

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Радостина Ивайлова Александрова, доктор (секция „Патология”, Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей – БАН) - член на Научно жури съгласно заповед № 32/ 22.02.2022 г. на Директора на Института по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ – Българска академия на науките (ИБИР-БАН)

Относно дисертационен труд на тема: „Влияние на новосинтезирани вещества от групата на метилксантините върху функционални показатели на мъжки гамети преди и след криоконсервация”

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 („Физиология на животните и човека“, шифър 01.06.17)

на докторанта Пламена Ангелова Ставрева, Институт по биология и имунология на размножаването – Българска академия на науките, София, България;

с научен ръководител: проф. дбн Пламен Тодоров, Институт по биология и имунология на размножаването – Българска академия на науките, София, България

### **1. Актуалност и значимост на дисертационния труд**

Безплодието е едно от водещите здравни и социални предизвикателства на нашето време. По данни на Световната здравна организация то засяга милиони хора в репродуктивна възраст по целия свят – според прогнозите става дума за между 48 милиона двойки и 186 милиона индивиди. Сред водещите причини за безплодие от страна на мъжката репродуктивна система е наличието на проблеми с движението (мотилитета) на сперматозоидите. Прилагането на методи за асистирана репродукция позволява използването на вещества, които стимулират подвижността на мъжките гамети в процеса на тяхната обработка. Това е особено важно в случаите на астенозооспермични еякулати, замразена семенна течност (в процеса на криоконсервация част от гаметите губят подвижността си) или използването на тестикуларни сперматозоиди, получени чрез микрохирургични техники.

В клиничната практика за подобряване на подвижността на сперматозоидите се използват метилксантините пентоксифилин и теофилин, които потискат фосфодиестераза и повишават нивата на вътреклетъчния цикличен аденозинмонофосфат. Данните за тях обаче са противоречиви. Така например, за пентоксифилина (РТХ) е съобщено, че намалява супероксидните аниони и инхибира тумор-некротичния фактор-алфа (TNF-алфа), отговорен за фрагментацията на ДНК и апоптозата, стимулира подвижността на сперматозоидите и подобрява оплождането. От друга страна има доклади за неблагоприятните му ефекти върху функцията на сперматозоидите и ранното развитие на ембрионите, което поражда необходимостта от намиране на алтернативни молекули с подобрени в желаната от нас посока свойства,

включително от групата на метилксантините. Именно това обуславя актуалността на представения дисертационен труд, който е насочен към изследване на влиянието на новосинтезирани вещества от групата на метилксантините върху функционални показатели на мъжки гамети преди и след криоконсервация.

Темата е в съответствие с целите на Националната програма за Развитие на научните изследвания в Република България 2017-2013, както и с приоритетите на 9-та Рамкова програма за изследвания и иновации, известна като Хоризонт Европа (2021-2027).

## **2. Преглед на дисертационния труд**

Дисертационният труд е написан на 82 страници и включва: Заглавна страница (1 стр.), Списък на използвани съкращения (1 стр.), Съдържание (3 стр.), Увод (1 стр.), Литературен обзор (23 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (17 стр.), Резултати и обсъждане (20 стр.), Заключение (2 стр.) Изводи (1 стр.), Списък на използвана литература (10 стр.), Списък на публикации по темата на дисертацията и представяне на резултатите на научни форуми (1 стр.). Включено е и приложение, представящо номенклатурата (терминологията), свързана с качеството на семенната течност и бланка за спермограма (2 стр.). Дисертационният труд е илюстриран с 6 таблици и 22 цветни или черно-бели фигури с високо качество.

В **Увода** докторантката представя в стегната форма значението на проблема, мотивите, които са я стимулирали да се насочи към темата на дисертационния труд.

**Литературният обзор** включва 4 основни раздела, в които последователно са разгледани: Състава и физиологията на семенната течност, подходите за криоконсервация, стимулаторите на мотилитета на сперматозоидите – както физически въздействия, така и химични вещества и биологични субстанции. В последната част специално внимание е отделено на използването на вещества от групата на метилксантините в ролята на стимулатори на подвижността на гаметите. Обсъдени са техни известни представители (кофеин, теофилин, пентоксифилин, бенафилин, етафилин и др.), механизма на действието им, наличните в достъпната литература данни за биологичната им активност.

Обзорът е написан на високо професионално ниво и предлага съвременен преглед на научната информация по засегнатите теми, чете се с лекота и представлява интерес за всички студенти и специалисти с интереси в областта на физиологията на животните и човека, ембриологията и репродуктивното здраве. Той доказва отличната обща и специална медикобиологична подготовка на докторантката, уменията ѝ да систематизира и популяризира научни данни. Текстът е сполучливо илюстриран с 5 фигури и 1 таблица.

**Целта** на дисертационния труд и произтичащите от нея **задачи** (6 на брой) са ясно и точно формулирани. Пристъпвайки към подготовката на дисертацията, докторантът и научният ръководител имат избистрена стратегия, а червената нишка на водещата идея свързва в единно цяло отделните етапи от изработването и оформянето ѝ.

В Раздел **Материали и методи** е представена информация за експерименталната подготовка на проучването. За осъществяването му е използвана семенна течност от пациенти, включени в програмите за асистирана репродукция в АГ МЦ Димитров и АГ



Болница „Селена“ – Пловдив, както и от анонимни донори. За оценяване на въздействието на изпитваните новосинтезирани метилксантини върху оплождането и развитието на получените предимплантационни ембриони са използвани донорни яйцеклетки. Провеждането на изследванията е станало при спазване на етичните норми – подписване на информационно съгласие от страна на участниците и получаване на разрешение от локалния комитет по медицинска етика към болница „Селена“.

Изследваните новосинтезирани метилксантини (общо 9 на брой) са предоставени от специалисти в Катедрата по неорганична химия на Фармацевтичния факултет към Медицинския университет в София. Влиянието им върху биологичната активност на човешки сперматозоиди е сравнено с това на пентоксифилина – използван в клиничната практика метилксантин.

Приложените материали и методи са съвременни и напълно отговарят на поставените цели и задачи. Авторката посочва използваните апаратура, консумативи, хранителни среди и химикали. Методите са описани достатъчно подробно, което прави възможно тяхното възпроизвеждане. Става дума не просто за изброяване на последователност от стъпки, а своеобразно ръководство за действие, съдържащо ценни обяснения и препоръки - това илюстрира отличната практическа подготовка на докторантката, доказва, че е „вряла и кипяла“ в изпълнението на експериментите. Разделът е илюстриран с 6 фигури.

**Резултатите** следват хода на поставените цели и задачи. Те са подробно представени и отлично онагледени чрез 5 таблици и 11 фигури с високо качество, които улесняват възприемането им.

Проучването е проведено в няколко последователни етапа.

През първия етап са сравнени биологичните характеристики на новосинтезираните метилксантини по отношение на разтворимостта им в средите за култивиране, токсичността им, влиянието им върху подвижността на гаметите. Така са избраните най-подходящите за осъществяването на следващите стъпки от проучването вещества.

До следващите етапи на проучването са допуснати 4 от метилксантините. Останалите 5 са отпаднали по технически причини – неразтворимост в средите за инкубиране на сперматозоиди. Допълнителни проучвания върху въздействието на тези метилксантини върху подвижността на гаметите са стеснили списъка на избраните вещества до две от тях – T-1 и N-61, които са изследвани заедно с пентоксифилина в ролята на своеобразна контрола.

По време на втория етап е получена информация за въздействието на метилксантините върху сперматозоиди в нативна и криоконсервирана семенна течност. Изследването на семенната течност е първото и задължително условие в андрологичната практика, тъй като предоставя важна информация за цитогенната функция на тестисите и секреторната дейност на акцесорните полови жлези.

В третата серия експерименти е проследено влиянието на метилксантините върху селектирани нормокинетични гамети.

В последния етап е изследвано влиянието на метилксантините върху оплодителната способност на сперматозоидите и развитието и качеството на получените ембриони.

При провеждане на проучването са използвани 130 еякулата от 79 мъже на възраст от 27 до 43 години (класифицирани въз основа на спермалните изследвания като такива с нормозооспермия – 60 броя, астенозооспермия – 37 броя, олигозооспермия – 7 броя, олигоастенозооспермия – 15 броя и левкоцитоспермия – 11 броя) и 18 дози замразена донорна семенна течност.

Не е наблюдавано отрицателно въздействие на изпитваните метилксантини върху биологичните показатели на сперматозоидите в условията на проведените експерименти (инкубация до 24 часа).

Стимулиращ ефект на изпитваните вещества е наблюдаван не само в случаите на нормозооспермия, но и при астенозооспермия.

Изследваните метилксантини неувреждат структурата на ДНК на мъжките гамети – предположението е направено въз основа на липсата на разлика в нивата на фрагментация на сперматозоидите от опитната и контролната група.

Не е наблюдавано влияние на тестираните вещества върху способността на сперматозоидите да се свързват с хиалуронан – събитие, което бележи успешното завършване на спермиогенните събития, опосредствани от шаперона HspA2.

Получените резултати (като % оплождане и ембриони, развиващи се до стадий бластоцист – над 40%) са сходни с клиничните данни на медицинския център през последните години и съответстват на критериите за добра лабораторна практика.

Третирането на мъжките гамети с новосинтезираните метилксантини T-1 и N-61 не оказва влияние върху оплодителната им способност и качеството на получените ембриони.

Резултатите са аналитично и критично обсъдени в светлината на известните до момента от литературни данни. В хода на работата докторантката не спира да задава въпроси, а намирането на отговори се превръща в отправна точка за нови питання.

Обсъждането на получените резултати безспорно е най-сериозното изпитание за зрелостта на докторанта и умението му не просто да трупа информация, а активно да използва придобитите нови знания. Смятам, че Пламена Ставрева успешно е преминала през това предизвикателство, което на свой ред свидетелства за отлично изпълнената обучителна работа от страна на научния ѝ ръководител.

Направените **изводи** (6 на брой) напълно отговарят на получените резултати и са в съответствие с поставените цели и задачи.

Списъкът на **цитираната литература** включва 110 източника, един от които е на кирилица, а останалите са на латиница. От посочените заглавия 36 (32%) са публикувани през последните 5 години.

**Заключението** обобщава постигнатите резултати и отваря вратата към бъдещи проучвания, които ще помогнат за изясняването на въпроса дали и каква роля биха могли да играят изпитваните новосинтезирани съединения от групата на метилксантите в протоколите за асистирана репродукция.

Добро впечатление правят (само)критичният дух и чувството за реализъм, които струят от дисертационния труд – те потвърждават високия професионализъм на докторанта и научния ръководител, чувството им за отговорност, стремежът им да дадат най-доброто от себе си и да се стремят към усъвършенстване на постигнатото.

### **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 заключения.

### **4. Публикации на докторанта по темата на дисертационния труд**

По темата на дисертационния труд са публикувани две статии: едната е в сборник от научен форум (Годишник на СУ „Св. Кл. Охридски“; втората, на която П. Ставрева е първи автор, е приета за печат в списание „Доклади на Българска академия на науките“

– международно списание списания, което се реферира и индексира в Scopus (с импакт фактор и квартил Q2). Резултатите са представени на два научни форума в България – международна конференция и национален конгрес по стерилитет и репродуктивно здраве с международно участие.

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

Нямам забележки по същество.

Забелязах някои дребни технически грешки (погрешно написани буквички, запетайки). Фиг. 23 е таблица.

Препоръката ми е да бъдат добавени имената на специалистите от Фармацевтичния факултет на Медицинския университет в София, които са осъществили синтеза на изпитваните метилксантини.

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

**Към докторанта имам следните въпроси:**

- В каква посока трябва да продължат проучванията върху изпитваните съединения, за да намерим отговор на въпроса за евентуалното им прилагане в клиничната практика?
- Предвиден ли е синтез на нови представители на метилксантините?

## **6. Автобиографични данни**

Пламена Ставрева е завършила паралелка с английски и руски език в езиковата гимназия „Иван Вазов“ в град Пловдив, след което ПУ „Паисий Хилендарски“, където придобива ОКС „Бакалавър“ по „Биотехнологична микробиология“ и ОКС „Магистър“ по „Молекулярна биология и биотехнология“. Притежава и ОКС по „Корпоративен бизнес и управление“ от Икономическия университет във Варна. От ноември 2012 г. работи като ембриолог в Ин витро сектора на СБАЛАГ „Селена“ в Пловдив.

## **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.

За пръв път са получени данни за биологичната активност на две новосинтезирани съединения от групата на метилксантините с оглед на евентуалното им приложение за нуждите на асистираната репродукция. Установено е, че те повишават подвижността и преживяемостта на мъжките гамети, без да засягат други техни функционални показатели (цялост на ДНК, прикрепване към хиалуронан, оплодителна способност). С това е поставена първата крачка към допълнителни изследвания (които не са обект на представения дисертационен труд), които биха изяснили възможността за използването на тези вещества в клиничната практика. Получените данни и особено анализирането на зависимостта между състава / структурата на веществата от една страна и биологичната им активност от друга, ще допринесе за създаването на нови молекули с подобрени в желаната от нас посока свойства.



Получените оригинални резултати са принос в областта на физиологията на животните и човека, клетъчната биология, експерименталната фармакология и репродуктивната медицина.

В хода на подготовката, докторантката Пламена Ставрева е усъвършенствала своята своята биомедицинска подготовка, приложила е богат набор от разнообразни съвременни методи и техники, израснала е като специалист. И най-важното: получените при изпълнението на дисертационния труд нови резултати ще допринесат за решаването на едно от най-парещите биомедицински и социални (демографски) предизвикателства на нашето време – проблемите с безплодието и необходимостта от непрекъснато усъвършенстване на подходите/техниките в програмите за асистирана репродукция. Положенията 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 СУ „Св. Кл. Охридски“, за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“. Убедено давам своята положителна оценка и препоръчвам на членовете на Уважаемото Научно жури да присъдят на Пламена Ставрева образователната и научна степен „Доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки („Физиология на животните и човека“, шифър 01.06.17).

12 април 2022 г.



.....  
/Проф. Р. Александрова/