в областта на клетъчната биология и нейното приложение в асистираната репродукция. Тези си познания и умения д-р Николов е съчетал и с една отлично защитена магистратура по икономика по специалност „Здравен мениджмънт“.

Интердисциплинарните интереси на д-р Николов го превръщат в един завършен специалист по репродуктивна медицина от много висока класа, което става явно от заеманите от докторанта позиции – над 15 год. трудов стаж, като Акушер - раждания по нормален път и чрез Цезарово сечение, Гинеколог, ендоскопски хирург, Специалист по репродуктивна медицина и АРТ, Ръководител на лабораторията по Асистирана репродукция и старши клиничен ембриолог. Последната позиция е сертифицирана от European Society of Human Reproduction and Embryology в продължение на над 8 год. (от 2008). Д-р Николов има дългогодишна експертна дейност в областта на асистираната репродукция (АР) към редица държавни органи и агенции, както и НПО, като от над 8 год. е консултант по АР на Изпълнителната агенция по трансплантации, консултант/експерт на МЗ по проблемите на АРТ-законодателството, по здравната стратегия за репродуктивно здраве и по изготвяне на Правилника на ЦФАР, консултант по АГ и РМ на НЗОК, Основател и Секретар на Българска Асоциация по Гинекологична Ендоскопия (2006-11), Основател и Президент на Българска Асоциация по Репродуктивна Човешка Ембриология (2006-2012). Д-р Николов е лектор и татор в Центъра по телемедицина ТеЛЕЦ към МУ-Плевен, както и експерт на Европейско ниво - Национален представител в ESHRE, Експерт в Съвета на Европа, Страсбург; Европейски Директорат по качество на лекарствата и здравеопазването, и др. Понастоящем д-р Николов е Управител и Началник сектор АР и ендоскопия на МЦ „РепроБиоМед“, в чието развитие участва професионално от 2005 год. Д-р Николов има редица специализации в международни научни организации, като Diaconessenhuis Voorburg, Eppendorf-Netheler-Hinz Marketing training center, както и при председателката на ESHRE Dr Anna Veiga по проект относно „Guidance on Vigilance and Surveillance in ART in EU: Fragility of gametes and embryos,,.

Всички тези данни красноречиво показват д-р Николов като завършен експерт по въпросите на репродуктивната медицина.

2. Актуалност на тематиката

Разработвания проблем в дисертационния труд на д-р Николов е несъмнено актуален и отразява визията му на интердисциплинарен изследовател и много добре подготвен клиницист. Настоящия демографски срив на българската популация и очакваното и намаление от 2.5 мил. души в следващите 10 год., съчетано с принципно висок процент инфертилит при двойките, при успеваемост на АРТ процедурите, която не е в състояние да компенсира напълно дефицита в раждаемостта, правят изследванията по темата изключително актуални, както за Р. България, така и за останалите развити страни в ЕС и света. В този аспект настоящият дисертационен труд изследва някои имуно-биологични, молекулярно биологични и ендокринологични феномени, които имат значение за правилното функциониране на кумулус-ооцитния комплекс и яйчниковия фоликул като цяло, и които определят ефективността на нативната и асистираната репродуктивна ефективност. Честотата на тези феномени нараства с възрастта, което е от особено значение като се има в предвид и нарасналата средна възраст на репродуктивно ангажираните двойки, и съпътстващите я технологични предизвикателства пред съвременните АРТ. Изследването на антитела срещу гранулоза-лутеинните клетки (анти-АГА Ат), нивото на апоптоза в КОК, нивата на SOD и CAT във ФТ, продукцията на про-инфламаторни цитокини като TNF- α и IFN- γ , ядрената трансактивация на про-инфламаторния транскрипционен фактор NF- κ B и оценката на ооцитната компетентност рефлектирана от транскрипционния профил на прилежащи кумулус по иРНК на LOX1, както и ефектите на ооцит промотиращия мелатонин върху P450 ароматазата компилират фокуса на автора върху „проучването на потенциални биомаркери при жени с безплодиеедие“, чрез един комплексен опит за оценка на процесите на

„интрафоликуларните междуклетъчни сигнални взаимодействия, формиращи потенциала на яйчниковия фоликул и качеството на зрелия овоцит, който е обект на процедурите за ин витро оплождане“. Отделните задачи поставени в дисертационния труд са с нарастваща степен на технологична сложност и актуалност, като оценката на промените в ароматазната активност и транскрипционното профилиране на кумулусни клетки имат висока актуалност в последните години. Наблюдаваните имунологични промени от друга страна отразяват феноменологично новите разбирания за ролята на вродения имунитет за човешката патология, свързан със стареенето и хроничните тъканни про-инфламаторни реакции.

3. Познаване на проблема

Д-р Николов има над 15 год. трудов стаж в областта на репродуктивната медицина, ембриологията и акушерството и гинекологията, като от 8 год. е ESHRE сертифициран старши ембриолог. Като инициатор на множество професионални организации в областта и дългогодишен експерт към МЗ, НЗОК и ИАТ, той има доказана експертиза в клиничните аспекти на проблема. Дългогодишната му работа и като ембриолог, както и в колаборации с национално-признати и международни изследователски групи показва и добро познаване на проблема от гледна точка на клетъчен биолог.

4. Методика на изследването

Проучванията в настоящият дисертационен труд са свързани с използването на широк диапазон от методи от имунологията, клетъчната и молекулярната биология, както и статистика използвана в клиничните проучвания. Много добро впечатление правят размерите и структурата на кохортите пациенти в изследваните извадки, като съпоставимостта е особено добра и отговаря на изискванията на официалните клинични проучвания.

Имунологичният подход използван в оценката на анти-АГА и др. Ат е публикуван в престижното сп. *Am. J. Reprod. Immunol.*, като съпоставката на инфертилната популация е адекватно предоставена като разлика от над 2 стандартни отклонения спрямо интактната към репродуктивна патология. Ядрената транслокация на NF-κB е оценена с адекватна лиза на клетките и сепарация на органелите във фракции, оценката на транскрипционните нива на LOX1 е нормализирана по интактен на промени в кумулусните клетки конститутивно експресиран ген, като е използвана едностъпкова технология с минимизирана възможност за технологично въведена вариационна грешка.

Останалите методи също напълно отговарят на съвременните стандарти за анализ на клетъчна морфология и функционална експресия на гени/протеини.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд е написан на 116 стр., илюстриран е с 32 фигури и 11 таблици. В библиографския списък са цитирани 195 литературни източника. Въведението и литературния обзор са разписани особено увлекателно и дидактично. Имам дребна забележка към излагането на целите и задачите, обикновено се представят в по-йерархично оформен вид, с по-малко детайлизация. Представените цели и задачи от друга страна са въведени достъпно и концептуално и след това следва формализирано детайлно описание. Обемът на работата е значителен и това донякъде обяснява детайлизацията.

Материалите и методите са много добре описани, с точни инклузивни и ексклузивни критерии на подбраните групи изследвани пациенти и различните контролни групи. Аналитичните изследователски методи също са описани по стандартите на изследванията и дисертационните трудове от домена на експерименталните науки, с висока доза точност и възможност за репродуциране на резултатите.

Подробно са описани и стимулационните протоколи използвани при процедурите за стимулация на пациентките.

Разделът с резултати е доста подробен, структуриран много добре, с последователно поднасяне на извод, резултати които го формират и кратка дискусия свързана със самия резултат от методичен или съпоставителен характер.

Разделът дискусия е изключително добре написан, като внимателно е прецизирано нивото на генерализация на изводите и съпоставката на резултатите на автора с тези в световната литература.

Приносите на дисертационния труд са лесно видими и изводими още при преглед на раздел резултати и са синтетично поднесени в раздел дискусия и заключение. Много добро впечатление прави наличието на подраздел показващ насоките за бъдещи изследвания, както и насоки за подобряване на терапевтичните подходи, с което дисертацията напълно поднася вид и стандарт на дисертационен труд на Европейско ниво.

Основните изводи/постижения на настоящия дисертационен труд са представени в 10 точки и могат да се представят и обобщят по следния начин:

- установената корелация на повишен титър анти-АГА и др. Ат и намаления фертилизационен индекс и последваща раждаемост в контекста на нарастваща средна възраст на пациентки с инфертилитет, особено вторичен. Доизяснява се ролята на антителата с/у ГЛК за инфертилитета по механизъм засягащ оплодителната компетенция на овоцитите, чрез потенциране на увредата на КОК, а не на отговора към контролирана овариална хиперстимулация;
- тези ефекти са свързани с промени в антиоксидантния потенциал в КОК, отразен чрез нивата на SOD и CAT, който има директен ефект върху ефективността на АРТ;
- наблюдаваните промени са резултат от повишена кумулусна и гранулоцитна апоптоза, корелиращи с повишени про-инфламаторни нива на цитокините TNF- α и IFN- γ открити във ФТ и повишена проинфламаторна сигнализация на NF- κ B в кумулусните клетки, свързващи процесите на стареене на фоликула с активиране на про-инфламаторен и авто-имунен отговор, водещ до намален репродуктивен потенциал, вкл. нарушения във фоликулогенезата при КОХС и намален фертилизационен индекс;
- изведени са клинично-приложими маркери, като високите нива на SOD и CAT са клинично валидирани превентори на апоптоза в КОК водещи до повишена IVF-ET успеваемост;
- изведени са клинично-приложими маркери с предстоящо валидиране като LOX1, позволяващи оценка на овоцитната компетенция, и кумулусна транслокация на NF- κ B като предиктор на вторичен стерилитет;
- установено е, че човешките гранулозни клетки експресират рецептори за мелатонин и е валидирана мелатонинива сигнализация водеща до модулиране на ароматазните нива и алфа-тубулуна;

Основните приноси с директна приложимост в клиничната практика, както и приноси с бъдещ транслируем потенциал са следните:

1. В статистически адекватна извадка са идентифицирани потенциални биомаркери за статуса на субфертилитет при жени, участващи в програма за асистирана репродукция чрез ин витро оплождане, въз основа на характеристики на гранулозо-лутеинни клетки и състава на фоликулната течност от преовулаторните фоликули;

2. Установено е, че матurationната компетентност на развиващия се овоцит зависи от експресията на специфични генни продукти в заобикалящите го гранулозни и кумулусни клетки, които осигуряват адекватна антиоксидантна защита;

3. Важни диференциращи характеристики на гранулозо-лутеинните клетки, като експресията на P450 – ароматаза и динамиката на цитоскелетните промени зависят от наличието и активирането на рецептори за мелатонин тип MT1 и MT2;

Посочените приноси имат както приложен, така и до известна степен фундаментален характер, като показват и взаимовръзката на процесите на увреда на клетките изграждащи КОК в резултат на стареене, свръх-стимулация и др. за развитието на имуно-обусловен фертилизационен дефицит.

Някои от проучванията са правени в течение на години и по същество представляват практическо приложение на въпросните концепции. Очертаните перспективи за бъдещо развитие представляват интерес не само от клинична, но и от фундаментална перспектива, особено ако са изпълнени с най-съвременни аналитични методи, с които клиниката и академичната общност разполага в момента.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Публикациите на докторанта, представени към този дисертационен труд са научни статии – 5 броя издадени и 1 брой под печат; доклади – 6 броя, като от тях 5 статии са в издания с импакт-фактор, като една статия е в престижното за областта списание *American Journal of Reproductive Immunology*. Данните са представени в 2 пленарни доклади и 4 постерни сесии. Д-р Николов е първи автор в 1 от 6 статии в реферирани международни списания с импакт фактор и 2 доклада в трудове на международни научни конференции организирани от *European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)* и *International Coordination Committee for Immunology of Reproduction (ICCIR)*. От 6 конференции, само две са проведени на български език, докато всички оригинални научни статии са написани на английски език.

Личното участие на докторанта в проведените проучвания е ключово, като се вземе в предвид дизайна, организацията и провеждането на клиничната част, свързана със събирането на биологичните материали, проследяването на пациентите и анализа на получените данни. В едно от изследванията, което е по същество клетъчно-биологично и изцяло експериментално, д-р Николов е първи автор. Получените резултати и формираните изводи постигнати с активното участие на д-р Николов, като клиничният аспект на проучването е умело съчетан с анализ на имуно-биологичните феномени изследвани в проучването.

Като цяло трудът е много информативен и добре разписан. Нямам сериозни критични бележки. Бих препоръчал в раздела описващ Цели и задачи по-систематичен подход, след сполучливото въведение в проблематиката. Също така бих препоръчал и малко по-разширена

дискусията относно взаимодействията на вродената имунна сигнализация, клетъчната увреда и клетъчната съдба и смърт по отношение възникването на авто-имунен отговор към авто-антигени на КОК. Моята лична трактовка на въпроса се доближава до представената от д-р Николов, но причините за възникване на авто-антигени могат да са по-широки и да вкл. не само модифициране на самите авто-антигени, но и неправилно антиген представяне от епителни непрофесионални АПК, както и съчетание на цитокинов профил водещ до изместване на толерогенен към автоимунен Th17 отговор. Свързаната с клетъчни увреди с/без стареене клетъчна смърт е източник на "danger" сигнали и в съчетание с посочения повишен IFN-g, може да служи като предпоставка именно за авто-имунен отговор, опосредстван от МНС II експресиращ КОК, представящ собствени, неправилно процесирани антигени. Това всъщност прави работата особено интересна от гледна точка на репродуктивната имунология.

7. Автореферат

Авторефератът е с отлично качество, подготвен е по изискванията Катедра „Цитология, хистология и ембриология“ към Биологическия факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, и съдържа 20 фигури и 10 таблици, като представя най-съществените резултати и приносите на настоящият дисертационен труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд **съдържа научно-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 и Правилника на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет. Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания, приети във връзка с Правилника на Биологически факултет на СУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантът д-р Георги Николов **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'** на д-р Георги Николов в докторска програма по *Клетъчна биология*.

26.08.2018 г.

Изготвил становището:

CONFIDENTIAL

(проф. д-р Сорен Бохос Хайрабедян, дбн)