

## РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Ангел Данчев Йорданов – Медицински Университет гр. Плевен

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ по: 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 и гл. ас. д-р Младен Маринов Найденов– ПУ „П. Хилендарски“

### 1.Общо описание на представените материали

Със заповед № РД-21-712 от 01.04.2024 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ съм определен за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Оценка на ендометриалната възприемчивост чрез профилиране на генетични и хормонални маркери“ за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4 Природни науки, професионално направление 4.3. Биология, математика и информатика, докторска програма Молекулярна биология. Автор на дисертационния труд е Мария Николова Николова-Милова – докторантка в редовна форма на обучение към катедра :“ Молекулярна биология“ с научни ръководители проф. д-р Галина Тенева Яхубян и гл. ас. д-р Младен Маринов Найденов– ПУ „П. Хилендарски“. Представеният от Мария Николова Николова-Милова комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ, включва следните документи:

- молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд; • автобиография в европейски формат;
- протокол от катедрения съвет, свързан с докладване на готовността за откриване на процедурата и с предварително обсъждане на дисертационния труд; становище от научните ръководители
- дисертационен труд;
- автореферат;
- списък на научните публикации по темата на дисертацията;
- копия на научните публикации;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
- справка за спазване на специфичните изисквания на съответния факултет;
- платежно нареждане за внесена такса
- докторантката е приложила общо три научни публикации, като две от тях с импакт

фактор в списания от кватил 2.

## **2. Кратки биографични данни за докторанта**

Мария Николова Николова-Милова е родена в гр. Пловдив. Средното си образование завършва в Английска Езикова Гимназия в гр. Пловдив със златен медал за пълно отличие. През 1996г завършва медицина в МУ гр Пловдив, а през 2005г придобива специалност по акушерство и гинекология и репродуктивна медицина. Има 27 години трудов стаж като лекар, акушер-гинеколог. Има придобити множество следдипломни квалификации след обучение у нас и в чужбина, сред които по: асистирани репродуктивни технологии, ендоскопска хирургия, гинекологична ендокринология, офис хистероскопия, високрисково раждане, детска гинекология . От 2018г. Мария Николова Николова-Милова е докторант към катедра „Молекулярна биология“ , като преминава обучение по докторска програма „Молекулярна биология“ под научното ръководство на проф. д-р Галина Тенева Яхубян и гл. ас. д-р Младен Маринов Найденов– ПУ „П. Хилендарски“

## **3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи**

Стотоци хиляди двойки у нас и милиони в световен аспект срещат проблеми с постигането на бременност. Много са причините, които пречат за успешното зачеване на дете, но три основни фактора стоят в основата на постигане на бременност, а именно: качествен ембрион, възприемчив ендометриум и синхронно взаимодействие между тях. При асистираните репродуктивни технологии, където само най-качествените ембриони се трансферират, остават неразрешими казусите с повтарящи се имплантационни неудачи. Ендометриумът(вътрешната мукозна покривка на матката) има определяща роля за това дали един продукт на зачатие ще се имплантира или ще се отхвърли и ще отмре. Ендометриумът е възприемчив само в определен период от менструалния цикъл – в дните на т. нар. имплантационен прозорец. В научната литература са описани множество биохимични, хуморални и хормонални фактори, които влияят на ендометриалната възприемчивост. В медицинската практика има утвърдени практически клинични тестове за оценка на ендометриална възприемчивост, като напр ERA-тест, Be Ready и др. Те отчитат експресията на определени гени в дните на имплантационния прозорец. Но малко и недостатъчно е известно за промените в експресията на тези гени в периодите на

транзиция между различните фази на ендометриалния цикъл както и за механизмите на регулацията на тяхната експресия. В тази насока е научното търсене в представения за рецензия дисертационен труд. Тематиката на дисертационния труд е актуална и създава възможност за получаване на резултати, на които да се базират по-разширени проучвания с възможност за създаване на клинично-приложим тест за оценка на ендометриалната възприемчивост.

#### **4. Познаване на проблема**

В главата „Литературен обзор“ докторантката разглежда три основни аспекта на разработваната тематика: 1) Ендометриум, ендометриален цикъл и ендометриална рецептивност; 2) МикроРНК и изоформи 3) Ендометриум и микроРНК. В разработката се е позовала на 333 литературни източника като е поднесла достъпно основните понятия, физиологични механизми и взаимодействия, в контекста на изследвания проблем. Резултатите се основават на методологично-актуални изследвания, които съответстват на световните съвременни методи, ползвани при проучвания по темата. В дискусиата е направен обобщен анализ на получените резултати, в съответствие с известните от научната литература до момента данни, което дава представа за познаване на същността на проблема, свободната му интерпретация и професионален прочит, в съответствие с използваните литературни източници. Смятам, че Мария Николова Николов-Милова има задълбочени познания по проучвания проблем, като е анализирала и се е позовала на световни актуални литературни източници по тематиката на изследвания проблем и е приложила нужните умения и знания при разработване на проблема.

#### **5. Методика на изследването**

В дисертационния труд, са използвани множество молекулярно-биологични методи, като получените данни са подложени на последващ биоинформатичен анализ. Към молекулярно-биологичните методи се отнасят: изолиране на РНК, качествен и количествен анализ на получената РНК, секвениране на РНК, секвениране на миРНК, RT-qPCR. Посредством тях е натрупан огромен обем данни. Резултатите, получени в хода на разработката са достъпни, като частта от тях, свързани с изследвания проблем, които са подложени на биоинформатичен анализ, са представени във вид на таблици, схеми и фигури. Цялостната научна разработка е подсигурана с надежно подготвен от

дисертантката материал за изследване, който поради известните си особености е изключително труден за събиране (няколкократни биопсии от една и съща жена, съобразени с определени дни, при паралелно осъществяване на допълнителни, уточняващи подходящия ден изследвания, пробовземане без анестезия, причиняващо физическо неразположение и макар и минимален социален дискомфорт).

Биоинформатичен и статистически набор от методи намирам за адекватно подбрани, което позволява правилна интерпретация на резултатите. Работният модел отговаря на зададените цел и задачи. В хода на разработката на дисертационния труд, докторантката е успяла да усвои множество методи, които биха и позволили успешно да се реализира като учен.

## **6. Характеристика и оценка на дисертационния труд**

Дисертационният труд е с общ обем от 133 страници, които включват 9 таблици и 5 схеми и е илюстриран с 24 фигури. Текстът е организиран и структуриран по стандартен начин, като започва с кратко въведение в обем от две страници, литературен обзор, представен в 57 стандартни страници, цел и задачи – две страници, следват материали и методи-11 страници, резултати-23 страници, обсъждане - 9 страници, изводи-2 страници, най-често използвани съкращения – 3 страници, приложение – 4 страници, декларация за автентичност – 1 страница и библиография -20 страници. В началото, след кратко но обстойно въведение, следва литературния обзор, в който се въвеждат понятията: ендометриум, ендометриален цикъл и ендометриална рецептивност -описват се и се анализират: морфологични, функционални, биохимични и възрастови особености и характеристики. Обсъжда се влиянието на древни сигнални пътища в промяна на ендометриалната епителна квота в контекста на ендометриалната възприемчивост. Изложението продължава с информация за миРНК и изоформи - обща характеристика, биогенеза, пътища за образуване и класификация на изоформите на миРНК. В детайли е описана известната до момента от литературата роля на миРНК и изоформи в контекста на репродукцията – връзка на микроРНК с нормална и патологична бременност, с майчиния имунитет, роля в процеса на децидуализация, миРНК секретирани от ембриото – като част от „разговора ембрио-ендометриум“, както и в установяване на ендометриалната рецептивност. Обобщени са данните от литературните източници за

отчитане/предвиждане на ендометриалната рецептивност, както и потенциалните възможности за приложение на миРНКи за подобряване на ендометриалната възприемчивост. Базирайки се на литературния анализ докторантката формулира целта на дисертационния труд: „Да се проучи ролята на микроРНК молекулите и техните изоформи в установяването на ендометриалната рецептивност при здрави, фертилни жени чрез сравнителен анализ на динамиката на експресионните им профили в хода на цикъла и интегрирането им с транскриптомни данни, хистологични и биохимични показатели.“

Целта е формулирана ясно и конкретно и показва основната насока на изследването. Поставени са шест задачи. Задачите са конкретни, реално обхватими, отговарят на техническите възможности на обучаващото звено. Главата „Материали и методи“ е разделена на две части – клинична и молекулярно-биологична. Създадени са схеми, които подробно и детайлно унаглеждат последователността от проведените процедури и изследвания. В детайли са описани: определяне на фазите на ендометриалния цикъл и подбор и набиране на пациентите, сонографската фоликулометрия и замерване на ендометриална дебелина, хормонални и хистологични изследвания. За по-точно таймиране на овулацията е прилаган hCG препарат, при зададени предварително условия. Четири проби, събирани от всяка пациентка в четири времеви точки, са класифицирани в четири групи: пролиферативна(ПФ), пре-рецептивна (или ранна секреторна)(РСФ- hCG+2), и две точки в рецептивна (или средна секреторна), съответно (ССФ1- hCG+7) и (ССФ2- hCG+9).. В молекулярно-биологичната част са описани следните използвани методики: изолиране на РНК, качествена и количествена оценка, секвениране на малкиРНК, секвениране на РНК и приложен биоинформатичен и статистически анализ на данните от секвенирането. Описани са подробно процедурите по валидирането на резултатите от анализа на диференциално експресираните микроРНК и изоформи. Прогнозирани са взаимодействията на микроРНК и изоформите им с прицелни транскрипти и транскрипционни фактори. Извършен е анализ на обогатяване на генната онтология(GO) като в допълнение са включени и пътища от Енциклопедията на гените и геномите на Киото (KEGG).

В раздел резултати са описани отчетените находките от сонографските, хистологичните и имунохимичните анализи, които потвърждават известните до сега зависимости.

Описани са в детайли протоколите по изолирането на тотална РНК както и осъществената качествена и количествена оценка на елюираната РНК. Изолираната РНК е използвана за секвениране, като резултатите са подложени на последващ анализ. Чрез биоинформатичен анализ са идентифицирани микроРНК и изоформи, експресирани в анализирани ендометриални проби като също така е направен сравнителен експресионен анализ на микроРНК и изоформите в РСФ, ССФ1 и ССФ2 спрямо ПФ. Установени са 15 микроРНК и 71 изоформи, които се експресират в ендометриална тъкан, и показват динамика в експресията си през изследваните фази на ендометриалния цикъл, като броят на диференциално експресирани микроРНК и изоформи се увеличава значително при прехода от пре-рецептивна към рецептивна фаза - наблюдава се повишаване на експресионните нива сред членовете на няколко семейства микроРНК, които детайлно са описани в дисертационния труд. На база на анализа на данните от секвенирането на малки РНК, вниманието на дисертантката е привлечено от фамилията на miR-449c, която е статистически значимо експресирана в рецептивния ендометриум . Направено сравнение в експресионната динамика в хода на ендометриалния цикъл, между жена в репродуктивна възраст и перименопаузална жена, загатва за вероятното участие на семейството на miR-449c в стареенето на ендометриума и свързаното с това потискане на ендометриалната рецептивност.

С помощта на анализ на данните от секвениране на РНК са идентифицирани протеин-кодиращи транскрипти, експресирани в анализирани ендометриални проби и е проведен сравнителен експресионен анализ на транскриптите в РСФ, ССФ1 и ССФ2 спрямо ПФ, като за първи път е установена генната експресионна динамика в четири времеви точки на hCG-стартан ендометриум. Най-значими промени в генната експресия са установени във времева точка hCG+9 на имплантационния прозорец, като 614 гена имат повишена експресия и 269 имат понижена експресия спрямо пролиферативната фаза.

Направен е интегриран анализ (регулаторни мрежи) на диференциално-експресирани транскрипти, микроРНК и изоформи в хода на ендометриалния цикъл с цел прогнозиране на прицелни гени за диференциално-експресирани микроРНК и изоформи както и за прогнозиране на транскрипционни фактори за диференциално-експресирани микроРНК и изоформи.

Генно-онтологичният анализ (GO) на диференциално експресирани гени установява най-голям брой обогатени термини при втората времева точка на имплантационния прозорец. Данните от KEGG също са в подкрепа на това.

Анализът за прогнозиране на прицелни гени (генните мишени) на микроРНК и изоформи установява множество ДЕ двойки „микроРНК и изоформи/генна мишена“ в рецептивния ендометриум, от които 280 отрицателно свързани двойки и 281 положително свързани двойки. 18 ДЕ транскрипта са генни мишени на повече от една ДЕ микроРНК или изоформа. Докладвани са най-променените мишени в рецептивния ендометриум в сравнение с пререцептивния. От тях MYCN се отличава с най-висок прогнозиран целеви резултат, който корелира с изоформи на miR-449c.

Валидиране на микроРНК и изоформи е осъществено с помощта на RT-qPCR. Резултатите потвърждават получените от секвенирането данни.

**Резултатите** от разработката са представени обстойно и в детайли. Предоставената информация е достатъчна като обем и е приложен подходящ биоинформатичен и статистически анализ.

**Дискусията** се основава на получените резултати, анализирани в контекста на известни вече научни данни от проучените литературни източници като са изказано и лично становище и са оформени хипотези. Формулирани са единадесет извода и четири научни приноса, които отразяват основните постижения на работата. Изводите са внимателно формулирани и отговарят по обем и съдържание на заложените цел и задачи на дисертационната разработка. Дисертационният труд бих окачествил като задълбочена, прецизна и добре структурирана работа. Проследявайки текста на така представения дисертационен труд не съм установил данни за плагиатство.

## **7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката**

Резултатите от научната разработка са обобщени в четири типа научни приноси: научно-теоретични, методични, научно-приложни и приноси с потвърдителен характер, които подробно са описани в автореферата към дисертационния труд.

## **8. Преценка на публикациите по дисертационния труд**

По настоящата процедура, докторантката е представила три научни публикации, пряко

свързани с резултатите от дисертационния труд. Две от тях са с импакт фактор 4.2 и 3,2 в списания от квартал 2, а третата е в списание Репродуктивно здраве. В две от публикациите с импакт фактор, докторантката е първи автор, а в третата е - втори. Към момента на изготвяне на рецензията в публичните бази данни са установени дванадесет цитирания на научни статии на докторантката, отразяващи резултатите от дисертационния труд. Докторантката е посочила участия в шест научни конференции, свързани с разпространение на данните от рецензираната разработка.

### **9. Лично участие на докторантката**

Предвид това, че докторантката е участвала в написването на три научни публикации, свързани с дисертационния труд и в шест научни форума, както и цялостното изготвяне на дисертационния труд считам, че личното участие на докторантката напълно съответства на изискванията по Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“.

### **10. Автореферат**

По настоящата процедура е представен автореферат на български език. Авторефератът отразяват напълно основните научни постижения на докторантката с обем 32 машинописни страници. Авторефератът в изготвен съгласно общоприетия модел и отразява пълно и точно получените резултати.

### **11. Критични забележки и препоръки**

Имам техническа забележка по една от фигурите (фигура 23)– разделителната способност е недобра. Нямам забележки по същество. Не забелязах несъответствия или неточности.

### **12. Лични впечатления**

Познавам докторантката бегло. Смятам, че положените от Мария Николова Николова-Милова усилия в овладяването на нови, различни умения и познания допълват професионалната и квалификация на лекар, специалист акушер-гинеколог и създават възможност да разшири диагностико-терапевтичния си подход по отношение на оценка на проблемите при установяване на бременност и проследяването и поддържането на



такава.

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

Смятам, че на база на приносите и резултатите от този дисертационен труд могат да бъдат проведени по-разширени изследванията за изучаването на механизмите, определящи ендометриалната възприемчивост, които да послужат за разботването на клинично-приложим тест.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд показва, че докторантката Мария Николова Николова-Милова притежава необходимите теоретични знания и професионални умения по научна специалност Молекулярна 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 Мария Николова Николова-Милова в област на висше образование: област на висше образование: 4 Природни науки, математика и информатика; професионално направление: 4.3 Биологически науки; докторска програма „Молекулярна биология“

08.05 2024 г.

Рецензент:

(доц. дмн Ангел Йорданов)