

Становище

от

Проф. д-р Атанас Димитров Щерев

специалист по акушерство, гинекология, репродуктивно здраве и организация и управление на здравеопазването и социалната сфера

в Русенски университет „Ангел Кънчев“ <http://www.uni-ruse.bg>,

ул. "Студентска" 8, Русе, пк. 7017 ;

Бургаски университет „Проф. д-р Асен Златаров“, 8010 гр. Бургас,

Бул. Проф.д-рЯкимов 1 ;

Медицински комплекс „Д-р Щерев“, кв. „Разсадника“, ул.„ Христо

Благоев“ 25-31, София 1330; тел. + 359 888 939310; email:

ashterev@gmail.com

относно : Дисертация за придобиване на научна степен „Доктор на науките“ от доц. Пламен Тодоров Тодоров на тема „Криобиологични изследвания върху човешки овариални клетки и фрагменти“

На заседание на Факултетния съвет на Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“, проведено на 7 ноември 2017 г. е взето решение за откриване на процедура за присъждане на научна степен „Доктор на науките“ на доц. д-р Пламен Тодоров Тодоров. И в същото заседание с решение на ФС съм избран в журито за съответната процедура.

Кратки биографични данни

Доц. Пламен Тодоров завършва средното си образование в 32 училище в София, а през 1988 г. – Ветеринарна академия в Москва. От 1989 до 1993 г. е редовен докторант в Института по проблемите на криобиологията и криомедицината в Харков, Украйна. От 1994 г. до сега работи в Института по биология и имунология на размножаването в БАН като специалист научен сътрудник. От 2007 г. е хабилитиран - доцент. От декември 2014 до май 2017 г. е зам.-директор на ИБИР и от 2017 г. е ръководител на секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите“ при ИБИР.

Доц. Тодоров е сертифициран senior embryologist от ESHRE, председател на Българската асоциация по репродуктивна човешка ембриология, главен редактор на сп. „Ембриология“, ръководител на успешно и в срок защитили 14 души дипломанти и двама докторанти. В момента ръководи трима докторанти и един дипломант. Има значителна научна продукция в специализирани списания и форуми, което ще изложа по-късно.

Актуалност на разработвания проблем и обща характеристика на дисертационния труд

Запазването на репродуктивните възможности при жената е актуален проблем на съвременното по различни причини. На първо място, в цивилизования свят забременяването на жените се отлага във връзка с обучението, квалификацията им и продължителността на учебния процес. Това отлага забременяването, създаването на семейства и раждането на деца към последната третина на зрялата репродуктивна възраст. Така замразяването на яйцеклетки или на яйчникова тъкан се явява важен фактор за запазване на репродуктивните възможности при жената. Друг проблем на съвременното във връзка и с увеличаването на продължителността на живота са раковите заболявания, които са на второ място в световен мащаб като причина за смъртност след сърдечно-съдовите. Благодарение на съвременните комплексни методи на лечение преживяемостта на онкологично болните постоянно се увеличава, като при голяма част от случаите се постига и пълно оздравяване. Това поставя на дневен ред и въпроса за качеството на живота на вече излекуваните или в трайна ремисия пациенти. Това е и възможността да имат деца. Известно е, че лечението, което се провежда, уврежда яйчника като репродуктивен орган и затова неговото екстрапониране или замразяване е условието да се запази фертилитетът на пациентката, която е подложена на противотуморна терапия.

Друга категория пациенти, нуждаещи се от запазване на фертилитета, са тези с автоимунни заболявания. Това са специфични системни болести, при много от които началото е в репродуктивна възраст. При лечението се прилагат различни лекарствени средства и технологии, които увреждат гонадите и при тази ситуация замразяването на яйчникова тъкан или яйцеклетки също се явява решаващ момент за запазване на фертилността. За съжаление при съвременното развитие на криобиологията замразяването на овариални клетки или овариални фрагменти, а защо не и цял яйчник, е свързано с редица неизяснени въпроси. Всичко това налага задълбочени и системни проучвания на тази част от криобиологията, което прави актуален разработения проблем в настоящата дисертация.

Съдържание и структура на дисертационния труд

Настоящият дисертационен труд съдържа 159 стандартни машинописни страници.

Библиографската справка съдържа 293 литературни източника, от които 12 на кирилица, а останалите – на латиница. Като съдържание и структура трудът отговаря на изискванията за разработка на дисертация, систематизирана както следва: Въведение, Литературен обзор, който е разгънат на 46 страници, Цели и задачи на дисертационния труд, описани Материал и методи, като подробно е описан изследователският материал, методите за изследване, методи за криоконсервация и трансплантация на овариална тъкан. Следва разделът Резултати и обсъждане с изследвания върху овариални клетки, изследвания върху фрагменти от овариална тъкан, криоконсервация и клиничен случай за автоложна трансплантация на човешка овариална тъкан. Накрая трудът завършва с Изводи и приноси. Приложени са публикациите, свързани с темата на дисертационния труд. Литературният обзор е изчерпателен, подробен, с голяма познавателна стойност. Проученият литературен материал е оценен критично и творчески, което позволява на дисертанта да прави компетентен анализ на по-късно получените от него резултати и теоретични постановки. Целта на дисертационния труд е формулирана правилно. Поставените за проучване задачи са точно дефинирани и отразяват основните моменти от съдържанието на дисертационния труд. Задачите са пет на брой и са точно дефинирани и отразяват основните моменти от съдържанието на дисертационния труд. В главата Материал и методи са описани източниците на данни, периодът на събирането им и тяхното съдържание, както и статистическите методи.

Дисертационният труд се основава на изследвания, извършвани в периода 1996-2016 г. на базата на ИБИР-БАН, Институт по микробиология-БАН и Университета в град Кьолн, Германия. Използвани са овариални клетки и фрагменти от жени, участващи в програмите за инвитро оплождане в Медицински център „Димитров“ или подложени на планови операции на яйчниците. Получаването на експерименталния материал е ставало с разрешение на Комисия по етика към съответното лечебно заведение и информирано съгласие от страна на пациентите. Подробно са описани получаването и инвитро култивиране на овариални клетки, получаването и култивиране на гранулозни клетки, култивиране на мезенхимни стволови клетки, а също така получаване на овариални фрагменти, култивирането на тези фрагменти овариална тъкан. Описани са също клетъчните и тъканните култури, които са използвани, морфологичните изследвания при

култивиране, хистологични изследвания на овариалната тъкан, имунохистология, имунохистохимия, радиоимунологичен флоуцитометричен анализ, имунофенотипизиране на мезенхимни стволови клетки, програмно замразяване на клетки, програмно замразяване на овариални фрагменти, а също така и разновидността на замразяване- витрификация на овариални фрагменти. В проведените експерименти е включена трансплантация на човешка овариална тъкан на имунодефицитни мишки като модел за съответствие с поставените изследователски задачи.

В Резултати и обсъждане са описани морфологични функционални характеристики на овариалните клетки при култивиране. Оценена е базалната и стимулирана секреция на стероидни хормони и ароматазната активност на овариалните клетки инвитро. Анализирани са базалната и стимулирана секреция на 17-бета естрадиол от човешки гранулозни клетки, култивирани инвитро. Изследвано е токсичното действие на различни криопротектори върху овариалните клетки в смесена култура. Направени са сравнителни изследвания върху методи за криопрезервация на човешки гранулозни клетки. В главата за експресия на маркери за плурипотентност на човешките овариални клетки авторът разглежда критично становището, че овариалният резерв се формира само в пренаталния период и намаляването на съществуващия при раждането брой ооцити не може да бъде компенсирани. Аргументирано разглежда възможностите за диференциация, оогенеза, последваща в живота на жената след раждането и. По-нататък обсъждането продължава с култивиране инвитро на човешка овариална тъкан и изолирани фоликули и накрая се разглеждат сравнителни изследвания върху методи за криоконсервация на човешка овариална тъкан.

Изследвани са процесите на реваскуларизация, протичащи в овариалната тъкан след различни методи на криоконсервация и последваща ксенотрансплантация. Разглежда се влиянието на продължителността на периода на преинкубация на овариалната тъкан върху ефективността на процеса на криоконсервация.

Дисертационният труд завършва с десет извода и описани от автора пет броя приноси от дисертационния труд.

Дисертантът представя във връзка с труда си 31 публикации, повечето от които в престижни научни списания. В половината от представените публикации доц. Пламен Тодоров е първи автор. Представени са и 17 презентации на конгреси и симпозиуми. Представена е справка за 21 цитирани публикации в 264 цитиращи източници.

Оценка на приносите в дисертационния труд :

По отношение на клетъчните култури – предложен е модел за оценка на функционалната активност при култивиране на клетките ин-витро (базална и стимулирана секреция на естрадиол и ароматазна активност), който би могъл да се използва в практиката – при тестване на различни вещества, методи за замразяване и др.

В чисто практическо отношение важни са резултатите, които са получени по отношение размера на фрагментите (наличие на медула) и периодът на преинкубация:

Колкото по-малки са фрагментите, по-лесно се замразяват, затова в практиката обикновено използват малки парченца само от кортекса. От друга страна, това затруднява бъдещата трансплантация и ангиогенезата след трансплантация. Резултатите в дисертацията показват, че ако има и част от медулата, фрагментите по-добре преживяват (на мишки). Този резултат е дискутабилен, защото има противоположно мнение за премахване на медулата на яйчниковите фрагменти, но заслужава внимание и по-задълбочени проучвания.

Периодът на преинкубация е важен в смисъл дали трябва да се замразява тъканта веднага след получаване (което в много случаи е практически невъзможно), или може да се изчака някакъв период (напр. до 24 часа), в който парчето яйчник да бъде транспортирано до лабораторията (която може да е и в друг град) при хладилна температура. Резултатите на дисертанта показват, че няколкочасова инкубация при ниски положителни температури не влияят върху успеваемостта на последващата трансплантация, дори се получават по-добри резултати по отношение на апоптозата (коментира се, че вероятно клетките се адаптират в известна степен към околонулевите температури)

Не на последно място настоящия труд показва, че трансплантацията на човешка овариална тъкан на имунодефицитни мишки е добър метод за оценка на процесите, протичащи след присаждане на тъканта.

Методите за криоконсервиране на яйчникова тъкан са все още в развитие, дейността в тази част от криобиологията е пионерска и почти всички изследвания в тази насока са определен принос за методиката, което личи от публикациите в периодичния научен печат и цитираните публикации.

В този смисъл съм съгласен напълно със значимостта на описаните приноси.

Критични бележки:

Написано е „патологичен анализ“ на стр. 51 от дисертацията. По-добре и правилно е – „патоанатомичен анализ“!

„Получаване на яйчникова тъкан от аспирати“. Не се случва или е много рядко, няма как да е метод за получаване на такава - стр 51 от дисертацията.

„Изследвания с 3 PN, единични от тях стават бластоцисти.“ Не са най-добър модел за изследване, но много автори пишат, че са ползвали такива.

Използва се Bovine Serum, за експерименти -да, но за практиката-недопустимо- стр 61 от дисертацията.

Допуснати някои правописни грешки-„Ефект на присъствието на медула“ 118 стр. от дисертацията

В Материали и методи не винаги се съобщават брой жени, брой яйчници, брой аспирати - не навсякъде става ясно колко обемисти са експериментите.

Критичните бележки не са значими ,за да намалят достойнствата на дисертационния труд.

Оценка на автореферата:

Авторефератът представя достоверно структурата и съдържанието на дисертационния труд с акцент върху най-важните резултати и изводи. Той е оформен съгласно изискванията и е редактиран с основните и необходими за него раздели.

Заклучение:

Дисертацията на доц. Пламен Тодоров се отличава с редица достойнства в теоретичен и клинично-приложен план. Дисертацията е написана интересно, на разбираем език. Задачите са поставени точно и резултатите потвърждават изпълнението им. Методите , които са приложени са модерни и точни .Направени са много сериозни експерименти, предварително планирани, с използвани актуални методи, с логични, добре описани и интерпретирани резултати. Едно от най -големите достойнства на дисертацията е нейната практическа стойност . Тя може да служи с проведените експерименти за пример и помагало за бъдещи проучвания.

Въз основа на общата ми оценка за дисертационния труд , приносите по дисертацията и тяхната значимост за обогатяване на съществуващите

знания и практиката , предлагам убедено на научното жури да присъди научната степен „Доктор на науките“ на доц. Пламен Тодоров Тодоров в Професионално направление 4.3.Биологически науки,научна специалност „ Клетъчна биология/шифър 01.06.18/.

20 януари 2018 г.

Проф. Атанас Щерев