

## СТАНОВИЩЕ

от проф. д.с.н. Дияна Лилова Светлева на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ в Област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика**; Професионално направление: **4.3. Биологически науки**; Докторска програма: „Молекулярна биология“

**Автор:** *Мария Николова Николова-Милова*

**Тема:** „Оценка на ендометриалната възприемчивост чрез профилиране на генетични и хормонални маркери“

**Научни ръководители:** проф. д-р Галина Тенева Яхубян – Катедра „Молекулярна биология“;  
гл. ас. д-р Младен Маринов Найденов – Катедра „Анатомия и физиология на човека“  
Пловдивски университет “Паисий Хилендарски”, Биологически факултет,

### 1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Със заповед № РД-21-712 от 01.04.2024 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определена за член на научно жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационния труд на *Мария Николова Николова-Милова* – докторант в редовна форма на обучение към катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ (преименувана в катедра „Молекулярна биология“). Зачислена е за редовен докторант с Протокол № 232/30.01.2018 г. от заседанието на Факултетния съвет на Биологическия факултет. Отчислена е с право на защита със заповед на Ректора № РД-33-877 от 09.03.2021 г.

Представеният от докторант Мария Николова-Милова комплект материали на хартиен и електронен носител е в пълно съответствие с Чл. 36 (ал. 1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ. Всички справки са подписани и носят достоверна информация.

Покрила е националните наукометрични изисквания за защита на дисертационния си труд.

Мария Николова-Милова е родена на 11.06.1971 г. в гр. Пловдив. Средното си образование завършва през 1990 г. в Английската езикова гимназия, гр. Пловдив със златен медал за пълно отличие, а висшето - в Медицинския университет, гр. Пловдив през периода 1990 – 1996 г. и се дипломира с ОКС „лекар“.

През 2005 г. придобива специалност „Акушерство, гинекология и репродуктивна медицина“.

Докторант Николова-Милова има богат трудов стаж (приблизително 28 години) като лекар в различни отделения по акушерство и гинекология в гр. Пловдив, а през периода 2014 – 2018 г. работи в Специализираната акушеро-гинекологична болница “Д-р Щерев” в гр. София. Днес това лечебното заведение е развито в многопрофилен медицински комплекс за женско и семейно здраве. За повишаване на квалификацията си докторантката е провела 10 следдипломни квалификации, някои от които са следните – „Нови репродуктивни технологии“, „Гинекологична ендокринология“, “Лапароскопия“, „Хистероскопия“, „Пренатална диагностика“ и други.

Взела е участие в 6 научни форума и в един научен проект към Фонда за „Научни изследвания“.

Членува в научната организация European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) със седалище в Белгия.

Владее отлично английски и на много добро ниво руски език.

### 2. Актуалност на тематиката.

Актуалността на дисертационния труд се обуславя основно от следните факти:

❖ Ендометриумът е тъкан, която покрива вътрешността на матката, където ембрионът се имплантира и развива по време на бременността. Всеки месец ендометриумът се подготвя да приеме ембрион. Когато това не се случи, започва менструация;

- ❖ През последното десетилетие се работи активно за изясняване на транскрипционните механизми залегнали в основата на „имплантационния прозорец“ в човешкия ендометриален цикъл и се предлагат редица биохимични и молекулни маркери за възприемчивост на матката;
- ❖ Тези изследвания са довели до по-задълбочено познаване на молекулните процеси, залегнали в основата на фазовите транзиции в маточната лигавица, както и до създаване на генетични тестове за оценка на рецептивността на ендометриума като ERA теста (Endometrial Receptivity Array), ER Map тест и други;
- ❖ Нарушената възприемчивост на ендометриума е част от причините за безплодието при жените. По тази причина е много важно да се проучи по-добре неговата възприемчивост. До момента в литературата са включени много проучвания за идентифициране на генетични маркери за възприемчив ендометриум, но няма достатъчен брой/или липсват съобщения за изследване на ролята на микроРНКите в този процес;
- ❖ Наред с протеин-кодиращите транскрипти, микроРНКите са важен компонент на транскриптома. До момента при хората са открити над 2000 микроРНКи и се смята, че те колективно регулират една трета от гените в генома;
- ❖ Въпреки, че координираната генна експресия в рецептивния ендометриум е от съществено значение за успешното имплантиране, промените в експресионните профили на микроРНКите и техните изоформи (изомиРНК), съпровождащи фазовите преходи на маточната лигавица, все още не са проучени в детайли;
- ❖ Няма и съобщени изследвания върху експресията на микроРНКите и техните изоформи в рамките на един и същ ендометриален цикъл през основните му фази – пролиферативна, ранно-секреторна, средно-секреторна и късно-секреторна.

Докторант Мария Николова-Милова много последователно и категорично обосновава необходимостта и значимостта от комплексно проучване на разгледаните в раздел „Литературен преглед“ проблеми и на тази база оформя целта на дисертационната си разработка. Поставени са 6 конкретни задачи и 7 подзадачи за нейното постигане.

### **3. Познаване на проблема.**

Използвана е класическа структура за оформяне на дисертационния труд.

Най-големи по обем са следните раздели:

- ✓ Разделът „Литературен преглед“ е написан на 45 страници. Включва 3 основни раздела и 16 подраздела, в които много компетентно са представени и обсъдени направените и описани до момента в литературата проучвания в областта на дисертационната разработка;
- ✓ Получените резултати и тяхното интерпретиране са разработени на 39 страници;
- ✓ Включените в дисертационната разработка литературни източници са описани на 20 страници в раздел „Библиография“.

Списъкът на цитираната литература включва 333 източници, всички са публикувани на латиница. Особено важно е да се отбележи, че редица от цитираните източници (68 броя – 20,42%) са публикувани през последните 6 години, което подчертава актуалността на проучвания от докторант Мария Николова-Милова проблем.

В цитираната литература 10 броя източници (3,00%) са публикувани през периода 1908-1950 г. Това доказва, че много задълбочено са потърсени всички публикации, които могат да тангентират до провежданите изследвания от докторанта в предишни периоди.

Прави впечатление, че няма цитирани публикации от български автори, което показва, че за България този проблем е сравнително нов и в бъдеще докторантът ще може да продължи своите изследвания в тази област.

Общото ми становище е, че докторантът показва много добра информираност по проучваната тематика и компетентност при анализиране на разглежданите проблеми.

### **4. Методика на изследването.**

Докторантът е описал в дисертацията си много пълно и с подробности цялата методика на изследване.

Проведени са клинични и молекулярно-биологични проучвания за постигане на поставената цел на изследване.

*Клиничните изследвания* включват:

- Гинекологичната оценка;
- Протоколът на изследването е одобрен с Удостоверение за одобрение № 3/02.09.2019 г. на Комисията по етика на научните изследвания на Биологическия факултет в Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“. За всяка жена е оформена Карта с история на изследването;
- Амбулаторно и без анестезия е направена ендометриална биопсия на всяка отделна жена;
- На биопсичния материал е направена хистологична оценка;
- За определяне на нивата на репродуктивните хормони в различните фази на ендометриалния цикъл е направен биохимичен анализ. Приложен е имунохимичен анализ с електрохеми-луминисценция.

*Молекулярно-биологичните изследвания* включват:

- Изолиране на РНК;
- Секвенирането на РНК е извършено в National Genomics Infrastructure, SciLifeLab, Швеция и в лабораторията на проф. Андрес Салумец в Университета на Тарту, Естония.

Приложените *математико-статистически методи* за анализ на получените резултати се базират на различни съвременни програмни продукти, разработени специално за подобен род изследвания, които ползват основно инструменти на платформата за биоинформатичен анализ Galaxy.

Приложените молекулярни и математико-статистически методи за анализ са нови и надеждни.

## **5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите**

Представеният дисертационен труд е продукт на богата научно-изследователска работа.

Структурата на дисертационната разработка следва общоприетото подреждане на разделите в такъв вид научни трудове: Въведение, Литературен обзор, Цел и задачи, Материал и методи, Резултати, Дискусия, Изводи, Най-често използвани съкращения, Приложения и Библиография.

В раздела „Литературен обзор“ се съдържат 13 фигури, 3 схеми и 1 таблица с много добро качество, които са представени от други автори. Докторантът съвсем отговорно е отразил авторите и източниците от които са взимани фигурите, схемите и таблицата.

В раздел „Резултати“ са включени 8 таблици и 11 фигури, от които 4 са снимков материал с добро качество и 2 схеми, които са резултати от собствените изследвания на докторанта.

В приложението са отразени пълни данни за профилите на миРНК-и в три точки – (hCG + 2); (hCG + 7) и (hCG + 9), съпоставени с пролиферативна фаза.

Разделът „Резултати“ обхваща 6 основни раздела и 4 подраздела, в които са включени проведените изследвания и получените резултати.

Считам за особено важно, че проучванията на ендометриума са извършени в четирите фази – пролиферативна, ранна, средна и късна секреторни фази, които са съобразени с описанията от Noyes (1950).

Представени са получените резултати от изследванията на нивата на репродуктивните хормони - лутеинизиращ хормон (LH), серумен естрадиол (E2) и прогестерон (P).

Иновативни и много ценни са проучванията и получените резултати от диференциално-експресираните гени, микроРНК и изоформи в хода на ендометриалния цикъл. Подобни изследвания в България не са провеждани. Това е голям успех за една дисертационна разработка, свързана със защитата и получаването на ОНС „доктор“.

Проведената дискусия (на 9 страници в дисертацията) осветлява съвсем ясно цялостната логика на проведените изследвания и връзката между тях. Получените резултати са подкрепени правилно с резултатите и изследванията от други изследователи.

В раздел “Изводи” са представени по убедителен начин и с категорична доказаност 11 извода и едно заключение, които приемам безусловно. Те са илюстрация на оригиналните, научните и научно-приложни приноси на дисертацията.

Считам, че получените резултати и направените заключения от докторант Мария Николова-Милова в дисертационната си разработка могат успешно да се използват и от други автори при провеждане на изследвания в тази област.

## **6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта**

Във връзка с темата на дисертационния труд докторантът е представил списък от 3 научни труда.

В списъка са включени две статии публикувани на английски език в списанията *Life* и *Biology* (квартил Q2) с общ импакт фактор 7,4 и една статия, публикувана на български език в списание „Репродуктивно здраве“ без импакт фактор.

В първата статия докторант Мария Николова-Милова е първи автор, във втората е на втора позиция (но според регламента на списанието в тази статия първият и вторият автор са с равно участие), а в третата публикация – е на трета позиция.

Описаните в статиите изследвания са изпълнени на високо ниво. Използвана е подходяща и съвременна методика. Получените резултати са анализирани правилно и тяхното обсъждане е подкрепено с мнения на други изследователи, публикували статии с близки до темата проучвания.

Доказателство за това са откритите 12 цитата от чуждестранни автори. Разпределението на цитиранията по години е – 2 броя през 2022 г. 8 броя през 2023 г. и 2 броя през 2024 г. Това показва, че в последствие броят на цитатите ще нарасне. Всички списания, в които са цитирани статиите на докторанта, са с квартал Q1. Общият импакт фактор на статиите, в които са цитирани публикациите на докторант Мария Николова-Милова е 67,295.

Най-много (10 пъти) е цитирана статията: *Nikolova M., Naydenov M., Glogovitis I., Apostolov A., Saare M., Bogavarapu N., Salumets A., Baev V., Yahubyan G. - Coupling miR/isomiR and mRNA Expression Signatures Unveils New Molecular Layers of Endometrial Receptivity. Life. 2021;11:1391. doi: 10.3390/life11121391.*

Публикацията - *Naydenov M, Nikolova M, Apostolov A, Glogovitis I, Salumets A, Baev V, Yahubyan G. - The dynamics of miR-449a/c expression during uterine cycles are associated with endometrial development. Biology (Basel) 2022;12:55, е цитирана 2 пъти.*

Представената декларация за оригиналност доказва, че включените в дисертационното изследване анализи, получените резултати и направените обобщения са с личното участие на докторанта Мария Николова-Милова.

## **7. Автореферат.**

Авторефератът е добре оформен в обем от 31 страници. Той е структуриран добре и отразява в резюмиран вариант структурата и съдържанието на дисертацията. Онагледен е с 1 таблица, 3 фигури и една схема.

Авторефератът е ясно написан и добре отразява получените резултати на дисертационния труд. Представен е според всички изисквания на закона за такава публикация.

## **8. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати.**

Представеният от докторант Мария Николова-Милова дисертационен труд е всеобхватен и с важно значение за медицината. Приложени са иновативни за България методи за изследване и са получени важни резултати. Част от посочените приноси могат да послужат като основа за продължаване на изследванията в тази област, както на докторанта, така и на някои нейни колеги.

Отчитайки оригиналния и иновативен характер на част от приносите в дисертационния труд, бих препоръчала, на докторанта да продължи и разшири изследванията си в посока създаване на клинично-приложим тест за ендометриална рецептивност, базиран на експресионни нива на микроРНК и техните изоформи. Това ще допринесе за реално комбиниране на молекулярните техники с техниките на традиционната медицина и ще спомогне за по-точното определяне и характеризирание на ендометриалната възприемчивост и фазите през които преминава.

Към докторанта имам някои въпроси и бележки.

Въпроси:

☉ Абсолютно съм убедена в иновативността на проведените изследвания. По тази причина искам да попитам докторанта - В бъдеще ще продължите ли изследванията си по тематиката на дисертационния труд?

☉ Мислите ли, че част от Вашите изследвания още на този етап могат да бъдат приложени за характеризирани на някои случаи при нарушена ендометриална рецептивност?

Бележки:

- Изводите под номер 3 и 8 звучат повече като приноси.
- Изводите под номер 10 и 11 са много обширни. Можеха да се разделят на няколко отделни с по-добро конкретизиране;
- Таблиците 3 и 4 са леко размазани и не са с много добро качество;
- На фиг. 17 гелът с пробата от пролиферативната фаза hCG+7 на пациент 4 не е с много добро качество. Има смир и не личи дали има само едн или повече бандове. Приемам, че отчитането е правено директно върху геловете, с цел получаване на по-точни резултати;
- В текста има някои технически пропуски и грешки;
- В библиографската справка някои от цитираните литературни източници (например под номера 4, 8, 10, 25) не са изписани според изискванията, а в други – под номер 28, 35, 38 не са посочени годините на публикуване.

Зададените въпроси и направените бележки са направени с цел в бъдеще докторантът да помисли за още възможности за подобряване на изследванията си.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд *съдържа научни, 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 и съответния Правилник на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд показва, че докторант Мария Николова-Милова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност „Молекулярна биология“ като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. Представила е 3 научни публикации във връзка с разработената дисертация като две от тях са публикувани в престижни списания (квартил Q2) с общ импакт фактор 7,4.

Представила е списък с 12 цитирания от чуждестранни автори на нейните публикации. Това е много добър атестат за нивото на проведените проучвания, адекватността на приложените методи за изследване и нивото на получените резултати, които са част от дисертационната разработка.

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 Мария Николова Николова-Милова* в област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика;** Професионално направление: **4.3. Биологически науки;** Докторска програма: „Молекулярна биология“.

30.04.2024 г.  
Гр. Пловдив

**ИЗГОТВИЛ СТАНОВИЩЕТО:**.....  
(проф. д.н. Д.Светлева)