

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Росица Замфирова

Ръководител на направление „Биологични ефекти на природните и синтетични вещества“ – ИНБ, БАН

Относно дисертационен труд насочен за публична защита за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, професионално направление 4.3. „Биологични науки“, Научна специалност „Физиология на животните и човека“ на докторант Галина Ненкова на тема:

„Проучване действието на десферал върху качеството на сперматозоиди в условия на оксидативен стрес“ с научни консултанти доц. д-р Албена Александрова (ИНБ, БАН) и доц. Росен Стефанов (ИБИР, БАН).

Процедура на обявяване на публичната защита

Галина Трайкова Ненкова е зачислен за докторант на самостоятелна подготовка по научната специалност „Физиология на животните и човека“ в Институт по невробиология на БАН със заповед № 108 /30.03.2015 г. на Директора на института и е отчислена с право на защита със заповед № 276/31.07.2017 г. Работата на асистент Ненкова е обсъдена и одобрена на разширен научен колегиум на направление „Биологични ефекти на природни и синтетични вещества“. На заседание НС на ИНБ, състояло се на 17.05.2018 г., е разкрита процедура за защита на докторантката и е избрано Научно жури за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност „Физиология на животните и човека“. Със заповед № 182/17.05.2018 г. на Директора на ИНБ за провеждане на защитата е назначено Научно жури. На неговото първо заседание, състояло се на 18.05.2018 г., бях избрана за председател на НЖ и рецензент на докторантския труд.

Декларирам, че нямам съвместна научна и публикационна дейност с Галина Трайкова Ненкова

За изготвяне на рецензиията докторант Галина Трайкова Ненкова е представила изискуемите материали (дисертация, автореферат, публикации, автобиография).

Рецензията е изготвена съгласно изискванията на ЗРНСРБ, Правилника за неговото приложение и Правилника за прилагането му в ИНБ-БАН.

Биографични данни на кандидата

Галина Трайкова Ненкова получава бакалавърска степен по молекулярна биология в СУ „Св. Климент Охридски“ през 2006 г. През 2008 придобива образователно-квалификационната степен магистър по вирусология в същия университет.

От 2007 г. започва работа в ИНБ, БАН, последователно като специалист – биолог, научен сътрудник и асистент в лаборатория „Свободно – радикални процеси“. От 2015 г. работи и като клиничен ембриолог в клиника „Малинов“ Същата година е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка в ИНБ-БАН. Заслужава да се отбележи и големият брой курсове по практическо обучение (8), на които докторантката е присъствала както в страната, така и в Испания, Великобритания и Франция, което безспорно повишава нейната компетентност и практически познания в областта на репродуктивната биология.

Актуалност на дисертационния труд

Темата, на която е посветен дисертационния труд, е повече от актуална. Трудът е насочен върху изследване на ефекта на хелатора десферал върху качеството на сперматозоидите в условията на оксидативен стрес. Така докторантката сполучливо съчетава богатия опит на лабораторията в изследване на свободно радикалните процеси в организма с не по-малко интересния въпрос за ефекта на оксидативния стрес върху морфологията и физиологията на сперматозоидите и успеха на асистираната репродукция. Проучванията, публикувани в световната научна литература доказват, че семенната плазма е богата на антиоксиданти, но това не е валидно за самите сперматозоиди. Затова те са уязвими на оксидативно увреждане при ОС, което е неизбежно при предшестващата асистираната репродукция предварителна обработка на еякулата – отстраняване на плазмата, центрофугиране, замразяване размразяване. Образуваните при тези обработки АФК увреждат мембрани на клетките и митохондриите, което намалява количеството на синтезирания АТФ и така рефлектира и върху подвижността на сперматозоидите. АФК, когато са в големи количества и не могат да бъдат неутрализирани от антиоксидантната система на

клетката, предизвикват и фрагментиране в молекулата на ДНК, а това значително повишава риска от развитие на увредени ембриони.

Структурирането на дисертационния труд е съобразена с общоприетите съотношения между отделните раздели. Той съдържа 109 стандартни машинописни страници, от които въведение-3стр., литературен обзор – 23 стр., цел и задачи – 1стр., материали и методи – 12 стр. Резултатите са описани на 25 стр. и обсъдени в 20 стр. Изводите и справката за приносите са представени на 1 стр. Библиографията включва 173 литературни източника на английски език. Резултатите от изследванията са представени в 9 съобщения на научни форуми и са публикувани в 3 статии, като в 2 от тях Ненкова е водещ автор. Всички публикации са в списания с ИФ. Изследването е онагледено с 10 таблици и 19 фигури, схеми е снимки.

Литературният обзор е написан стегнато, компетентно и диалогично. Посочени са изследвания от различни автори, които показват напълно противоположни ефекти на множество изследвани антиоксиданти и хелатори върху сперматозоиди в условия на ОС. Подробно и убедително са представени и различните ефекти на тези съединения върху отделните параметри на ОС – например SOD предотвратява ПОЛ на мембрани, но увеличава ДНК фрагментацията. Съпоставяйки резултатите от тези проучвания докторантката показва деликатния баланс между използваните при АТР антиоксиданти и хелатори и ефекта им върху морфологията и жизнеността на сперматозоидите, в зависимост от концентрацията, вида и комбинацията им.

Основните изводи от прегледа на публикуваните в литературата резултати са 2. 1)Антиоксидантите са необходими, защото ОС е неизбежен. 2) Необходими са проучвания, които да аргументират създаването на оперативни процедури, така че да се намали риска от ОС при *in vitro* провежданата АТР, а от там и от развитието на увредени ембриони и по-голяма успеваемост при АТР.

Цели задачи Целта на изследването е конкретно и ясно дефинирана – да се проучи възможността метални хелатори (десферал) да се използват при АТР за запазване качествата на сперматозоидите срещу действието на различни прооксидантни фактори.

Основните задачи, които си поставя докторантката, като се има предвид ролята на металите с променлива валентност за възникване на ОС, е да се установи концентрацията на микроелементите в семенната плазма и възможната корелация

между нея, показателите на ОС и функционалните показатели подвижност ,морфология и ДНК фрагментация на сперматозоидите.

Материали и методи Експериментите са проведени с преби от нерез и човек. Използването на сперматозоиди от нерез е много добре аргументирано и обосновано. Впечатлява широкия набор от използвани техники. Методите са сполучливо подбрани и подробно описани.Детайлно са представени процедурите при получаване и обработка на семенните преби, както и стъпките за концентрирането на сперматозоидите. Визуализацията на делителното вретено в яйцеклетката, подборът на сперматозоиди за IMSI и интрацитоплазменото инжециране на сперматозоиди в яйцеклетката са подходящо илюстрирани със снимков материал. Описани са семинологичните изследвания (концентрация и подвижност), морфологията (ДНК фрагментация), използвани биохимични методи за характеризиране състоянието на антиоксидантната система (определение на ПОЛ, тотален глутатион, активност на каталаза, глутатион пероксидаза, супероксид дисмутаза), определянето на концентрацията на металните йони в човешка сперма. Те напълно съответстват на поставената цел и предпоставят получаването на прецизни и достоверни резултати.

Статистическата обработка е извършена с подходящ софтуер.

Резултати са групирани в 5 раздела. Определена е концентрацията на метални йони (желязо, цинк, селен и мед) и влиянието ѝ върху семинологичните показатели, морфологията на сперматозоидите и активността на антиоксидантната ензимна система в семенни преби на мъже с репродуктивни проблеми. Изследвани са ефектите на десферал върху сперматозоиди от нерез и човешки сперматозоиди, подложени на оксидативен стрес. Проучена е връзката между морфологията на сперматозоидите и развитието на нормални ембриони и имплантирането. Проведен е кометен анализ на ДНК-фрагментации в човешки сперматозоиди след индуциране на оксидативен стрес в присъствие и отсъствие на десферал.

Резултатите са добре описани и подходящо представени в 9 таблици и 16 фигури. Установено е, че увеличената липидна пероксидация, в отговор на присъствие на железни йони в семенната плазма, води до влошаване на оплодителния потенциал на сперматозоидите. Открояват се серията експерименти, в които за първи път в настоящата работа е установено, че добавянето на десферал в реакционната среда, съдържаща прооксиданти, води до възстановяване на активността на антиоксидантните

ензими до стойности, отчетени при контролната група. Обобщено, резултатите показват, че присъствието на десферал в семенни проби, в които е индуциран ОС, намалява ПОЛ; подобрява подвижността и морфологията на сперматозоидите и понижава процента на сперматозоидите с ДНК фрагментации.

Отлично впечатление оставя респектиращо задълбоченото **обсъждане**. То е лесно читаемо, въпреки сложността на описаните резултати и дискутирани проблеми, заради строгата логична последователност на изложението. Анализът е подробен и изчерпателен. Докторантката се е постарала да представи проблема в пълнота и съпоставя умело своите и на други автори факти. Основавайки се на получените резултати тя допуска възможността концентрацията на GSH да бъде използвана като химичен маркер за оценка на мъжкия fertилитет. Анализът на фактите показва също, че не толкова активността на антиоксидантните ензими, а вероятно нарушеният синхрон между активността на SOD, CAT и GPX, води до непълно обезвреждане на образувания H_2O_2 . Според Ненкова, значително по-големите количества АФК, продуцирани в условията на ОС, са способни да увредят и самите антиоксидантни ензими, което допълнително задълбочава клетъчните увреждания.Добавянето на десферал при тези условия оказва положителен ефект дори и при използването на търговска среда, в която е включен ЕДТА (среща Средец).

Проведените експерименти потвърждават необходимостта от прилагане на метални хелатори за подобряване на качеството на материала, използван при АРТ и евентуално благоприятно повлияване върху успеваемостта на процедурата

За мен е много впечатляващ резултата от изследването на целостта на спермалния хроматин в сперматозоиди на пациенти с олигоастенотератозооспермия и астенотератозооспермия, в които е индуциран ОС. Прилагането на десферал в тези случаи довежда до пълно възстановяване на спермалните ядра. Броят на експериментите е много недостатъчен и те биха могли да се считат по-скоро за пилотни, но резултата е силно интригуващ и обнадеждаващ.

Изводите са добре формулирани и резюмират отразяват (обобщават) най-съществените резултати от проучването и достиженията на разработката.

Авторефератът резюмира адекватно същността на дисертационния труд. В него са отразени всички основни раздели на дисертационния труд и дава пълна представа за извършената работа, като акцентира върху най-приносните резултати от изследването.

Докторантката се е съобразила със забележките и препоръките, направени на вътрешното обсъждане на работата.

Заключение: Представен е един напълно завършен научен труд, който впечатлява с безспорни качества и е насочен към проблем със социална значимост. Докторантката е усвоила и умело използва голям брой разнообразни изследователски методи и техники, владее в детайли литературата по проблема, с лекота умело и задълбочено интерпретира експерименталните резултати. Резултатите от изследването и произтичащите от тях изводи доказват целесъобразността от използването на десферал при обработката на сперматозоиди за асистирана репродукция. Изведените изводи и приносите на настоящата разработка са колкото с научна стойност, толкова и с конкретна практическа значимост. Дисертационният труд показва, че докторантката е знаещ и можещ специалист.

Представеният материал отговаря на изискванията за защита на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "Доктор". Поради това давам своята положителна оценка и предлагам на уважаемото Научно жури да присъди образователната и научна степен "Доктор" по научна специалност "Физиология на животните и человека" на докторант Галина Ненкова.

8.06.2018 г.

София

Рецензент



проф. Р. Замфирова