

РЕЦЕНЗИЯ

от доцент д-р Еленка Стоилова Георгиева в Биологически Факултет на Пловдивски Университет „ Паисий Хилендарски”

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор' в област на висше образование; 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки, докторска програма: „Клетъчна биология”

Автор: Владимир Тодоров Стайков

Тема: „Използване на митохондриални маркери за оценка на човешки сперматозоиди”

Научен ръководител: проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов - ПУ „П. Хилендарски”

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № Р33-1102 от 20.03.2017 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски” (ПУ) съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Използване на митохондриални маркери за оценка на човешки сперматозоиди” за придобиване на образователната и научна степен ‘доктор’ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, докторска програма: Клетъчна биология. На първото заседание на научното жури бях определена за рецензент.

Автор на дисертационния труд е Владимир Тодоров Стайков докторант в задочна форма на обучение към катедра „Биология на развитието” с научен ръководител проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов от ПУ „П. Хилендарски”.

Представеният от Владимир Тодоров Стайков комплект материали на хартиен 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;
- нотариално заверено копие от диплома за висше образование (ОКС ‘магистър’)
- заповеди за записване в докторантура, прекъсване на обучението (поради майчинство) и за продължаване на обучението;
- заповед за провеждане на изпит от индивидуалния план и съответен протокол за издържан изпит по специалността: изпит по „Клетъчни култури и тяхното приложение”

- ние“ с успех отличен (6); изпит по „Флуцитометрия“ с успех мн. добър (5) и изпит по „Клетъчни и молекулни механизми на автоимунните заболявания“ с успех отличен (6);
- протоколи от катедрени съвети, свързани с докладване на готовност за откриване на процедурата и с предварително обсъждане на дисертационния труд;
 - 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;

Към представения от Владимир Тодоров Стайков комплект документи/материали нямам забележки.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Докторант Владимир Тодоров Стайков е роден на 7.05.1984. Завършва средно-специално образование в периода 1998-2004 г. в Професионална гимназия по електротехника и електроника (ПГЕЕ), гр. Пловдив. От 2004 до 2008 е студент в Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, бакалавърска програма специалност Молекулярна биология (редовна форма). Дипломира се като „бакалавър“ с успешно защитена дипломна работа на тема: „В-клетъчен отговор и имунодоминантни епитопи при ревматоиден артрит“.

От 2008 до 2010 г. – завършва магистърска програма (задочна форма) в Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, специалност Микробни биотехнологии. Дипломира се като разработва и защитава дипломна работа към катедра “Биохимия и микробиология” на тема „Сравняване на два метода за оценка на ДНК-фрагментацията в човешки сперматозоиди и връзка с класическите показатели на спермограмата. Методи за селекция.“

От 17.06.2009 г. до момента работи като биолог в Андрологична лаборатория и Изследователско звено в МЦ Надежда репродуктив София ООД (към МБАЛ НАДЕЖДА – болница за женско здраве - София). Завършил е курс по компютърно обучение и III^{то} ниво английски език. Притежава свидетелство за управление на МПС- Категория В. От 2012 г. до 2016 г. е зачислен в задочна докторантура към катедра „Биология на развитието” на ПУ.

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

Като се има предвид, че понастоящем повече от 270 000 двойки в България имат репродуктивни проблеми, а в световен мащаб те са около 50-80 милиона (според СЗО) борбата с безплодието в един от най-важните за разрешаване проблеми на съвременното ни общество. В този

смисъл тематиката на настоящия дисертационен труд е актуална и значима. При 40% и повече процента от бездетните двойки стерилитетът се дължи на проблеми при мъжа – т. нар. „мъжки фактор“. Диагностицирането на мъжкия стерилитет се основава предимно на конвенционалния анализ на еякулата с оценката на обема сперма, концентрацията, подвижността и морфологията на сперматозоидите. През последното десетилетие вниманието на учените се насочва и към друг предполагаем фактор за мъжкото безплодие, а именно биоенергетичния статус на митохондриите в сперматозоидите. Задълбоченото изучаване и анализ на митохондриалните показатели - митохондриален мембранен потенциал (ММП), митохондриална маса (ММ), продукция на аденозинтрифосфат (АТФ) и генериране на супероксидни радикали (СОР) има своето значение и е важна стъпка за уточняване причините, водещи до мъжки инфертилитет. Това определя и високото научно и приложно значение на настоящото изследване.

4. Познаване на проблема

Докторантът познава много добре проблема и публикуваните до сега резултати в областта на разработваната тема. Информацията е подходящо подбрана и достатъчно информативна. Това личи от представения литературен преглед, който в рамките на 17 страници включва удачно представена характеристика на мъжките гамети и тяхното образуване, както и адекватно подбрана информация за митохондриите като сложен субклетъчен органел, човешките митохондрии - морфология, функции в тестисите и сперматозоидите, както и за убиквитиниране на митохондриите в човешките сперматозоиди, митохондриалния мембранен потенциал и връзката му с апоптозата. Представени са флуоресцентни багрила за изучаване на митохондриите, които са използвани в настоящото изследване - JC, MitoTracker Green.

Литературният анализ по проблема представя докторанта като изследовател с възможности да интерпретира, анализира и оценява творчески постигнатите до момента научни постижения.

Прави впечатление високият научен стил и точен изказ, което предполага високо ниво на теоретична подготовка и информираност по проблема у докторанта, както и умение да прилага научната терминология адекватно.

Намирам за удачно и практично изнасянето на някои от използваните съкращения в дисертационния труд в списък след глава съдържание.

Целта и задачите са ясно формулирани.

5. Методика на изследването

В настоящото изследване са включени 97 пациенти на възраст между 24 и 54 години от Център за репродуктивно здраве „Надежда“, намиращ се в МБАЛ „Надежда“ – болница за женско здраве, гр. София през периода от ноември 2013 г. до септември 2014 г. при спазване на етичните правила, кодекси и международни конвенции, а получените резултати се

основават на данни от проведен стандартен спермален анализ и определяне на митохондриален статус при пациенти, участващи в ин витро (ICSI) процедури за лечение на безплодие.

Във връзка с това методиката на изследването включва комплекс от анализи и протоколи за отделните етапи на целия процес от оплождането до имплантирането на ембрионите. За реализиране на поставените задачи са използвани удачни, съвременни методи съобразени с поставените цел и задачи. Методите на изследването са представени подробно и коректно. Приложени са и подходящи статистически анализи за изпълнението на поставените задачи както и представянето на алгоритъм за действие на приложения прогностичен модел.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд съдържа 114 страници, 29 таблици и 64 фигури и 127 литературни източника всичките на латиница. Структуриран е като са спазени изискванията за съдържание на необходимите раздели. Тъй като към предходните две точки (т. 4 и т. 5) изказах мнението си относно литературният обзор и методиката на изследването като адекватни и логични спрямо поставената цел и задачи, тук ще обърна внимание на останалите глави от дисертационния труд.

В частта *Резултати и дискусия* усреднените резултатите от стандартните показатели и тези за оценка на митохондриалния статус са удачно представени като са използвани хистограми и таблици. Много умело докторанта включва и взаимовръзките между показателите за оценка на митохондриален статус (АТФ, ММ, ММП СОР) с класическите показатели от спермограмата като обобщава собствените резултати и ги дискутира с тези на други изследователи. Интересни са установените взаимовръзки на изследваните митохондриални показатели един спрямо друг. Показана е връзката на митохондриалните показатели с качеството на човешките зиготи и ембриони.

Много интересни и ценни са представените резултати и дискуссионни анализи относно разликите на изследваните енергийни показатели (АТФ, ММП, ММ, супероксидните радикали) в групите на сперматозоидите, довели до образуването на успешно и неуспешно имплантирани човешки ембриони. При разработката на прогностичния модел важно за практиката според мен е установяването на единствен подходящ показател (изменението на митохондриалната маса) от всички изследвани, който авторът включва и в съставянето на регресионно уравнение, както и за оценка точността на разработения модел (с чувствителност и специфичност > 70%). Това дава възможност този показател да се включи в алгоритъм за селекция на сперматозоиди при асистираните репродуктивни технологии.

Резултатите са коментирани, анализирани и обобщени много умело. Това показва високото ниво на възможности у докторанта да интерпретира и коментира собствените резултати спрямо тези и на други автори. В края дисертационния труд завършва с заключение и изводи. Те логично представят обобщени резултатите в общо 12 извода. Много удачно те са групирани в последователността на представените резултати и дискусия и логично, синтематезирано показват проведените проучвания и постигнати резултати.

Прави впечатление представените допълнителни изводи и връзки, пряко свързани с практиката в ин витро клиниката, което потвърждава приноса на изследването за практиката.

В представения списък на научните публикации свързани с дисертацията 30 са от последните 10 години. Това е показател за информираност на докторанта близка до съвременното ни.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Докторант Владимир Тодоров Стайков е представил коректна справка за приносите на дисертационния труд. Разпределени са като приноси с оригинален, научен характер и приноси с потвърдителен и научно-приложен характер.

Приноси с оригинален научен характер

Установени са и описани взаимовръзките между митохондриалните показатели на сперматозоидите и стандартните параметри на спермограмата (въздържание, обем, високзитет, рН, концентрация, подвижност и морфология). Разгледани, анализирани и описани са взаимовръзките на изследваните митохондриални показатели един спрямо друг и спрямо отклоненията в абсолютните им стойности след добавяне на протонофора СССР. Установените взаимовръзки между митохондриалните показатели на човешките сперматозоиди и качеството на зиготата дават възможност за използване на отчетените нива на АТФ в сперматозоидите за прогнозиране на морфологичното качество на получените зиготи. Анализирани и описани са ефектите от различните видове митохондриални показатели на човешките сперматозоиди върху качеството на получените от тях зиготи и ембриони. Открита е връзката на митохондриалния статус на човешките сперматозоиди с успеха от ин витро процедурата – липса или наличие на имплантация. За първи път се отбелязва силната връзка на митохондриалната маса с вероятността за успешна имплантация.

Научни приноси с потвърдителен характер

Потвърдена е силната взаимовръзка на митохондриалните показатели (АТФ, ММ, ММП и СОР) с два от основните параметри на спермограмата – концентрация и подвижност. Потвърден е по-големият процент отчетени оплождания в групата на сперматозоидите с висок ММП в сравнение с групата сперматозоидите с нисък ММП. Потвърждава се измерването на

СОР преди ин витро оплождане като предиктивен маркер за оценка на изхода от ин витро процедурата и като способ за селекция на сперматозоиди за АРТ.

Научно-приложни приноси

Подбрани са най-подходящите митохондриални показатели за оценка на потенциалната възможност на човешките сперматозоиди, водещи до успешно имплантиране на производните им ембриони. Предложени са гранични (cut-off) стойности на митохондриалните показатели за предсказване на шансовете за успешна имплантация. Разработен е прогностичен модел (с чувствителност и специфичност > 70%) за предсказване на успешна имплантация на базата на митохондриалната маса на сперматозоидите. Получените резултати могат да се приложат при разработката и оценка на ефективността на иновативни подходи за селекция на човешки сперматозоиди, използвани при АРТ-процедурите.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Резултати от дисертационния труд са публикувани в две научни публикации, като и в двете докторантът е водещ автор. Едната статия е публикувана в Годишника на Софийски Университет „Св. Климент Охридски” (Annuaire de l’Université de Sofia “St. Kliment Ohridski” Faculte de Biologie). Като съавтори са включени научният ръководител и още четирима изследователи. Втората статия е приета за публикуване. Статията е под печат и е придружена със служебна бележка на редколегията за приемането ѝ. Докторантът е също водещ автор и е в съавторство с още четири автори включително и научния ръководител. Съдържанието и на двете статии включва резултати от настоящия дисертационен труд и имат качества на завършени научни трудове. Първата статия описва и коментира резултати от взаимовръзките на АТФ с класическите спермални параметри. Втората статия включва връзката между някои митохондриални параметри на човешките сперматозоиди със стандартни параметри на сперма и резултат след процедура ICSI от асистираните репродуктивни технологии.

Докторантът е представил резултати от дисертационния труд и в участието си в международен научен форум (31-та годишна среща на Европейското общество за човешката репродукция и ембриология в Лисабон, Португалия), където представя постер за митохондриалната маса като най-добрият кандидат, сред митохондриални функционални маркери в човешки сперматозоиди за прогноза на успешно имплантиране на ембриони.

9. Лично участие на докторанта

Като имам предвид представеният дисертационен труд, в който са подбрани адекватни методи свързани с целта и поставените задачи, статистически анализи и логично описани резултати с обосновани хипотези и заключения, изказвам убедителното си мнение за личното участие на докторанта в разработвания научен проблем с авторска заслуга на получените резултати и формулирани приноси.

10. Автореферат

Авторефератът (общо 63 стр.) съдържа текстова информация от всички части на дисертационната разработка в сполучливо съкратен вид. Включени са и 27 таблици и 38 фигури. Оформлението на автореферата е с отлично качество и обобщава напълно изследването. Мнението ми е, че авторефератът е подготвен според съответните изисквания и отразява напълно основните резултати, постигнати в дисертацията.

11. Критични забележки и препоръки

Като цяло нямам съществени критични забележки към проведеното изследване и комплекта от материали по дисертационния труд. По отношение на приложените фигури в дисертационния труд се забелязва, че при повечето от тях не са посочени източниците от които са взети (например фигури № 2 -7 и от № 10 –до 15 , 17, 18 и т.н.). В частта материали при описанието на анализите и протоколите докторанта не е посочил литературните източници, по които са прилагани те, както и евентуалните техни модификации. В текста се срещат малки граматични неточности, които не намаляват изцяло положителното ми мнение за разработката.

12. Лични впечатления

За кратък период от време докторанта е усвоил методики и статистически анализи, получил е конкретни резултати и направил точни обобщения и изводи, което е показател за качествата на докторанта. Личните ми впечатления от Владимир Тодоров Стайков са на мотивиран млад изследовател и перспективен учен.

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Препоръчвам на докторанта да продължи изследванията си в областта на АРТ в това число и на митохондриалния статус на човешките сперматозоиди, което ще позволи постигане на все по-добри резултати относно борбата с безплодието като съвременен проблем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд *съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката* и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“. Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания на Биологически Факултет, приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантът Владимир Тодоров Стайков **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност Клетъчна 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 Владимир Тодоров Стайков в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма Клетъчна биология.

08.04.2017 г.

Пловдив

Рецензент:

(доц. д-р Еленка Георгиева)