

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Албена Владимирова Александрова, доктор,
катедра „Физиология и биохимия“, НСА „Васил Левски“,
член на Научно жури, съгласно решение на Академичния съвет на Медицински университет - Плевен (Протокол №35 от 01.03.2021 г.) и заповед №543/02.03.2021 г. на Ректора на Медицински университет - Плевен относно дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“

Тема: Оксидативен стрес в диагностиката на мъжкия инфертилитет
Автор: Данаил Ивайлов Мартинов
Професионално направление: 4.3 Биологични науки
Докторска програма: Медицинска биология
Научен ръководител: доц. Милена Атанасова, д.и.

1. Общо представяне на докторанта

Данаил Ивайлов Мартинов завършва бакалавърска степен “Молекулярна биология“ през 2013 г., а през 2015 г. - магистратура „Клетъчна биология и патология“ в БФ на СУ “Св. Климент Охридски“. От 2012 до 2013 г. работи като технически сътрудник, а от 2013 г. като биолог в МЦ „Клиничен институт за репродуктивна медицина“. През 2015 г., със заповед №2749/10.12.2015 г. е зачислен като редовен докторант в катедра “Анатомия, хистология, цитология и биология”, при факултет “Медицина” към Медицински университет - Плевен по докторска програма „Медицинска биология” в професионално направление 4.3 Биологични науки.

2. Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд на Данаил Мартинов е разработен в обем от 167 стандартни страници и следва общоприетия за този вид научни трудове модел, съдържайки: въведение (2 стр.), литературен обзор (41 стр.), цел и задачи (2 стр.), материали и методи (29 стр.), резултати и дискусия (68 стр.), обобщени изводи (2 стр.), заключение (2 стр.), приноси, списък на използваните литературни източници, списък на авторските публикации по темата на дисертационния труд, списък със забелязаните цитирани, участия в научни форуми за представяне на получените резултати и списък на научни проекти, в които е участвал дисертанта. Работата е онагледена с 47 таблици и 33 фигури. Списъкът на цитираната литература обхваща 162 източника на латиница, повечето от които са от последните 10 години. Подредбата на материала е балансирана и дава превес на собствените резултати и интерпретации.

3. Актуалност на тематиката

Представеният ми дисертационен труд на Данаил Ивайлов Мартинов е насочен към оценка на спермалния оксидативен статус на мъже с идиопатичен и неизяснен инфертилитет и проучване на влиянието на фактори, като центрофугиране и замразяване/размразяване на семенния материал, които се асоциират с индуциране на оксидативен стрес, върху спермалните показатели и качеството на спермалния хроматин при тези пациенти. Целта на работата е изясняване на нуждата от въвеждането в андрологичната практика на изследването на оксидативния стрес, като допълнителен метод в диагностиката на инфертилитета, в подбора на съпътстващи терапии и лечение, а също така и в оценката на качеството на сперматозоидите използвани при асистираната репродукция.

В последните години проблемът с безплодието е все по-актуален, като според

доклада на Департамент по репродуктивно здраве и изследвания към Световната здравна организация между 3-7% от всички двойки в световен мащаб имат трайни репродуктивни проблеми. Според предвижданията, честотата на безплодие ще нараства прогресивно в следващото десетилетие и съотношението между инфертилни и фертилни двойки ще се промени от 1:7 до 1:3.

Много от двойките с репродуктивни проблеми прибегват до асистираните репродуктивни техники (АРТ). За съжаление успеваемостта при АРТ е сравнително ниска - около 30%. Една от причините както за безплодието, така и за ниската успеваемост при *in vitro* оплождането, е оксидативният стрес (ОС) – състояние, при което генерирането на реактивни форми на кислорода (РФК) надхвърля капацитета на антиоксидантната система в организма да елиминира тяхната продукция и вредно действие. Оксидативният стрес може да се дължи както на екзогенни фактори, произтичащи от начина на живот като тютюнопушене, злоупотреба с алкохол, нерационално хранене, психологичен стрес, така и на ендогенни фактори, индуцирани от редица заболявания. При асистираната репродукция, обработването на еякулатите, като центрофугиране, замразяване-размразяване, осветяване, парциалното налягане на кислорода, и др. е свързано със свръхгенериране на РФК и възможност за развитие на ОС.

Намирам, че в контекста на гореизложеното, предложената разработка е актуална и получените резултати биха могли да послужат за изготвянето на стратегии и алгоритми в диагностиката, терапията и методите на обработка на сперматозоидите за целите на асистираната репродукция при мъже с идиопатичен и неизяснен инфертилитет.

4. Познание на проблема

Направеният литературен обзор, показва, че докторантът е добре запознат с научните публикации и изследванията по проблема и показва умение за обобщаване на наличната информация и търсене на неизяснени и проблемни въпроси, които представляват интерес за решаване с практическа насоченост.

Литературният обзор запознава с честотата на инфертилитета в световен мащаб, причините за възникване на мъжкия инфертилитет и ефективността на асистираните репродуктивни техники. Подробно е представена информация за ендогенните и екзогенни източници на реактивни форми на кислорода и тяхната роля в патогенезата на мъжкия инфертилитет. В обзора е разгледана антиоксидантната ензимна и неензимна защита на организма, предотвратяваща окислителното увреждане на биологичните структури. Дисертантът уместно засяга и въпроса за индуциране на оксидативен стрес при обработка и криоконсервация на гамети. Очертани са възможностите за прилагане на екзогенни антиоксиданти с цел предотвратяване или намаляване на уврежданията в структурата и функциите на генетичния материал, което би довело до намаляване на генетичните изменения и подобряване на оплодителните качества на спермата. Данаил Мартинов подробно представя стандартното диагностициране на мъжкия инфертилитет и необходимост от въвеждане на маркери за оксидативен стрес в диагностиката, тъй като техните стойности определят целостта и функцията, и съответно степента на увреждане на сперматозоидите. По този начин, литературният обзор към дисертационния труд, въвежда логично към изследователската цел, която докторантът си е поставил.

5. Цел и задачи

Целта на настоящата работа е да се изследва нивото на спермалния оксидативен стрес при мъже с идиопатичен и неизяснен инфертилитет и влиянието на фактори като центрофугиране, замразяване и размразяване на семенен материал, които се асоциират

с повишен оксидативен стрес върху спермалните показатели и качеството на спермалния хроматин при тези пациенти. На базата на поставената цел са формулирани адекватно и ясно 8 задачи за изпълнение. Тези задачи дават възможност за получаване на съпоставими с наличните в литературата данни, адекватно анализиране на резултатите от извършените измервания и извеждане на конкретни изводи, основа за формулиране на научно обосновани насоки за оптимизиране на асистираните репродуктивни техники на базата на комплексна оценка на параметрите, засягащи оплодителната способност на сперматозоидите.

6. Методически подход

В представения ми дисертационен труд, наред със стандартното физикално изследване на семенната течност и конвенционален семенен анализ са оценени интегритета на ДНК на сперматозоидите и тоталния антиоксидантен капацитет на семенната плазма без криоконсервация, както и интегритета на ДНК и нива на липидна пероксидация, концентрацията на глутатиона и активността на каталаза и глутатион пероксидазата в сперматозоиди и семенна плазма след криоконсервация; измерени са интрацелуларните нива на водороден пероксид (H_2O_2) и супероксииден анион радикали ($O_2^{\cdot-}$). Използвани са подходящи, съвременни методи за изследване на гореизброените показатели. Подходите и методите са избрани целенасочено според поставените задачи. От подробното описание на всяка стъпка от обработването и анализа на пробите, е видно, че добре е усвоен приложеният широк набор от съвременни биохимични и статистически методи.

7. Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите

Резултати

Получените данни са резултат от изследване на семенни проби от мъже с неизяснен и идиопатичен инфертилитет, установени чрез снемане на репродуктивна анамнеза и извършване на конвенционален семенен анализ. В сперматозоидите е определен DFI чрез SDI-тест и са измерени тоталния антиоксидантен капацитет (TAC), нивата на липидна пероксидация, концентрацията на глутатиона и активността на глутатион пероксидаза и каталаза. Чрез сравняване на гореизброените показатели при инфертилните мъже са търсени връзки между спермалните параметри, интегритета на ДНК и маркерите за оксидативен стрес. Измерени и анализирани са вътреклетъчните нива на водороден пероксид и супероксиден анион в свежи сперматозоиди, обработени чрез swim up при фертилни мъже и мъже с идиопатичен инфертилитет, както и влиянието на обработката на сперматозоиди (центрофугиране, замразяване/размразяване) върху DFI в проби от фертилни мъже и мъже с неизяснен и идиопатичен инфертилитет. Използвани са различни статистически подходи за анализ на данните. Приложен е тестът на Shapiro-Wilk за нормалност на разпределението на резултатите, разликите при нормално разпределените данни са сравнявани с t-критерия на Стюдънт, а за отклоняващите се от нормалното разпределение показатели са приложени тестовете на Mann-Whitney и Kruskal-Wallis, направен е корелационен анализ на изследваните параметри по Pearson за нормално разпределените данни и по Spearman за неравномерно разпределените данни, тест на Levene за хомогенност на дисперсията. Това дава възможност за обективна оценка на достоверността на разликите в качеството на сперматозоидите от фертилни и инфертилни мъже по отношение на изследваните показатели и влиянието на манипулациите при обработка на еякулатите върху изследваните показатели. Графиките са добре оформени с правилни означения по абцисната и ординатната ос, съответстващи легенди на

цветовите представяния и означени достоверни разлики. Таблиците са подробни, с изчислени корелационни коефициенти и значимости между параметрите, с цветови представяния на достоверните разлики. Всички цифрови стойности в текста, таблиците и графиките са придружени с правилните мерни единици. Няма разминаване между номерацията, заглавията и графично или таблично представените резултати.

Дискусия

Дискусията е разделена на части, следвайки отделните задачи на дисертационния труд. В тази част на дисертацията Данаил Мартинов се представя като изследовател, който умее да сравнява собствените резултати с литературните данни и да прави логически разсъждения. Докторантът показва добър усет към подбора на изследвания, сравними с неговите и способност за анализ и обобщение. Използваните литературни източници са цитирани коректно в текста с добро отграничаване от собственото изложение. Тази част на дисертацията завършва с гл. „Обобщени изводи“, в които на базата на собствените резултати, статистическите данни и логическите разсъждения, подкрепени с литературните данни, докторантът стига до съществени и значими заключения.

Изводи и приноси

Получените резултати са обобщени в 11 извода. Формулирани са 8 приноса, включващи 3 с оригинален характер и 5 с потвърдителен характер. Изводите с потвърдителен характер сочат добрата работа на докторанта и определят достоверността на изводите с оригинален характер. Приемам формулировките на приносите и смятам, че те правилно интерпретират получените резултати.

8. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Съгласно Правилника за развитие на академичния състав в МУ-Плевен докторантът трябва да има най-малко 3 публикации, една от които отпечатана в международно списание и поне в една от публикациите докторантът да бъде самостоятелен или първи автор. Резултатите от разработката на дисертационния труд са публикувани в 2 статии в научни списания, а третата, в която Данаил Мартинов е първи автор е под печат. Всички публикации по дисертацията са в международни периодични научни издания, като едното е с IF=2.141. Показателен за добрата научна работа е фактът, че вече има забелязани 14 цитирания на публикациите на докторанта. Резултатите са представени също на 5 международни и 5 национални научни конференции. На 7 от научните съобщения в тези форуми докторантът е първи автор. Данаил Мартинов е участник в 4 научни проекти с тематика, свързана с оксидативния стрес и диагностиката на мъжкия инфертилитет.

9. Автореферат

Представеният автореферат отговаря на изискванията. Той отразява съдържанието на дисертацията като включва основните моменти на проучването с представени информативни таблици и фигури от дисертацията, формулираните изводи и приноси на труда, приложен е списък с публикациите по темата на дисертационния труд, списък със забелязаните цитирания на статиите, списък на участията на Данаил Мартинов в научни конференции в България и чужбина във връзка с представяне на получените резултати и списък с проектите, финансирани изследванията.

10. Критични забележки и препоръки

Критичните забележки са свързани главно с пропуски от технически характер (като неточни цитирания, правописни грешки и др.) и в никакъв случай не

омаловажават работата, получените резултати и направените изводи. Като препоръка бих предложила да продължи по-нататъшно изучаване и разширяване на тази проблематика, като получените резултати да бъдат разпространени както чрез публикуване в реферирани списания с импакт фактор или импакт ранг, така и чрез други медии, за да станат достояние на заинтересованите лица. Би било добре направените препоръки на базата на получените резултати в дисертационния труд да бъдат прилагани в практиката.

11. Въпроси към докторанта

Към докторанта имам следните въпроси:

1) Възможно ли е само чрез измерване на активността на антиоксидантните ензими да се направи заключение за оксидативния статус на сперматозоидите и да се предвиди оплодителната им способност?

2) Кой/кои от изследваните показатели са с най-висока информативна стойност за състоянието на еякулата и оплодителната му способност?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертацията е актуална, написана е ясно и стегнато. Извършена е значителна експериментална работа със съвременни методи и получените данни са адекватно статистически обработени и анализирани. Резултатите са интересни и могат да бъдат основа за бъдещи разработки. В хода на разработване на дисертационния труд Данаил Мартинов е разширил теоретичната си компетентност в конкретната научна област, придобил е експериментаторски компетенции и умения, както и способността да обсъжда получените авторски резултати като ги съпоставя с литературни източници. С представените публикации и участия в научни форуми той отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности на Медицински университет - Плевен. Това ми дава основание да препоръчвам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен "Доктор" на Данаил Ивайлов Мартинов в професионално направление 4.3. Биологични науки, докторска програма „Медицинска биология“.

Гласувам с **положителен вот**.

03.05.2021 г.

Рецензент:


/проф. д-р Албена Александрова/