

РЕЦЕНЗИЯ

относно:

дисертационния труд на Главен асистент **Ивайло Методиев Вангелов**, докторант на самостоятелна подготовка, Секция „Имунобиология на размножаването“, Институт по Биология и Имунология на Размножаването „Академик Кирил Братанов“ – БАН, гр. София, за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ в област на висшето образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки и научна специалност „Имунология“ с шифър 01.06.23

Тема на дисертационния труд: „Анти-овариални антитела и инфертилитет“
Научен ръководител – доц. Мария Димитрова Иванова, дб

Рецензент: проф. д-р Димитрина Кирилова Димитрова-Диканарова, дм, Ръководител на Катедрата по Биология при Медицинския Факултет на МУ – София, включена в състава на Научното жури във връзка със защитата на дисертационния труд въз основа на Заповед №64 от 25.01.2017 г. на Директора на ИБИР „Акад. Кирил Братанов“ – БАН

Рецензията е изготвена според изискванията на Закона за развитието на академичния състав на Република България, Правилника за приложението му и Правилника за изискванията, условията и правилата за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИБИР „Акад. К. Братанов“ - БАН

Актуалност и значимост на дисертационния труд

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е посветен на въпроси, свързани с **безплодието в човешките популации, които имат медико-биологично, демографско и социално изражение. Той е актуален, задълбочен, с безспорен фундаментален и приносен характер, и е резултат от голямо по обем, прецизно, и компетентно изпълнено проучване в областта на имунобиологията на размножаването.**

От безплодие страдат 10-15 % от партньорските двойки. Сред европейското население основните причини за инфертилитет са: неизяснено безплодие (с неизяснена етиология при мъжа или жената, 25%), нарушения в овулацията (20%), увреждания на

маточните тръби (15%), мъжки фактор за безплодието (30%) и заболявания на матката и перитонеума (10%). Гаметите са честа „мишена“ за автоимунен отговор, тъй като половите жлези, където гаметите се диференцират и експресират тъканно специфичните си антигени, са органи в имунологична изолация в хода на онтогенезата. От друга страна, **овариалният автоимунитет, чиито прояви са прецизно анализирани и изследвани от Докторанта, има етиопатогенетична роля: при развитието на преждевременната овариална недостатъчност; при синдрома на поликистозните яйчници (PCOS); при идиопатичното безплодие и ендометриозата. Идентифицирането и характеризирането на таргетни антигени, имащи важно биологично значение при анти-овариалния имунен отговор, би допринесло за разработването на високо специфични и чувствителни методи за диагностика на овариални нарушения с автоимунна етиопатогенеза. Значимостта на дисертационния труд се определя и от разработените и валидирани от Докторанта тестове за доказване на автоантителата срещу антигени на гранулоза-лутеинизирани клетки (GLCs) на преовулаторни фоликули, които са част от семейството на анти-овариалните антитела (AOAs) и могат да бъдат индикатор за имунологично обусловено безплодие при човека.**

В този смисъл, дисертационният труд е посветен на един много съществен и актуален, комплексен проблем на имунобиологията на размножаването, като е и предпоставка за откриването на нови диагностични и прогностични подходи при социално значимите демографски проблеми, свързани с безплодието при човека и с някои заболявания, имащи автоимунна генеза.

Обсъжданият дисертационният труд е написан на 115 страници с оптимално съотношение на съставните му части и включва следните основни раздели, които са съобразени с изискванията на Правилника за Приложение на Закона за развитие на Академичния състав в Република България: Увод, Литературен обзор; Цел и задачи; Материали и методи; Резултати; Обсъждане; Изводи; Приноси; Заключение; Библиография, а също така и Списък на научните статии и участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд.

Библиографската справка се основава на литературни източници с пряко отношение към дискутирания проблем. Цитираните трудове (250 публикации) са на латиница, като включват и публикации на водещи Български автори, свързани с утвърждаването на Репродуктивната имунология. Голяма част от цитираните

статии са публикувани през последните години. **Илюстративният материал включва 16 фигури, 18 таблици и приложение в табличен вид относно характеристиките на използваните разтвори и буфери.**

Литературният обзор е задълбочен, изчерпателен и аналитичен. В него е направена цялостна характеристика на: фоликулогенезата; овоцитното зреене при протичането на мейозата; механизмите на вродения и придобития имунитет; антигенното представяне; имунофенотипната характеристика на клетките на вродения и придобития имунитет. Представени са съвременни схващания за овулацията като остро стерилно възпаление, протичащо под контрола на вродения имунитет. Анализирани са проблемите на: овариалния автоимунитет, прицелните клетъчни структури и прицелни молекули в патогенезата му; преждевременната овариална недостатъчност; синдрома на поликистозните яйчници (PCOS), засягащ от 10 % до 21 % от жените в репродуктивна възраст и заемащ водещо място сред овулаторните нарушения, причиняващи безплодие. Направен е и преглед на литературните данни относно характеристиката, честотата на доказване на анти-овариалните антитела (AOAs) в инфертилни пациентки, както и относно тяхното значение при асистираните репродуктивни техники (ART), като се счита, че в случаите на неуспешно IVF-ET са включени и автоимунни механизми. Литературният обзор показва отличната общобиологична и специализирана подготовка на гл. асистент Ивайло Вангелов.

На фона на този задълбочен литературен обзор е изведена и целта на дисертационния труд.

Целта на дисертационния труд е свързана с: изследване на концентрацията и клиничното значение на антитела срещу антигени на преовулаторни гранулоза-лутеинизирани клетки (анти-GLCs антитела) и връзката им с апоптозата на тези клетки, като и секрецията на проинфламаторни цитокини при инфертилни жени, включени в програма за ART (IVF-ET).

Разработването на дисертационния труд включва 6, произтичащи от целта задачи, които са коректно и много аргументирано редактирани. Те са свързани със създаването и валидирането на индиректни имуноензимни тестове за доказване на анти-GLCs антитела и анти-ZP антитела; скриниране на серуми и фоликулни течности от инфертилни пациентки, включени в програма за ART, за наличие на клинично значими концентрации на анти-овариалните антитела (AOAs); идентифициране на прицелните за анти-GLCs антитела антигени; проследяване на

концентрациите на някои провъзпалителни цитокини (TNF – α ; IFN - γ) във фоликулни течности на жени с овариална етиология на безплодието и проследяване на апоптотичния индекс на гранулоза-лутеинизирани клетки при тези пациентки. Изпълнението на тези задачи води до логическата последователност на докладваните в дисертационния труд резултати.

Материалите и използваните методи са подбрани много удачно. Те са достатъчни по обем за достоверен качествен и количествен анализ. Проучването включва 2 основни групи: групата на инфертилните пациентки ($n = 296$) и контролната група от клинично здрави жени с доказан фертилен статус ($n = 98$). Инфертилните пациентки са характеризирани според три основни критерия и подразделени в различни групи според конкретната цел на съответното изследване.

Методичният подход е комплексен и адекватен на поставената цел. Той се основава на няколко главни, информативни и взаимно допълващи се съвременни групи от методи с множество подметоди: биохимични; цитологични; имунологични; имуноензимни с множество разновидности и др. методи. Анализите са направени чрез богата гама от високо информативни статистически методи (методи на описателната статистика; методи за проверка на хипотези; корелационен анализ и др.). При анализа на резултатите си Докторантът дефинира три нива ($P \leq 0,05$; $P \leq 0,01$; $P \leq 0,001$) на статистическа достоверност и значимост на работната хипотеза. Получените резултати са представени таблично, и документирани чрез бокс-плотови графики, което улеснява тяхната интерпретация.

Описанието на собствените резултати е представено логично. То показва отличната методична подготовка на Докторанта и неговата добросъвестност, и съзнателност в работата. Изложението следва логично структурата на литературния обзор и основните задачи. Резултатите са представени в 5 главни раздела с подраздели, някои от които са:

1. Получени са оригинални данни относно честотата на доказване и концентрацията на серумните анти-GLCs антитела при инфертилните пациентки, включени в програма за IVF-ET, чиито средноаритметични стойности са статистически значимо по-високи от тези в контролната група. При паралелното изследване на серум и фоликулна течност от една и съща инфертилна пациентка се доказва по-висока концентрация на анти-GLCs антитела във фоликулната течност в сравнение с тази в серума.

2. **Получени са данни относно клиничното значение на анти-GLCs антителата при инфертилни пациентки, разделени в три групи според етиологията на безплодието. Докторантът установява, че средните стойности на концентрацията на антителата в групите с тубарен и комбиниран инфертилитет са статистически значимо по-ниски от тези на групата с овариален инфертилитет.**
3. **Валидиран е индиректен ELISA тест за откриване на серумни анти-GLCs антитела, при който се използва тотален екстракт от човешки GLCs антигени.**
4. **Получени са резултати, доказващи, че наличието на серумни анти-GLCs антитела повлиява отрицателно *in vitro* оплождането на овоцитите.**
5. **Валидиран е индиректен ELISA тест за откриване на серумни анти-ZP антитела при изследване на групите от инфертилни пациентки с добър отговор на контролирана овариална стимулация и на контролната фертилна група.**
6. **Установено е, че повишените серумни концентрации на анти-овариалните антитела (анти-GLCs антитела и анти-ZP антитела) корелират с ниския процент на *in vitro* оплодени овоцити при жени с добър отговор на контролирана овариална стимулация.**
7. **Определена е изотипната специфичност на серумните анти-овариалните антитела, като е установено, че в групата на инфертилните пациентки високи средни концентрации имат антителата от IgM и IgG клас.**
8. **Установена е висока степен на междувидова кръстосана реактивност и консервативност на антигени на човешки, свински и говежди гранулоза-лутеинизирани клетки.**
9. **Чрез имуоблот са идентифицирани 4 антигена, които са прицелни за анти-GLCs антителата в серуми на инфертилни пациентки, включени в ART програма. В серума на инфертилни жени най-често се доказват антитела срещу антиген с относителна молекулна маса 47 000 Da.**
10. **Валидиран е индиректен ELISA тест за установяване на фоликулни анти-GLCs антитела. Установено е, че съществува положителна връзка между концентрацията на фоликулните анти-GLCs антитела и етиологичните причини за безплодието само в групата на пациентите с овариален стерилитет.**

11. Установено е, че изследваните проинфламаторни цитокини и анти-GLCs антителата са в по-високи концентрации във фоликулните течности на пациентки с овариален стерилитет и лош отговор на контролирана овариална стимулация. Доказаната положителна корелация между концентрацията на изследваните проинфламаторни цитокини и анти-GLCs антителата Докторантът обяснява с успоредното активиране на хуморалния и клетъчния имунен отговор. Негативната корелация между нивото на апоптозата на GLCs и концентрацията на анти-GLCs антителата се свързва със значението на апоптозата в генезата на автоимунния отговор срещу GLCs.

Анализът и обсъждането на резултатите показва уменията на Дисертанта да съпоставя литературните данни, да коментира умело получените резултати и да прави мотивирани обобщения, основаващи се на фактологията. Илюстративният материал е с високо качество и достатъчен по обем за изпълнение на поставените задачи. **Формулираните 7 извода коректно отразяват получените резултати и са с оригинална и научно-приложна стойност. Те са относно:** установената висока честота на доказване на анти-GLCs антителата в серума и във фоликулните течности при инфертилни пациентки от ART програми; идентифицирането на гранулозно клетъчни белтъци, които са прицелни за анти-GLCs антителата, разпознаващи консервативни антигенни епитопи; клиничното значение на анти-GLCs антителата при безплодни пациентки и установяване на понижена успеваемост при ART; наличието на анти-GLCs антителата в клинично значими концентрации при пациентки с овариален стерилитет; положителната корелация между концентрацията на фоликулните анти-GLCs антитела и на проинфламаторните цитокини и повишената апоптоза на GLCs при жени с овариален стерилитет; корелацията между повишената концентрация на анти-GLCs антителата, проинфламаторните цитокини, повишената апоптоза на анти-GLCs антителата и неуспешните COS/IVF при жени с овариален стерилитет; значението на повишените концентрации на AOA's и характера на отговора при стимулация с гонадотропини и успеваемостта при ART.

Главните формулирани приноси на дисертационния труд са 7 и точно съответстват на получените резултати, като имат оригинален характер за репродуктивната имунология и биология и са основа за бъдещи медико-биологични изследвания.

Главен асистент Ивайло Вангелов има публикационна активност, която отговаря на изискванията на Правилника за развитие на академичния състав и на нормативните документи на ИБИР, БАН. Представен е списък и копия на 3 научни публикации, свързани с дисертационния труд, като Докторантът е първи автор на всички публикации, и всички те са с импакт фактор. Докторантът има 5 участия в научни форуми, свързани с темата на дисертационния труд.

Авторефератът отговаря на изискванията на Закона за развитието на академичния състав на Република България и правилника за приложението му.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Представеният за рецензиране дисертационен труд е актуално по замисъл изследване, и е резултат от голяма по обем, прецизно и добросъвестно изпълнена експериментална работа, свързана с проблемите на безплодието в човешките популации. Резултатите са компетентно дискутирани и имат оригинален приносен характер в областта на репродуктивната имунобиология. Качеството и обемът на дисертационния труд, както и публикационната и научно-изследователската активност на Гл. асистент Ивайло Вангелов напълно отговарят на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и на Правилника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИБИР, БАН, с оглед присъждане на образователната и научна степен „Доктор”. Качествата на дисертационния труд, а именно: задълбоченият и изчерпателен преглед на литературните данни, актуалността и значимостта на анализиранияте проблеми, прилагането на съвременни експериментални методи, валидирането на високо специфични и чувствителни диагностични тестове, оригиналността и практическото значение на приносите за репродуктивната имунология и биология, ми дават **основание да оценя положително дисертационния труд. Убедено заявявам пред Уважаемите членове на Научното жури, че Главен асистент Ивайло Методиев Вангелов напълно отговаря на изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ по научната специалност „Имунология”.**

14.03.2017 г., гр. София

Рецензент: 
Проф. д-р Д. Димитрова-Диканарова, дм