

РЕЦЕНЗИЯ

Научен секретар

МУ - Плевен

Вх. № HC-100/14-05-2021г.

от проф. Радостина Ивайлова Александрова, доктор, секция „Патология”, Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей – БАН) - член на Научно жури съгласно заповед № 543/02.03.2021 г. на Ректора на Медицински университет – Плевен

Относно дисертационен труд на тема: „Оксидативен стрес в диагностиката на мъжкия инфертилитет”

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. “Биологически науки” („Медицинска биология “)

на докторанта Данаил Ивайлов Мартинов, Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология”, Медицински университет - Плевен

с научен ръководител: доц. Милена Атанасова, доктор, Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология”, Медицински университет - Плевен

1. Актуалност и значимост на дисертационния труд

Безплодието е глобален здравен и социален проблем, засягащ милиони хора в репродуктивна възраст. По данни на Световната здравна организация (СЗО) то обхваща повече от 186 милиона индивида. Разпознато е като едно от водещите обществени предизвикателства на нашето време. Според изчисленията на СЗО 9% от двойките по света се борят с проблемите на плодовитостта, за Европа този дял варира между 8% и 15%. Мъжкият фактор допринася за 50% от случаите. Макар редица фактори (генетични и свързани с начина на живот) да са замесени в мъжкото безплодие, около 30% от случаите все още се смятат за идиопатични. Според редица проучвания мъжкото безплодие може да е ранен признак на влошено общо здраве.

Установено е, че увреждането на ДНК, до голяма степен поради оксидативен стрес, е водеща причина за дефектна функция на сперматозоидите.

Немалка част от причините, които го предизвикват, са свързани с начина на живот и повечето от тях подлежат на модификация.

Очакванията на специалистите са изследването на оксидативния стрес като допълнителен метод за оценка на инфертилитета при мъжете да подобри значително диагностичните възможности в андрологичната практика, както и да спомогне за идентифицирането на пациентите, които биха имали полза от прилагане на антиоксидантна терапия.

Темата на дисертационния труд е в съответствие с целите на Националната програма за Развитие на научните изследвания в Република България 2017-2013, както и с приоритетите на Европейската програма „Хоризонт 2020”, тъй като ще допринесе за подобряването на здравето и повишаването на качеството на живота, както и за решаването на важни социални и демографски проблеми.

2. Преглед на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 167 страници и включва: Заглавна страница (2 стр.), Съдържание (3 стр.), Благодарности (1 стр.), Списък на използваните съкращения (2 стр.), Въведение (2 стр.), Литературен обзор (31 стр.), Цели и задачи (2 стр.), Материали и методи (28 стр.), Резултати и дискусия (72 стр.), Изводи (2 стр.), Заключение (2 стр.), Приноси (2 стр.), Списък на публикации във връзка с дисертационния труд (2 стр.), Списък на участията в научни форуми в областта на дисертационния труд (2 стр.), Използвана литература (14 стр.). Илюстриран е с 47 таблици и 33 цветни или черно-бели фигури с високо качество.

Още във **Въведението** докторантът Данаил Мартинов ни запознава със същността на безплодието като здравен и социален проблем и привличайки вниманието ни към инфертилитета при мъжете, обобщава факторите, които са го насочили към темата на дисертационния труд.

В **Литературния обзор** са представени съвременни данни за разпространението на инфертилитета в световен мащаб, както и у нас, описани са видовете инфертилитет при мъжете и (известните) обуславящите ги причини. Специално внимание е отделено на ролята на оксидативния стрес в патогенезата на мъжкия инфертилитет – последователно са разгледани реактивните форми на кислорода (РФК),

антиоксидантната система, съставена от ензими с антиоксидантна активност (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза) и неензимни антиоксиданти (витамини и микроелементи). В систематизиран вид е обобщено значението на РФК за нормалното протичане на капацитацията, хиперактивацията, акрозомната реакция и оплождането. Разгледани са увреждащите ефекти, причинени от свръхгенерирането на РФК, причините за възникването на липидната пероксидация и фрагментацията на ДНК и последиците за нормалната физиология и функция на сперматозоидите и други нежелани ефекти върху протичането на бременността и мутационния товар в бъдещото поколение. Отделено е място на апоптозата, представени са ендогенни и екзогенни фактори, водещи до повишено образуване на РФК. Част от Обзора е посветена на асистираната репродукция и РФК, разгледана е ролята на обработката и криоконсервирането на гаметите. Обърнато е внимание на влиянието на антиоксидантите – както в терапията на мъже с инфертилитет, така и при обработката и съхраняването на сперматозоидите. Обзорът завършва с преглед на стандартния подход при диагностициране на мъжкия инфертилитет и обосновава необходимостта от въвеждането на маркери за оксидативен стрес в този процес. Тази част на дисертационния труд е онагледена с 9 фигури и 2 таблици.

Литературният обзор показва отличната осведоменост на докторанта в областта на дисертационната тема, умението му да борави с литературни източници, да обобщава и анализира. Написан е на висок научен стил, но в същото време е достъпен, разбираем и интересен за широк кръг читатели, което още веднъж потвърждава, че авторът „си разбира от работата” и умее да я популяризира. Тези 30 страници са резултат на многогодишен труд и сериозна не само теоретична подготовка, но и богат практически опит, в тях прозират професионален интерес и любознателност, отдадеността към избраната професия.

Цели и задачи. Целта (1 брой) и задачите (8 на броя) са ясно и точно формулирани, което показва, че изследването е предварително добре обмислено.

За изпълнението им са подбрани подходящи **материали и методи.** Изследването обхваща общо 130 мъже доброволци, картотекирани в МЦ „КИРМ” в периода декември 2016 г. - декември 2019 г. 49 от тях са фертилни мъже с данни за нормоспермия на средна възраст 33.70 ± 6.19 години. Групата на инфертилните мъже включва 81 участника на средна възраст 35.90 ± 5.6 години, които на свой ред са разделени на две подгрупи: с неизяснен инфертилитет с данни за нормоспермия (29 на брой, средна възраст 36.18 ± 5.33 години) и такива с идиопатичен инфертилитет с

данни за тератозооспермия (52 на брой, на средна възраст 35.56 ± 5.70 години) Прецизно са представени използваните изследователски техники, посочен е принципът на съответния метод, подробно е описано изпълнението на процедурата, добавени са приложените при изпълнението му химикали, консумативи и апаратура. Изяснени са различията между нормалните и атипичните сперматозоиди, разгледани са критериите за включване, съответно за изключване на проби от проучването, описано е как са изчислени и представени резултатите, в някои случаи (флоуцитометрично определяне на вътреклетъчните нива на H_2O_2 и O_2) е илюстрирана опитната постановка, включени са примерни хистограми – всичко това помага за осмислянето на експерименталния дизайн на осъщественото проучване и получените резултати. Разделът е илюстриран с 8 фигури и 6 таблица.

Резултатите следват хода на поставените цели и задачи. Те са подробно представени и отлично онагледени чрез 45 таблици и 16 фигури с високо качество, които улесняват възприемането им.

В хода на изпълнението на планираните задачи са изследвани екстрацелуларни и интрацелуларни маркери на оксидативния стрес както и влиянието на различни фактори, прилагани в техниките за асистирана репродукция (центрофугиране, замразяване и размразяване на сперматозоиди), върху спермалния хроматин и спермалните показатели при мъже с идиоптичен и неизяснен инфертилитет.

Установено е, че съвкупността от трите показателя - подвижност, концентрация и морфология на сперматозоидите, могат да служат като прогностични маркери при оценяването на мъжкия фертилитет и класифицирането на мъжете като фертилни и такива с неизяснен и идиопатичен инфертилитет, но нито един от тях не притежава 100% диагностична стойност по отношение на фертилизационния потенциал на мъжа.

Намерено е, че ДНК фрагментационният индекс (DFI) е по-висок при инфертилните в сравнение с фертилните мъже (макар да остава в границите на нормата) и нараства с влошаването на морфологията на сперматозоидите.

Установено е, че двете групи мъже – с нормален фертилитет и с инфертилитет, се различават по процента на прогресивно подвижните сперматозоиди, процента на сперматозоидите с нормална морфология, ДНК фрагментационния индекс и нивата на тоталния антиоксидантен капацитет (TAC).

TAC е по-висок в групата на фертилните мъже и най-нисък в групата на мъжете с идиопатичен инфертилитет и данни за тератозооспермия. Статистически значими различия в нивата на TAC при мъже с идиопатичен и неизяснен инфертилитет не са

установени. В мъжете с инфертилитет са измерени по-високи интрацелуларни нива на H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$ и понижен ТАС. Намерено е, че концентрацията на малонил алдехид, на глутатион и на антиоксидантните ензими глутатионпероксидаза и каталаза нямат диагностична стойност по отношение на фертилизационния капацитет на мъжа в случаите на неизяснен и идиопатичен инфертилитет.

Получените резултати са стъпка напред по пътя към комплексното използване на данните от рутинния семенен анализ и ДНК фрагментационния индекс в комбинация с изследването на интра- и екстрацелуларни маркери на оксидативния стрес, водещ до по-точно оценяване на мъжкия фертилитет. Особено подходящи за изследване на нивата на оксидативния стрес с цел диагностика и провеждане на антиоксидантно лечение са мъжете с неизяснен и идиопатичен инфертилитет без клинични данни за патологични находки. Специално внимание заслужава намереният повишен процент на ДНК фрагментация на сперматозоиди след обработка и размразяване и необходимостта от търсене на решения за преодоляването на този проблем, едно от които би могло да бъде приложението на антиоксиданти.

Обсъждането на резултатите е направено в хода на излагането им. Собствените данни са аналитично и критично обсъдени в контекста на известната от достъпната литература информация.

Изводите Въз основа на получените резултати са систематизирани 11 извода, които напълно приемам.

Съгласна съм и с обособените **8 приноса** (3 оригинални и 5 с потвърдителен характер), посочващи новаторските елементи в дисертационния труд.

Цитираната литература обхваща общо 161 източника (всичките са на латиница). Повече от 40% от тях са от последните 10 години.

3. Оценка на съответствието между Автореферата и дисертационния труд

Авторефератът е изработен в пълно съответствие с дисертационния труд и представя в съкратен вариант същността на проучването, последователността на експерименталната работа, получените резултати и направените на тяхната основа изводи и приноси.

4. Публикации на докторанта по темата на дисертационния труд

По темата на дисертационния труд са публикувани две статии в международни списания – “Journal of Biomedical and Clinical Research” и “European Review for Medical and Pharmacological Sciences”. Втората статия е в издание, което е индексирано в Scopus (с 5-годишен импакт фактор $IF = 2.451$ и квантил Q2 за 2017 г, когато е публикувана статията), към момента са забелязани 14 цитата. Данаил Мартинов е първи автор в третата публикация, която е приета за печат в “Journal of Biomedical and Clinical Research”.

Получените резултати са представени с общо 10 съобщения на научни форуми, 5 от които в чужбина. Три от резюметата са включени в суплементи на списание („Andrology”), което се индексира в базата с научни данни Scopus (с квантил Q2 в областта на регенеративната медицина).

5. Критични бележки и коментари, препоръки, въпроси към докторанта

Нямам забележки по същество. Забелязах някои технически грешки (погрешно написани буквички, липсващи запетайки, неправилно използвани пълен и непълен член и др.). Списъкът с цитираната литература не е добре оформен технически – в описанието на някои от цитатите липсва година на публикуване (напр. цитати с номера 123, 128, 129), на места не е спазена азбучната подредба на имената на авторите, има и повторение (113).

Изброените пропуски по никакъв начин не намаляват качествата на дисертационния труд.

Към докторанта имам следните въпроси:

- Има ли данни от достъпната литература за влиянието на SARS-CoV-2 върху морфологията и функционалната активност на сперматозоидите, върху нивата на оксидативния стрес?
- В каква посока според докторанта трябва да продължат проучванията върху изследваната от него тема?

6. Автобиографични данни и лични впечатления от докторанта

Данаил Мартинов е придобил ОКС „Бакалавър” по „Молекулярна биология” в Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски” през 2013 г., а през 2015 г.

става „Магистър“ по „Клетъчна биология и патология“ в същото висше учебно заведение. От 2012 г. работи като биолог в сектори „Андрология“ и „Ембриология“ на Медицински център – Клиничен институт по репродуктивна медицина „Света Елисавета“ в гр. Плевен. На 10.12.2015 г. е зачислен като редовен докторант в Медицинския университет в гр. Плевен. Научните и професионалните му интереси са в областта на репродуктивната биология, регенеративната медицина, наномедицината, генното и клетъчното инженерство.

Автор е на 3 публикации в международни научни издания (и трите по темата на дисертационния труд), едното, от които е с импакт фактор и квартил (Q2). Броят на забелязаните до момента цитирания е 14. Участва в работните колективи на 4 научноизследователски проекта, финансирани от Медицинския университет в гр. Плевен.

Съавтор е на 19 научни съобщения, 5 от които са представени в чужбина. През 2014 г. е преминал през курс на обучение по спермален анализ, организиран и проведен от European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) в Училището по медицина към Университета в Бирмингам, Англия. Взел е участие и в Международно училище по имунология, проведено в България.

Познавам Данаил Мартинов от 2010 г., когато беше студент в група, на която водех упражнения по генетика. В продължение на година и половина беше активен участник и в ръководения от мен кръжок в секция „Патология“ на ИЕМПАМ-БАН. Впоследствие бях ръководител и на дипломната му работа за придобиване на ОКС „Магистър“.

Данаил Мартинов е любознателен и отговорен млад учен, който непрекъснато иска да усъвършенства своите познания и професионални умения, изпълнен е с благородната амбиция да даде най-доброто от себе си. За мен е изключително приятно да отбележа значителния напредък в развитието му на млад специалист.

7. Заключение

Представеният дисертационен труд е посветен на актуална и значима тема, заложените в него цели и задачи са изцяло постигнати, при това на високо научно ниво, а получените оригинални резултати са безспорен принос в областта на андрологията, ембриологията, клетъчната биология, биохимията и асистиранията репродукция.

В хода на подготовката, докторантът Данаил Мартинов е разширил и надградил своите професионални знания и умения, приложил е широка гама от съвременни

методи и техники, израснал е като способен и перспективен специалист. Активно се е включил в подготовката и успешното изпълнение на амбициозен научноизследователски проект. И най-важното: получените при изпълнението на дисертационния труд нови резултати и знания ще допринесат за решаването на едно от водещите биомедицински и социални предизвикателства на нашето време – репродуктивните проблеми, които за страна като България имат и важно демографско значение. Положените от докторанта и научния ръководител усилия при подготовката на дисертационния труд и полученият краен продукт заслужават висока оценка.

Всичко това ми дава основание да смятам, че представеният дисертационен труд отговаря напълно на Закона за развитие на академичния състав в Република България както и на правилника за неговото приложение в Медицинския университет в гр. Плевен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”. Убедено давам своята положителна оценка и препоръчвам на членовете на Уважаемото Научно жури да присъдят на Данаил Ивайлов Мартинов образователната и научна степен „Доктор” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки („Медицинска биология”).



03 май 2021 г.

.....

/Проф. Р. Александрова/