

РЕЦЕНЗИЯ

Изготвена от: проф. Пламен Тодоров, дбн, зав. секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите“ към Институт по биология и имунология на размножаването – БАН

Относно: Дисертация на тема „Роля на семенната плазма и биологично активни вещества с цел разработване на нова технология за криоконсервация на сперма от кучета“, представена от Кирил Йорданов Лазов, за присъждане на образователната и научна степен „доктор“, в област на висше образование „Аграрни науки и ветеринарна медицина“, научно направление „Животновъдство“, специалност „Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването“.

Информация по процедурата: Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита по предложение на секция „Имуноневроендокринология“ към ИБИР-БАН. Процедурата е приета и журито е утвърдено на Научен съвет на ИБИР и назначено със Заповед 140/19.12.2023 г. на Директора на ИБИР. Представени са всички необходими документи, свързани с докторантурата. Считаю, че законовите изисквания са спазени.

Следва да се отбележи, че докторантът е зачислен преди промените в ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение през 2018г., така че част от изискванията на тези документи не се отнасят към конкретния дисертационен труд.

Кратки биографични данни на кандидата: Кирил Йорданов Лазов е роден през 1982г. в г. Благоевград. Получава висшето си образование във Ветеринарномедицинския факултет към Тракийския университет, където през 2007г. се дипломира като магистър ветеринарен лекар. От 2016 г. е зачислена като докторант редовна форма на обучение в ИБИР-БАН. Отчислен е през 2019 г. с право на защита. Семеен, с едно дете.

Личните ми впечатления от кандидата са положителни. Смяя да твърдя, че Кирил Лазов е квалифициран учен, владеещ съвременни методи за изследване и работа с гамети и криоконсервация на биологични обекти. Ползва се с уважение от колегите, с които работи.

Актуалност на дисертационната тема: Криоконсервацията на гамети и ембриони е съвременна биотехнология, позволяваща запазване на генетичния материал за неограничен период от време. Методът намира все по-широко приложение в медицината и при някои

видове селскостопански животни. Интерес представлява възможността за използването му при домашни любимци – кучета и котки. Има данни, че сперматозоидите от куче са сравнително устойчиви към въздействието на ниските температури, но независимо от това все още няма разработена ефективна техника за тяхното замразяване, която да е намерила приложение във ветеринарната практика. Това е свързано преди всичко с видовите особености на еякулата, липсата на готови среди за криоконсервация, както и някои неясноти в чисто научен аспект – оптимизиране на концентрациите на използваните криопротектори, избор на метод за криоконсервация (бавно замразяване или витрификация), изследване възможността за добавяне в средите на вещества, редуциращи оксидативния стрес и др. Немаловажен е и въпросът за ролята на семенната плазма в процеса на криоконсервация, нужно ли е да се отделя преди замразяване. Знае се, че съдържащите се в нея захари, липиди и др. вещества стабилизират клетъчната мембрана на сперматозоидите. Това прави изследванията в тази област особено актуални, тъй като разработката на ефективен метод за криоконсервация на сперма от куче и изкуствено осеменяване би помогнала за подобряване на развъдната дейност, транспорта на семенна течност, запазване генофонда на ценни породи. Проучванията върху сперматозоиди от домашно куче могат да служат като модел за разработване на протоколи за замразяване на семенна течност на някои застрашени и изчезващи видове. Във връзка с това считам, че темата на представения ми за рецензиране дисертационен труд е актуална както в научен, така и в чисто практически аспект.

Анализ и оценка на дисертационния труд

Структура: Дисертационният труд е написан на 127 печатни страници и структуриран, както следва: Увод – 2 стр., Литературен обзор – 42 стр., Цел и Задачи – 1 стр., Материал и методи – 19 стр., Резултати и дискусия – 27 стр., Заключение – 1 стр., Изводи – 1 стр., Приноси – 1 стр., Списък на използваната литература – 20 стр., Приложения – 3 стр. и Списък на публикации и участия в научни форуми във връзка с дисертацията – 2 стр. Структурата на дисертацията съответства на общоприетите изисквания и е онагледена с 29 фигури и 2 таблици.

Увод: В увода кандидатът разглежда актуалността на проблема, като обосновава необходимостта от провеждането на проучванията, залегнали в основата на дисертационния труд.

Литературен обзор: Обзорът е обширен, като обхваща различни аспекти на проблема и дава информация, която обслужва избраната научна тема. Съставен е от няколко подраздела. Авторът представя доста подробна информация относно факторите, влияещи на биологичните обекти в процеса на криоконсервация и подходите за защита от криогенни увреждания – избор на подходяща скорост на замразяване и размразяване, използване на криопротектори. Специално внимание е отделено на замразяването чрез витрификация. Описани са различните видове криопротектори (проникващи и непроникващи) и механизма им на действие. Разгледано е и действието на някои биологично активни вещества (антиоксиданти и витамини) и възможността за използването им при криоконсервация.

Логично, изхождайки от темата на дисертационния труд, е представена информация за устройството и физиологията на сперматозоидите и методите за оценка на семенна течност. В исторически аспект е разгледано развитието и приложението на технологията за криоконсервация на сперма от куче, като особено внимание е обърнато на нерешените проблеми.

Обзорът е онагледен с 2 подходящи фигури и 1 таблица, което го прави по-разбираем и лек за възприемане. Въз основа на набелязаните в обзора проблеми, авторът обосновава целта и задачите на настоящата дисертация.

Цел и задачи: Целта на дисертационния труд е да се проучи ролята на семенната плазма и възможността за комбинираното прилагане на биологични активни вещества: витамини А, Д3 и Е върху основни параметри на сперматозоиди от куче в процеса на криоконсервация. За изпълнение на поставената цел авторът разработва 6 **задачи**, които са достатъчно ясно и точно формулирани.

Материали и методи: Изследванията са проведени на базата на ИБИР-БАН. Като изследователски материал са използвани 80 еякулата от различни породи кучета на възраст от 2 до 12 години – достатъчно голям брой, за да се изведат статистически закономерности при обработката на получените резултати.

Методиките са описани ясно и подробно, което позволява възпроизвеждане на експериментите. Резултатите са получени с помощта на съвременни изследователски техники – компютърен спермоанализ (CASA), молекулно - ситова високоефективна течна хроматография (HPLC), полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE), биохимични методи за изследване на ензимна активност. Използването на модерна апаратура и среди и консумативи на водещи фирми-производители гарантира достоверността на получените резултати.

Не буди съмнение личното участие и принос на автора в експериментите. В това отношение ясно личи, че докторантът е усвоил и успешно прилага редица методи.

Резултати и дискусия: Получените от автора резултати най-общо могат да се разделят в няколко групи, съответстващи на поставените задачи.

В резултат на сравнителен HPLC анализ на семиналноплазмени белтъци при еякулатите с добри спермални параметри и такива с влошени авторът установява 4 основни пика. Основното различие в профилите е наличието на белтъчни молекули с по-висока молекулна маса в спермалната плазма на еякулатите със задоволителни характеристики. В резултат на електрофоретично изследване тези белтъци са визуализирани и се установяват високомолекулни такива с маса над 65 kDa. При еякулати с лошо качество се наблюдава ниска интензивност на визуализация на първия пик, т.е. намалява активността на високомолекулните протеини с тегло между 65 kDa и 216 kDa.

Чрез биохимични изследвания дисертантът показва, че криоконсервацията не оказва негативно влияние върху активността на трите ензима /АФ, креатинкиназа и ЛДХ / в семенната плазма. За първи път при кучето е проследена взаимовръзката между качеството на гаметите съдържанието на ензима креатинкиназа в семенната течност.

В резултат на сравнителни експерименти е установено, че е по-подходящо криоконсервацията на сперма от куче да се извършва без предварително отделяне на спермалната плазма, т.е. да се замразява цял еякулат, а не „отмити“ от плазмата сперматозоиди. Авторът прави обосновано предположение, че това може да се дължи както на защитния ефект на съдържащите се в плазмата вещества, които стабилизират мембраната на гаметите, така и на увреждания, свързани със самото центрофугиране на семенната течност преди замразяване.

По отношение на ролята на биологично-активни вещества в процеса на криоконсервация, е показано, че добавянето на витамин Е, холекалциферол и витамин А към средите за замразяване има положителен ефект.

В чисто технологичен аспект (което е важно и от практическа гледна точка), е показано, че двустепенно разреждане на семенната течност преди замразяване води до по-добро запазване на кинетичните параметри на гаметите. Установено е, че еквилибрацията с глицерин за период от 20 минути е достатъчна за изравняване на разреждателя. Замразяването на големи обеми от 3 мл е възможно без да се предизвиква настъпване на по-интензивни криогенни увреждания над мъжките гамети.

По отношение на размразяването авторът установява, че най-подходящ режим за размразяване на сперма от куче, замразена в обем от 0.6мл в криовиалки е температура от 65°C до изчезване на твърдата фаза, с последваща инкубация във водна баня 40°C за 3 до 5 минути.

Резултатите са подкрепени с адекватно избран доказателствен материал. Снимките са с високо качество. Приятно впечатление прави отличната статистическа обработка и представянето на резултатите. Кандидатът е показал умение не само да тълкува собствените резултати, но и да ги съпоставя с данните, получени от други автори, което свидетелства за отлично познаване на материала.

Считам, че резултатите са оригинални и не може да става дума за каквато и да било форма на плагиатство. Към документите има и приложена справка, че дисертационният труд е проверен за плагиатство с помощта на специализиран софтуер и такова не е установено.

Изводи и приноси: От извършените изследвания са изведени 7 извода, които приемам, и са формулирани 6 приноса (2 с научен характер и 4 практически). Изводите коректно отразяват получените резултати.

Литература: Приложен е библиографски списък от 219 заглавия, от които 212 на латиница 4 на кирилица и 3 линка. 25 от източниците са от последните 5 години. Те са цитирани коректно там, където трябва, съобразно задачите на дисертационния труд.

Публикации във връзка с дисертационния труд: Кандидатът е представил 3 публикации във връзка с дисертационния труд, с което покрива минималните национални изисквания

за придобиване на образователната и научна степен доктор съгласно ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение. В две от тях Кирил Лазов е водещ автор, което е индикация за активното и участие в проведените изследвания. Резултатите са представени и на четири научни форума под формата на постери и доклади.

Автореферат: Авторефератът (40 страници) е изготвен съгласно изискванията и отразява всички основни резултати и приноси на дисертационния труд.

Забележки към дисертационния труд:

Литературният обзор, независимо че дава достатъчно информация по темата, не е добре структуриран (отделните подраздели не са подредени в логична последователност). Замразяването чрез витрификация е подробно описано (цял подраздел), докато методите за криоконсервация на парите на азота или чрез програмно замразяване са по-слабо застъпени.

В материал и методи има някои неточности или излишни подробности (например „еякулати от мъжки кучета“, ясно е, че няма как да са от женски). Даден е броят на използваните еякулати, но не и броят на кучетата, от които са получени. Това е важно с оглед да се проследят индивидуалните различия в спермата на различните разплодници.

Макар да отразяват получените резултати, някои от изводите не са точно формулирани. Извод 1 не е достатъчно конкретен и има по-скоро „описателен“ характер. В извод 5 е използвано словосъчетанието „в известна степен води до подобряване...“, което не е уместно.

В библиографската справка източниците не са еднотипно сформулирани, някои са непълни (дадени са само автори, без заглавие на статията и списание). Фигурират 3 линка, два от които не се отварят, а третият пренасочва към книга, която неизвестно защо не е цитирана със заглавие и автори. Не считам, че е редно да се цитират дисертации (има две такива), към които не е дадена никаква връзка и са непроследими.

Имам и някои чисто технически забележки. На места има правописни грешки. Приносите също би следвало да бъдат по-точно и стилистически правилно сформулирани.

Следва да се отбележи, че направените от мен критични бележки не са съществени и не омаловажават достойнствата на представения ми за рецензия труд, поради което цялостната ми оценка за дисертацията е положителна.

Заключение: Представеният дисертационен труд на Кирил Йорданов Лазов е актуален от научна и практическа гледна точка. Налице е добър баланс в структурата между отделните части на научния труд, с превалиране на обема на научните резултати и тяхното обсъждане. В тази връзка, достойнствата на дисертационния труд и изпълнените изисквания за необходимите количествени и качествени критерии, ми дават основание да предложа на уважаемите членове на научното жури да присъдят на Кирил Лазов научната и образователна степен „ДОКТОР” по специалност „Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването“.

Дата: 19.02.2024г.

Изготвил рецензията:



/проф., дбн Пламен Тодоров/