

## РЕЦЕНЗИЯ

от доцент **Милена Сергеева Мурджева-Андонова**, Секция Молекулярна имунология, Институт по биология и имунология на размножаването, Българска академия на науките

Относно: Дисертационен труд за защита и придобиване на образователната и научна степен „Доктор”, по научна специалност: „Медицинска биология“, Шифър 4.3

Тема на дисертационния труд: **ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ММР-2, ММР-9 И ТЕХНИТЕ ИНХИБИТОРИ, КАТО БИОМАРКЕРИ ЗА КАЧЕСТВОТО НА ЯЙЦЕКЛЕТКИТЕ И ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННИТЕ ЕМБРИОНИ**

Автор на дисертационния труд: **Нина Пекова Айвазова**, задочен докторант, МУ-Плевен, Факултет „Медицина“, Катедра „Анатомия, хистология, цитология, биология“, Сектор „Биология“

Научен ръководител: Доц. Милена Атанасова

Неблагоприятните демографски прогнози за България в близко бъдеще се основават главно на социални и икономически причини, но безспорно големият брой двойки с репродуктивни проблеми са част от общата картина. Според Световната здравна организация делът на безплодните двойки в популацията е между 10 и 30%. В България няма точна статистика, според някои проучвания има приблизително 200 000 двойки страдащи от безплодие, а според други данни тази цифра е значително по-висока. Развитието на АРТ технологиите допринася за решаване на проблеми при двойките с репродуктивни неуспехи, но продължават да се търсят подходи за оптимизиране на инвитро процедурите, повишаване на успеваемостта им и постигане на успешна бременност.

Качеството на яйцеклетките е ключов лимитиращ фактор за фертилитета и има решаваща роля не само за оплождането, но и за последващото развитие на ембрионите. Изборът на ембриони за трансфер също е ключов момент за успеха на АРТ. За да се повиши успехът на технологиите и да се постигнат повече успешни бременности се търсят маркери и методи за неинвазивна и бърза оценка на качеството на яйцеклетките и ембрионите чрез анализ на фоликуларната течност и на културалната среда на ембриона.

Актуалната тема на дисертационната разработка е обвързана с ясна цел: да бъде оценена връзката между активността и концентрацията на матриксните металопротеинази ММР-

2 и MMP-9 и техните инхибитори TIMP-1 и TIMP-2 от една страна и зрелостта и морфологията на яйцеклетките, както и качеството на получените ембриони от друга страна. Авторите се опитват да отговорят на въпроса дали нивата на експресия на MMP във фоликуларната течност и среди от култивирани ембриони, са надеждни маркери за прогнозиране на качеството на яйцеклетките и селекция на ембриони за извършване на ембриотрансфер.

Структурата на дисертационния труд е традиционна – темата и необходимостта от проведените изследвания са аргументирани във въведение, след което в литературния обзор подробно са разгледани различни аспекти на асистирана репродукция; факторите, определящи качеството на яйцеклетките; фазите на менструалния цикъл, фоликулогенеза и овогенеза; признаците за оценяване качеството на яйцеклетките са разгледани много прецизно и детайлно, т.к. те са в основата на статистическия анализ при търсенето на връзка между нивата и формите на MMP-2 и MMP-9 и съответните признаци; аналогично – разгледани са и признаците за оценка на ембрионите. От друга страна изборът на MMP като обект за изследване е аргументиран от ролята им във фоликулогенезата и овулацията, описана в литературата от последните години. Отделено е внимание на класификацията и регулацията на активността на MMP и инхибиторите им, но най-вече на ролята им в различни репродуктивни процеси. Задачите са дефинирани конкретно:

- Разработване на система за оценка морфологията и качеството на яйцеклетки и ембриони получени в резултат на АРТ след проведена КОХС;
- Установяване ензимната активност на MMP-2 и MMP-9 във фоликуларни течности;
- Определяне концентрацията на MMP-2, MMP-9, TIMP-1 и TIMP-2 във фоликуларни течности;
- Определяне концентрацията на MMP-2 и MMP-9 в среди от култивирани ембриони;
- Статистически анализ на получените резултати.

В изследванията са използвани 149 фоликуларни течности и 54 среди от култивирани до пети ден ембриони от 33 пациентки, подложени на КОХС и последващо ин витро оплождане по метода ICSI, за периода 2017-2019 г. Събирането на материалите и провеждането на изследванията по настоящия дисертационен труд са проведени в

лабораториите на Медицински център „Клиничен институт за репродуктивна медицина“ - Плевен и сектор Биология към Катедра „Анатомия, хистология, цитология, биология“ на Медицински университет - Плевен.

При подбора на пациентите са приложени адекватни изключващи критерии, които да гарантират, че ефектът не се дължи на мъжки фактор и че са включени на нормални яйцеклетки. Основно достойнство на тази работа е събирането и анализа на аспиратите от фоликулите поотделно и така статистически са проследени избраните критерии за всяка яйцеклетка по отделно, като това е подчертано още в раздел Материали и методи. Същото се отнася и до средите в които са култивирани ембрионите – те също са били събирани и анализирани поотделно, за да бъдат сравнени по отношение съдбата на съответния ембрион.

Първи етап в изследванията представлява много внимателно анализиране и класифициране на качеството на яйцеклетките по (1) състоянието на овоцит кумулусния комплекс; (2) степен на зрелост на самите яйцеклетки; (3) морфологията на яйцеклетките е била оценявана по време на ICSI процедурата; (4) в деня след процедурата е оценявано наличието на пронуклеоси и състоянието на второто полярно телце. Изградена е многокомпонентна система от критерии, които позволяват прецизна статистическа оценка на връзките между получените данни за количеството на MMP-2 и MMP-9 и състоянието на яйцеклетката по всеки от избраните критерии. Подобни критерии са били приложени и по отношение качеството на ембрионите – били са оценени дялящи се ембриони съобразно критериите от Истанбулския консенсус от 2011 г.; ембрионите на стадий бластоцист са били оценени на база на система предложена от Gardner & Schoolcraft; На стр. 49-50 са систематизирани накратко критериите за оценка, което е много информативно.

Активността на металопротеинази MMP-2 и MMP-9 е била определена чрез желатинова зимография; а концентрациите на MMP-2, MMP-9, TIMP-1 и TIMP-2 във фоликулни течности и културелни среди са били определени посредством ELISA китове.

Получените данни са били обработени чрез параметрични и непараметрични статистически тестове.

Резултатите са представени чрез 18 таблици и 23 графики.

Ивиците, получените след желатинова зимография на 74 фоликулни течности, са представени в таблица 2, където са съотнесени молекулните тегла на ивиците с различните форми – активни, про-форми, димери и мултимери на MMP-2 и MMP-9. Установена е следната зависимост – при пациенти с висок процент зрели яйцеклетки от общия пул (85% M2), както и задоволителен процент оплождане (59%), е забелязана изразено по-висока активност на аст-MMP-2 в сравнение с MMP-9, докато – обратно – при пациенти със 100% зрели яйцеклетки, но нисък процент на оплождане (20%) е наблюдавана силно изразена активност на про-MMP-9 в сравнение с аст-MMP-2.

Чрез статистически методи е оценена връзката между степента на експресия на различните форми MMP и (1) степента на експадирание на СОС; (2) степен на зрялост на яйцеклетките; (3) размера на зона пелуцида; (4) размера на перивиталинното пространство; (5) състоянието на цитоплазмата на яйцеклетката; (6) цитоплазмени включения; (7) дефекти на полярното телце; (8) активация на яйцеклетките; (9) развитие на предимплантационни ембриони; (10) изхода от бременността.

В следващия етап на изследването, получените от ELISA изследванията данни за концентрацията на двете желатинази и техните инхибитори, както и съответните съотношения са разпределени в групи по същите признаци, като при резултатите от зимографиите.

По отношение на среди от култивирани ембриони на пети ден след оплождане, за 54 ембриона е била определена концентрацията на тотална MMP-2, MMP-9 и TIMP-1. Получените резултати са били съпоставени статистически в групи в зависимост от (1) качеството на ембрионите, (2) изхода от култивирането, а именно дали съответния ембрион е бил трансфериран в матката, унищожен или замразен, (3) според резултата от теста за бременност.

Получените в дисертационния труд данни дават основание на авторите да предположат, че най-вероятно MMP-2 играе роля по време на фоликуларния растеж и развитие, докато MMP-9 участва предимно в руптурирането на фоликулната стена по време на овулация.

В дискусията са коментирани собствените резултати, погледнати в светлината на известното от литературата, като критично са открити резултатите и изводите, които съвпадат с литературните данни и тези, които са в противоречие. Докторантката умело интерпретира и анализира, получените от изпълнението на задачите резултати и

литературните източници. Имам само една техническа забележка към този раздел - тук са коментирани особености на метода зимография, които по смисъл, според мен, трябва да се отнесат в раздел материали и методи или при обсъждането на резултатите.

Обособени са 9 извода, коментирани и в Обобщение, и 7 приноса. Тук искам да открия следното:

От една страна авторите наблюдават тенденция за повишена активност на act-MMP-2 във фоликулни течности при ембриони с адекватно развитие. Но от друга страна концентрацията на фоликуларната act-MMP-2 е значително повишена в случаите, когато не се установява имплантация и в случаите на спонтанни аборти. Как бихте коментирали?

Също така – според извод 7 - секретията на MMP-9 от морфологично добри ембриони е значително повишена; но според извод 9 не установявате връзка между концентрацията на MMP-9 в културелни среди и имплантацията и изхода от бременността. Защо според вас?

Можете ли на база получените от вас данни да направите препоръка за използване на някой от методи в практиката? Как би се отразило това на времето за изпълнение на процедурите?

Нина Айвазова е завършила магистратура по Клинична химия и молекулярна диагностика, към катедра Биохимия на Биологическия факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“. От 2007г. е ембриолог в МЦ „Клиничен институт за репродуктивна медицина“ Плевен, с основни експертизи етикетиране и обработване на гемети и зиготи и ин витро оплождане (IVF/ ICSI). От 2016 е редовен докторант в МУ Плевен. Специализирала е в САЩ (2006) и Испания (2018 и 2019). Работата по дисертационния труд е финансирана от два научно-изследователски проекта на Медицински университет – Плевен:

D3/2017 „Функционален анализ на MMP-2 и MMP-9 и техните тъканни инхибитори в гранулозни клетки от перивулторни фоликули при жени подложени на ин витро оплождане и определяне на активността на ензимите в кондиционирани среди вследствие култивиране на човешки предимплантационни ембриони”

D2/2018: „Експресионни нива и активности на MMP-2 и MMP-9 и техните тъканни инхибитори в гранулозни клетки от човешки перивулаторни фоликули и в кондиционирани среди от човешки предимплантационни ембриони”.

По темата на дисертацията са публикувани две статии в списанието на МУ-Плевен:

Ayvazova N, Ilieva L, Konova E, Atanasova M. Levels of MMP2, Timp1 and Timp2 in follicular fluids in women undergoing in vitro fertilization and their relationship to oocyte quality.: JBCR. 2019

N. Ayvazova, V. Rilcheva, E. Konova, R. Roussev, P. Rashev. Matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 activities in seminal plasma. JBCR, vol. 9 (2), 2016, 21-29

Декларирана е подготовка на статия за реферирано списание с ИФ. Резултати, свързани с дисертационната разработка, са били докладвани на 7 национални конгреса.

Темата на дисертационната разработка е актуална, т.к. въпреки множеството проучвания все още морфологията на яйцеклетките е основен метод за оценка на тяхното качество. Известни са някои биохимични методи за оценка на качеството на човешките гамети и ембриони чрез анализ или на фоликуларната течност или на метаболитната активност на ембриона, но те са сложни и времеемки и това силно ограничава тяхната приложимост в IVF лабораториите. Търсенето на нови маркери, които бързо и категорично да покажат качеството на яйцеклетките и най-вече на ембрионите е предпоставка за подобряване на АРТ и повишаване на процента на успешните бременности. Разрешаването на репродуктивни неуспехи би имали значение не само за двойките, но и за подобряване на демографската картина.

Дисертационната разработка оставя впечатление, че в хода на подготовката му, комбинирането на практични и изследователски подходи развиват у дисертантката умения за изпълнение на научни проекти. Особено ценното обединение на наука и практика е решаващо за успешно реализиране на иновативни изследвания, които да развият, обогатят и надградят прилаганите в момента АРТ технологии.

В заключение - дисертацията отговаря на изискванията на Закона за развитие на Академичния състав в РБ и вътрешните правилници на МУ-Плевен. Убедено гласувам ЗА присъждане на образователната и научна степен ДОКТОР на Нина Пекова Айвазова.

29.04.2021, София

Милена Мурджева