

РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационен труд на тема:

„Определяне на спермално плазмени протеини, свързани с процеса на капацитация”

за присъждане на образователна и научна степен **„ДОКТОР”**
по шифър 04.02.01 „Развъждане на селскостопански животни, биология и биотехника на размножаването”, професионално направление 6.3. „Животновъдство”, област на висше образование 6. „Аграрни науки и ветеринарна медицина”.

Автор на дисертационния труд: Цветан Стефанов Цветков - докторант в секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите“, Институт по Биология и Имунология на Размножаването „Акад. Кирил Братанов“, БАН, София.

Рецензент: доц. д-р Теодора Гичева Данева, секция “Имунобиология на репродукцията”, Институт по Биология и Имунология на Размножаването „Акад. Кирил Братанов“, БАН, София.

Представеният за рецензия дисертационен труд е изработен в съответствие със Закона за развитие на академичния състав на Република България и Правилника за прилагането му. Дисертацията е написана на 141 стандартни страници и е онагледена с 34 фигури и 14 таблици. Работата е добре структурирана, с правилни пропорции между отделните раздели: Увод – 1 стр., Литературен обзор – 37 стр., Цел и задачи -2 стр., Материал и методи – 22 стр., Резултати и обсъждане – 36 стр., Изводи – 1 стр., Приноси и предложения за внедряване в практиката– 1 стр., Литература – 34 стр. Библиографската справка съдържа 329 литературни източника. Публикувани са 3 статии, свързани с работата и е докладвана на 11 научни форума, от които 4 международни. Структурата на дисертацията свидетелства за уменията на докторанта да анализира, систематизира, прецизира и обяснява научните данни и получените

от него резултати. При разработката на настоящия дисертационен труд е използван биологичен материал от *Canis lupus familiaris* (домашно куче).

Значимост на дисертационния труд

Изработеният дисертационен труд, предоставен ми от докторант Цветан Цветков на тема: „Определяне на семинално плазмени протеини, свързани с процеса на капацитация“, е обоснован от необходимостта за допълване на данните за ролята и ефекта на семинално плазмените протеини и тяхната роля в различни процеси с цел подобряване оплодителната способност на сперматозоидите, което е едно от съвременните предизвикателства на репродуктивните биотехнологии.

Методите за селекция и подобряване оплодителната способност на сперматозоидите от десетилетия представляват интерес. Прилагането им при развъждането на селскостопанските животни, декоративните домашни любимци и в асистираната репродукция при човека налага все по-задълбочено изучаване ролята, функцията и състава на семиналната плазма.

Максималното съхранение на жизнения и оплодителния потенциал на сперматозоидите и по-специално факторите, влияещи върху капацитацията и декапацитацията, хиперактивацията, преживяемостта и придвижването им в женските полови пътища, акрозомната реакция, пенетрацията са от съществено значение за успеха при оплождането *in vitro*. В това отношение влиянието и ефекта на някои спермално плазмени протеини върху жизнените и оплодителните качества на сперматозоидите представляват интерес за изследване като фактори, играещи роля за биологичните параметри на сперматозоидите. Спермалната плазма е сложна хетерогенна смес, чиято основна функция е защита и подпомагане на сперматозоидите при придвижването им в женския репродуктивен тракт и при оплождането. Равновесието между капацитиращи и декапацитиращи фактори, фактори стимулиращи и инхибиращи акрозомната реакция или активирането им в точния момент е от съществено значение за успешното оплождане. Търсят се спермално плазмени протеини, които биха могли да служат като маркери за оценка на оплодителните способности. Установени са протеини, имащи отношение към плодовитостта при бикове, жребци и нерези. Един от тях е остеопонтин. Независимо от многобройните данни все още има нужда от охарактеризиране на

спермално плазмените протеини и обогатяване на данните. Информацията за състава и биологичната роля на спермалната плазма и спермално плазмени протеини все още има много неизвестни. Липсата на достатъчно данни води до необходимост от още проучвания с цел охарактеризиране природата на тези молекули и ефектите, които оказват влияние върху различни физиологични процеси, засягащи метаболизма и оплодителната способност на сперматозоидите. Те биха могли да се използват в диагностиката не само при кучета, но и при човека.

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изследва ролята на спермално плазмените протеини за капацитацията и декапацитацията на сперматозоиди от куче при *in vitro* условия с оглед повишаване ефективността и успеваемостта при репродуктивните биотехнологии, както и допълване на фундаменталните знания за ролята на спермално плазмените протеини.

За постигане на поставената цел са формулирани и изпълнени 4 задачи с 9 подзадачи.

Характеристика на дисертацията и оценка на резултатите

Уводът е написан кратко и ясно, като е насочен към целта на изследванията. Литературният обзор е богат и обхваща 139 литературни източника от последните години. Представява многостранен и задълбочен съдържателен анализ на достъпната литература. Представя данни от публикувани чужди и български изследвания, както и все още недокрай изяснени аспекти. Обзорът представя автора като отлично информиран и задълбочен изследовател, успял да пресее огромната информация и да я представи в обобщен вид. Показва умело анализиране на достъпните източници и представяне на спорните и все още неизяснени въпроси, което му позволява да формулира научно-обоснованата **цел на дисертационния труд да се определят спермално плазмени протеини, имащи отношение към капацитацията и декапацитацията при *in vitro* условия.**

В изпълнение на поставената от докторанта цел са направени изследвания по 4 задачи с 9 подзадачи. **Задачите** са добре дефинирани и адекватни за постигане на целта.

Разделът „**Материали и методи**” обхваща методи на работа, като Gel permeation chromatography, Компютърно Асистираният Спермален Анализ (CASA), чрез системата Sperm Class Analyzer (SCA), 2D-PAGE, SDS-PAGE и други. Методите на работа са съвременни, описани подробно, точно и ясно и онагледени със 17 фигури. Използваният биологичен материал е достатъчен за разработката на дисертационния труд.

Разделът „**Резултати и Обсъждане**” е основната част от представения проект. Включва резултатите, получени в хода на работата, подходящо представени с таблици, диаграми, графики, снимков материал и успешно анализирани. Докторантът подробно е описал получените данни, които са много добре съпоставени с научните резултати от световната литература, което убедително доказва актуалността на представените научни постижения по дисертационния труд. При хроматографско разделяне на семиналната плазма са получени 4 фракции, представляващи интерес. Фракция 1 е съставена от високомолекулни протеини (70-200kD), а фракции 2, 3 и 4 от нискомолекулни протеини (4-12kD).

Внимание заслужават направените изследвания чрез използване на Компютърно Асистирания Спермален Анализ (CASA) чрез системата Sperm Class Analyzer (SCA) относно ролята на СПП с различна молекулна маса, изолирани чрез Gel permeation chromatography върху редица CASA параметри като мотилитет, скорост и кинетични параметри. Доказано е, че настъпилите промени в curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$), straightness (STR, as VSL/VAP, %), linearity (LIN, as VSL/VCL, %); wobble of the sperm head about the average path (WOB, %) and amplitude of lateral head displacement (ALH, $\mu\text{m/s}$) са в резултат от влиянието на протеини с висока молекулна маса от 68кДа до 78кДа, които водят до хиперактивност при сперматозоиди от куче. Докторантът установява, че протеините, съдържащи се във фракция I, които са с висока молекулна маса, водят и до промени в акрозомата на сперматозоидите. Установява, че след двучасова инкубация протеините от фракция I водят до повишаване на процента сперматозоиди с набъбнала акрозома в сравнение с другите проби и контролата. Чрез 2D-електофореза докторантът е направил допълнително охарактеризиране на протеините, съдържащи се във фракция I. Установени са няколко протеина със следните характеристики: 68кДа и (изоелектрична точка) Ip 5.65; 75кДа и Ip 6.8; 76кДа и Ip 6.91; 77кДа и Ip 7.58; 78кДа и Ip 7.77). Асистент Цветан Цветков

в раздел „Резултати и Обсъждане” прави и предположение, че протеини от семинална плазма на куче, съдържащи се във фракция I, принадлежат към няколко съответни семейства протеини, които са много добре описани, след направена обстойна литературна справка. Направени са и изследвания върху протеини от спермална плазма на куче, сепарирани чрез Gel Permeation chromatography и биологична им роля като декапацитиращ фактор. От направената 2D-електрофореза се доказва, че ниско молекулни протеини със следните молекулни маси и изоелектрични точки: 9,2кДа и Ip 6,62; 15кДа и Ip 7,53; 18кДа и Ip 7,9; 21кДа и Ip 7,4; 29кДа и Ip 7,1; 30кДа и Ip 7,3; 33кДа и Ip 4,5; 33кДа и Ip 6,32; 34кДа и Ip 5,5 ; 42кДа и Ip 7,8кДа; 43кДа и Ip 7,9; 46кДа и Ip 7,4; 47кДа и Ip 7,1; 50кДа и Ip 4,6; 51кДа и Ip 9,2; 52кДа и Ip 3 оказват декапацитиращ ефект в условия на *in vitro* индуцирана капацитация върху сперматозоиди от куче. От получените резултати се установява, че ниско молекулните протеини, съдържащи се във фракция II, водят до промени на основните скоростни и кинетични CASA-параметри като VCL, ALH, WOB и BCF.

От всички изследвания личи, че проведените анализи са направени с личното участие на докторанта Цветан Цветков под ръководството на научния ръководител доцент Деница Даскалова, доктор. Използването на съвременните методи Gel permeation chromatography, CSA, 2D-електрофореза и други заедно с широк литературен обзор, който е направил докторантта, позволява да се дефинират ясно обосновани резултати.

На база получени резултати са направени **4 извода** и **1 предложение за внедряване в практиката** за използване на протеини от спермалната плазма при криоконсервация на сперма и при индуциране на капацитация или декапацитация *in vitro* с цел увеличаване успеваемостта при IVF процедурите, както и използването им като маркери за оплодителната способност при селекцията на мъжки разплодници.

Асистент Цветан Цветков е представил общо 3 публикации, свързани с дисертацията, 2 от които са в списание с импакт фактор и 1 статия без импакт фактор. На две от статиите дисертантът е първи автор.

Авторефератът е структуриран съобразно изискванията. Съдържанието му съответства на това на дисертацията.

Като забележки, които не намаляват стойността на дисертационния труд са някои допуснати повторения в литературния обзор и в раздел „Резултати и Обсъждане”. Има допуснати стилови, технически и правописни грешки, както и ползване на чуждици. Напр. вместо „бандове” е можело да използва думата „ивици”.

Препоръка

Считам, че е добре при бъдещи изследвания да се направят още допълнителни характеристики на установените протеини с ефект върху капацитацията и декапацитацията при сперматозоидите. Добре би било да се направи опит да се идентифицират чрез масспектрометрия отделните протеини в различните фракции. Доста от тях ще се окажат вече познати протеини, но може да има и нови непознати досега.

Лични впечатления

Познавам асистент Цветан Цветков от работата в Института и смея да твърдя, че е високо квалифициран и отговорен млад учен, притежаващ необходимите научни умения в областта на реродуктивната биология, с бъдеще в научната област. Винаги подхожда с необходимата отговорност, отдаденост и ентузиазъм към научната работа. Уверена съм, че усвоените от него теоретични и практически знания и умения ще са от полза за бъдещата му научна кариера.

В ЗАКЛЮЧЕНИЕ считам, че представеният проект за дисертационен труд от асистент Цветан Цветков на тема „Определяне на семинално плазмени протеини, свързани с процеса на капацитация” е едно завършено научно изследване. Въз основа на научените и приложените от докторанта различни методи на изследване, правилно проведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, което ми дава основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**. Темата е много актуална както за нашата страна, така и в международен мащаб. Докторантът е постигнал това благодарение на добрата си литературна осведоменост и комбиниране на знания и умения с подходящите методи. Всичко това и въз основа на това, че познавам научното израстване на

докторанта повече от 5 години, ми дава основание да се обърна към уважаемите членове на Научното жури с предложение на Цветан Цветков да бъде присъдена обзавателна и научна степен „Доктор” по шифър 04.02.01 „Развъждане на селскостопански животни, биология и биотехника на размножаването”, професионално направление 6.3. „Животновъдство”, област на висше образование 6. „Аграрни науки и ветеринарна медицина”.

22.02.2021г.

Гр. София

Изготвил рецензията:


/Доц. Т. Данева, доктор/