

РЕЦЕНЗИЯ

относно:

дисертационния труд на **д-р Виолета Рилчева Славчева**, задочен докторант, към Катедрата по „Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология“ при Медицинския университет – гр. Плевен, за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ по научната специалност „Имунология“ с шифър 01.06.23

Тема на дисертационния труд: *“Проучване влиянието на ДНК-фрагментационния индекс на сперматозоидите върху изхода на процедурите по асистирана репродукция”*

Научен ръководител – доц. д-р Емилияна Конова, дм

Рецензент: проф. д-р Димитрина Кирилова Димитрова-Диканарова, дм, включена в състава на Научното жури във връзка със защитата на дисертационния труд въз основа на Заповед №2124 от 07.10.2015 г. на Ректора на МУ – Плевен

Рецензията е изготвена според изискванията на Закона за развитието на академичния състав на Република България и Правилника за приложението му в Медицински университет – гр. Плевен.

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е актуален, задълбочен, с безспорен фундаментален и приносен характер, и е резултат от голямо по обем, прецизно, и компетентно изпълнено проучване с имунобиологична насоченост. Въпросите, свързани с етиопатогенезата на безплодието в човешките популации, са обект на класическата и на съвременната биология и имунология на репродукцията. Безплодните двойки представляват 10-15 % от всички семейни двойки. Според данни на СЗО инфертилитетът при около 40 % от безплодните двойки се дължи на причини от страна на мъжа, като в приблизително 30% от случаите основната причина за безплодието остава неоткрита. Едновременно с добре проучените етиопатогенетични механизми на безплодието при жените, се установява тенденция към нарастване на честотата на стерилитета при мъжа или т.нар. „мъжки фактор за стерилитет“. Репродуктивната патология би могла да се характеризира и с намаляването на

безплодието, свързано с трансмисивни инфекции, и увеличаване на имунологично обусловеното безплодие. Изследванията върху структурно-функционалните характеристики на мъжките гамет и тяхната биологична роля в процеса на оплождането чрез използване на конвенционални и нови методи допринася за анализа и разрешаването на проблемите, свързани с редукцията на фертилитета при човека. Сред тези параметри с особена важност, но недостатъчно добре проучени, са и интегритетът на спермалната ДНК, както и причините за ДНК – фрагментацията, уврежданията на спермалната ДНК при инфертилни пациенти, а също и корелацията между спермалната ДНК и оплождането, ембрионалното развитие, имплантацията и бременността след прилагането на *ART* или бременността по естествен път.

Създаването и анализа на нови методи с диагностично и прогностично значение има приложение както при изследване на проблемите на естествената концепция, така и при *техниките на асистирана репродукция*. Сред тези методи се откроява *флуоцитометричният тест за изследване структурата на хроматина на сперматозоидите (SCSA)*, който е основен за анализ на функционалните характеристики на мъжките гамет, и допълващ ограничените възможности на стандартния анализ на спермалните проби. *ДНК фрагментационният тест* има също важно значение за оценка на вероятността за настъпване на оплождане, качеството на ембрионите, имплантацията и развитието на бременността при пациенти, участващи в програмите за асистирана репродукция, или планиращи бременност по естествен път. Актуалността на обсъждания дисертационен труд се определя и от необходимостта за оценка на съвременните методи при изследване интегритета на спермалната ДНК, и характеризиране на тяхната диагностична и прогностична стойност, както и показанията и подходите при провеждане на лечение на безплодието при мъжете. **В този смисъл, дисертационният труд е посветен на един много съществен и актуален проблем на репродуктивната биология и имунология, отнасящ се до изучаването на някои структурно-функционални характеристики на мъжките гамет и тяхната биологична роля в процеса на оплождането, като е и предпоставка за откриването на нови подходи за диагностика и терапия при социално значимите демографски проблеми, свързани с безплодието в човешките популации.**

Обсъжданият дисертационният труд е написан на 177 страници с оптимално съотношение на съставните му части и включва следните основни

раздели: Литературен обзор; Цел и задачи; Материали и методи; Резултати; Обсъждане; Изводи; Приноси; Литература.

Библиографската справка се основава на литературни източници с пряко отношение към дискутирания проблем, всички цитирани трудове (408 публикации) са на латиница, като преобладаващата част от цитираните статии и монографични издания са публикувани през последните 10 години. Илюстративният материал включва 23 фигури и 38 таблици. Представена е и справка за: публикациите; участието в научно-изследователски проекти, квалификационни курсове и научните съобщения на докторанта по темата на дисертацията.

Литературният обзор е задълбочен, изчерпателен и аналитичен. В него е направена цялостна характеристика: на структурата на мъжките гамети (вкл. и електронномикроскопската и рецепторната характеристика), която е добре илюстрирана; на сперматогенезата в *tubuli contorti seminiferi*; на ролята на Сертолиевите клетки при образуването на кръвно-тестисната бариера и превръщането на тестисите в задбариерни, имунологично привилегирани органи; на регулацията на сперматогенезата; на динамиката в структурата на спермалния хроматин и компактизирането на ДНК. Анализирани са много подробно и задълбочено корелацията между фрагментацията на ДНК с оплождането и ембрионалното развитие при бременности след ART, или бременности по естествен път; описани са основните причини за уврежданията на ДНК, както и основните механизми на репарация на увредената ДНК по време на сперматогенезата, оплождането, ранната ембриогенеза. С особено внимание в литературния обзор са разгледани прогностичните маркери за успеха на ART и основните метода за оценка на интегритета на спермалната ДНК. Анализирани са асоциацията между спермалния хроматин, данните от тестовете за оценяване на уврежданията му, и резултатите от прилагането на богатата гама от репродуктивни техники, обобщени чрез ART. На фона на този задълбочен литературен обзор е изведена и целта на дисертационния труд.

Целта на дисертационния труд е свързана с проучвания на фрагментацията на спермална ДНК и нейното влияние върху изхода на процедурите за асистирана репродукция, което би довело до подобряване на диагностичния подход и терапевтичното поведение при мъже, участващи в ART.

Главните задачи на дисертационния труд са коректно и много аргументирано редактирани. Разработването на дисертационния труд включва 6,

произтичащи от целта задачи, чието изпълнение води до логическата последователност на докладваните в дисертационния труд резултати – от определянето на референтните стойности на спермални параметри в българската популация спрямо нормите на СЗО от 2010 година и **ДНК-фрагментационен индекс (DFI)**, до определяне на прагови стойности за *DFI* и диагностичното и прогностично значение на индекса по отношение бременността по естествен път и *ART* процедури. **Към основните задачи на дисертационния труд се отнасят и:** проучвания върху корелацията между *DFI* и успеха на процедурите при **интра утеринна инсеминация (IUI)**, *IVF* процедури с автоложни и донорски гаметети, и развитието на бременността след тези процедури; както и проучвания върху влиянието на външни фактори, като урогенитални инфекции, криоконсервацията, ранната апоптоза, оксидативния стрес, върху спермалната ДНК.

Клиничните материали и използваните методи са подбрани много удачно. Те са достатъчни по обем за достоверен качествен и количествен анализ и включват 8 основни групи от пациенти и контроли, между които: контролна група от здрави мъже с доказан фертилен статус; група от пациенти (*ART* пациенти), страдащи от първично безплодие; група от пациенти от двойки, при които е извършена *ICSI/IVF*, без анамнестични и клинични данни за прекарани урогенитални инфекции и без серумни *anti-Chlamydia trachomatis* антитела в клинично значими стойности; група от пациенти от двойки, на които е извършена *ICSI* (*ICSI* пациенти); пациенти с първичен или вторичен стерилитет, с процедура *IUI* или *ISCI*.

Методичният подход е комплексен и адекватен на поставената цел. Той се основава на 9 главни, високо информативни и взаимно допълващи се съвременни методи с множество подметоди: спермален анализ; ДНК-фрагментационен тест; изследване на маркери за ранна апоптоза; изследване на **тоталния антиоксидантен капацитет (TAC)** на сперматозоидите чрез луминометрия; *Real time PCR* за определяне на урогенитални микоплазми в еякулат; замразяване и размразяване на сперматозоиди; *IUI*; *IVF* и *ICSI*; високо информативни статистически методи за обработка, анализ и таблично, и графично документиране на получените резултати чрез *Statgraphics plus* при $p < 0,05$. Оригиналните по замисъл клинични и експериментални модели са оптимално съчетани с оглед на целта на проучването.

Внимание заслужава факта, че докторантът използва самостоятелно и много компетентно разнообразните и трудоемки методични подходи при различни работни протоколи и клинични групи.

Описанието на собствените резултати е представено логично. То без съмнение показва отличната методична подготовка на докторанта и неговата добросъвестност в работата. Изложението следва логично структурата на литературния обзор и основните задачи. Получените резултати са изложени в 6 главни раздела с подраздели. **Анализът и обсъждането на резултатите** показва уменията на дисертанта да съпоставя литературните данни, да коментира умело получените данни и да прави мотивирани обобщения. Илюстративният материал е с високо качество и достатъчен по обем за изпълнение на поставените задачи. Формулираните 6 извода коректно отразяват получените резултати и са с оригинална и научно-приложна стойност. Установено е, че: 1. *DFI* е важен показател и фактор, предсказващ изхода от *ART*; 2. *ICSI* процедурата може да се използва за успешно лечение на стерилитета при високи стойности на *DFI*; 3. При *ART (IUI, ICSI процедури)* спермалните проби с *DFI > 27%* се свързват с повишен риск от ранна загуба на плода; 4. Установена е отрицателна корелация между стойностите на *DFI* и на **тоталния антиоксидантен капацитет (TAC)** на сперматозоидите в семиналната плазма; 5. Установена е корелация между *DFI* и морфологията и прогресивната сперматозоидна подвижност; 6. Установено е, че изборът на сперматозоиди с ниска ДНК фрагментация води до висок процент на бластоцисти и успешно протичане на бременността по отношение на факторите, зависими от генома на бащата.

Главните формулирани приноси на дисертационния труд са **8** и точно съответстват на получените резултати, като **3** от тях имат оригинален характер, а останалите са с потвърдително и научно-приложно значение за репродуктивната имунология и биология и са основа за бъдещи медико-биологични изследвания. Главните приноси се отнасят до следното: 1. За първи път са изработени референтни стойности на стандартните спермални показатели за Българската популация мъже спрямо данните на WHO, 2010 год.; 2. За първи път са изработени референтни стойности на ДНК-фрагментационен индекс (*DFI*) при здрави български мъже и постигане на бременност по естествен път; 3. За първи път е установена асоциацията между ДНК фрагментацията на сперматозоидите и маркер за ранна апоптоза и

тоталния антиоксидантен капацитет (TAC) на сперматозоидите, което допринася за идентифицирането на групите пациенти, подходящи за антиоксидантна терапия;

4. Предикативната стойност на *DFI* като самостоятелен показател за бременност и раждане при двойки, планиращи *IUI* и бременност по естествен път, е потвърдена; 5. Потвърдено е и критичното значение на *DFI* по отношение развитието на бременността след *ICSI*, тъй като е доказана възможността увреждането на спермалния хроматин да бъде преодоляно чрез *ICSI*; 6. Потвърдена е ролята на бащиния геном (чрез проучвания върху *DFI* при *ART*) за качеството на ембрионите и успеха на бременността, независимо от начина, по който е постигната; 7. Получените резултати потвърждават ролята на *DFI* като важен задължителен фактор в диагностичния и терапевтичен алгоритъм на *ART*, водещ до повишаване на успеваемостта на процедурите; 8. Доказано е, че рутинното прилагане на *DFI* като диагностичен критерий при селекция на пациентите води до повишаване успеваемостта на *ART* процедурите.

Впечатление прави изключително добрата публикационна активност на докторанта. Представен е списък от 28 научни труда, свързани с дисертационния труд. По темата на дисертацията са публикувани 9 научни статии, от които 3 в национални списания, и 6 – в международни списания с импакт фактор. На 7 от статиите докторантът е първи автор. Участията в научни форуми са 19 - 1 на международен форум, 7 на национални конгреси и симпозиуми с международно участие, 11 на национални форуми. Докторантът е първи автор на 13 от научните съобщения. Изследователската работа по дисертацията е финансово подпомогната от 5 научно-изследователски договора, които са финансирани от Медицински университет – Плевен. От представената справка е видно, че публикационната и научно-изследователската активност на докторанта отговаря и превишава науко-метричните изисквания, отразени количествено в табл. 1 от Правилника за приложението на Закона за развитието на академичния състав на Република България в Медицински университет – гр. Плевен.

Нямам **критични бележки и препоръки** към предоставения ми за рецензия труд, тъй като те бяха направени предварително и обсъдени с автора при апробацията. С удоволствие констатирам, че тези препоръки са взети пред вид в окончателния вариант на докторския труд.

Авторефератът отговаря на изискванията на Закона за развитието на академичния състав на Република България и правилника за приложението му в МУ – град Плевен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Представеният за рецензиране дисертационен труд е актуално по замисъл изследване и е резултат от голяма по обем, прецизно и добросъвестно изпълнена клинично-експериментална работа. Резултатите са компетентно дискутирани и имат оригинален приносен характер в областта на репродуктивната медицина и имунология. Качеството и обема на дисертационния труд напълно отговарят на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение в МУ - Плевен, с оглед присъждане на образователната и научна степен „Доктор“. Публикационната и научно-изследователската активност на докторанта изпълнява и превишава науко-метричните изисквания, отразени количествено в Правилника за приложението на Закона за развитието на академичния състав на Република България в Медицински университет – гр. Плевен. Качествата на дисертационния труд, а именно: задълбоченият и изчерпателен преглед на литературните данни, актуалността на анализиранияте проблеми, прилагането на съвременни методи, стандартизирането им и изработване чрез тях на референтни стойности за Българската популация, оригиналността и практическото значение на приносите за репродуктивната медицина, ми дават основание убедено да заявя, че **д-р Виолета Рилчева Славчева отговаря на изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ по научната специалност „Имунология“.**

04.11.2015 гр. София

Рецензент: 
Проф. д-р Д. Димитрова-Диканарова, дм