

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. Павел Рашев, ИБИР-БАН

относно: дисертационен труд на Ваня Димитрова Младенова, ИБИР-БАН

на тема: **„ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ МИТОХОНДРИАЛНИЯ СТАТУС В ЯЙЧНИЦИ И ЕПИГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ В ООЦИТИ НА СУПЕРОВУЛИРАНИ МИШКИ, ПОЛУЧАВАЛИ КОМБИНИРАНА БИОДОБАВКА“**

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“ по научна специалност **“Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването”** шифър 04.02.01., Професионално направление 6.3. – Животновъдство, Област на Висше образование 6 – Аграрни науки и ветеринарна медицина.

1. Описание на предоставените материали

Със Заповед № 89 / 16.07.2019 г. на Директора на ИБИР – БАН съм определен за член на научно жури по процедура за защита на дисертационен труд на тема: „Прочуване върху митохондриалния статус в яйчници и епигенетични маркери в ооцити на суперовулирани мишки, получавали комбинирана биодобавка“ за придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР“, Област на Висше образование 6 – Аграрни науки и ветеринарна медицина, Професионално направление 6.3. – Животновъдство, научна специалност **“Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването”** шифър 04.02.01.

Автор на дисертационния труд е Ваня Димитрова Младенова, асистент към секция „Имуноневроендокринология“, с научен ръководител доц. Елена Кузминична Кистанова. Представеният комплект документи включва: Дисертационен труд, Автореферат и Автобиография. Запознат съм и с допълнителните документи, които включват: Заповед за научно жури, Протокол № 81 от 15.07.2019 г. на НС за избор на Научно жури, Заповед и протокол от проведен разширен семинар на секция: «Имуноневроендокринология», Заповед за отчисляване с право на защита, Протокол от изпит по специалността, Сертификати от специализирани курсове – 3 бр., Удостоверение от изпит по английски език, Протокол от изпит по статистически анализ, Заповед за зачисляване, Диплома за висше образование, Оценка по кредитна система, Списък на публикациите и участията в научни мероприятия във връзка с дисертационния труд.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Ваня Младенова притежава диплома за висше образование – магистър по Обща антропология, издадена през 2014 г. от Софийски университет „Св. Климент Охридски“. Паралелно с обучението си в магистърската програма, Ваня Младенова работи в ИБИР-БАН като специалист-биолог – (2011-2014 г.). В периода 2015 – 2017 г. е докторант към секция „Имуноендокринология“ с научен ръководител доц. Елена Кистанова, а от началото на 2018 г. е асистент към секция „Имуноендокринология“ при ИБИР.

3. Структура:

Дисертационният труд е написан на 133 страници, от които: Титулна страница – 1 стр., Описателна страница за участие на авторката в национални и международни проекти – 1 стр., Посвещение – 1 стр., Благодарности – 1 стр., Използвани съкращения – 2 стр., Съдържание – 3 стр., Въведение – 1 стр., Литературен обзор - 37 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материал и методи – 21 стр., Резултати и дискусия – 41 стр., Заключение – 3 стр., Изводи - 1 стр., Приноси - 1 стр., Библиографска справка – 15 стр., Приложение 1 с информация за изпълнение на образователната програма – 3 стр.

Дисертационния труд е онагледен с 43 фигури и 17 таблици. Библиографската справка включва 242 литературни източника, от които 239 на латиница.

4. Въведение

В уводната част, докторантката акцентира върху необходимостта от създаването на технологии за стимулиране на фертилитета и за преодоляване на нарушенията му, както за нуждите на селското стопанство, така и за решаване на част от проблемите на демографската криза. Получаването на голямо количество качествени ооцити, в резултат на суперовулация, сериозно увеличава вероятността за успех на ин витро оплождането и последващия ембриотрансфер. Това дава основание на докторантката да насочи своето внимание върху изследване влиянието на диета с комбинирана биодобавка, съдържаща витамин Е, минерали и фитогенен компонент, върху митохондриалния статус на яйчниците, върху успеха на супреовулацията, и върху качеството на овулирани ооцити при половозрели женски мишки, третирани със стандартния протокол за суперовулация.

5. Литературен обзор

Този раздел е всеобхватен, правилно структуриран, илюстриран с 8 фигури и 3 таблици и може условно да се раздели на 3 части.

Литературният обзор започва с подробно описание на анатомичните и функционалните особености на половия апарат при мишки, процесите на оогенеза и фоликулогенеза и хормоналната регулация на тези процеси. Докторантката обръща внимание на някои от факторите, които могат да повлияят репродуктивния процес и получаването на по-голям брой ооцити, каквито са хормонално-индуцирана суперовулация и влияние на биологично активни вещества върху фоликулгенезата и успеха на суперовулацията.

Във втората част на литературния обзор е отделено внимание на структурата и функцията на митохондриите, като основен източник на АТР, сАМР (които се явява като вторичен посредник за много гонадотропни действия в яйчника) и източник на ензимен комплекс, чиято функция е да раздели страничната верига на холестерола, необходим за синтеза на прегненолон. Представени са данни за ключовата роля на митохондриите за успешното развитие и компетентност на ооцитите и за промените в митохондриалния статус под влиянието на биологично активни добавки.

В края на обзора, докторантката акцентира върху епигенетичните промени по време на оогенезата и фоликулогенезата в резултат на участието на DNMTase, както и влиянието на храната върху епигенетичните промени. В края на раздела, са представени подробни данни относно състава и хранителната стойност на биодобавката Провит Е10% Супер.

6. Работни хипотези, цел и задачи

Въз основа на анализът на изследванията по проблема, докторантката формулира своите работни хипотези:

- Богатата на антиоксиданти хранителна добавка може да подобри митохондриалния статус и да повлияе върху качеството на ооцитите.
- Генната активност на ДНК-метилтрансферазите може да се използва като прогностичен маркер за епигенетичната зрелост на ооцитите.

Целта е ясно дефинирана и отразена в заглавието. За реализирането и са поставени 3 задачи.

7. Материали и методи

Обект на научните изследвания са мишки от линията BALB/c, които са отглеждани във вивариума на ИБИР-БАН. Спазени са всички национални нормативни изисквания, свързани с отглеждането и използването на лабораторни животни за експериментални цели. Експериментите са проведени с 45 броя половозрели мишки на 90 дневна възраст, разпределени в три групи – една контролна и две опитни. В края на експеримента е

изолиран репродуктивния апарат и са проведени морфометрични, хистологични, имунохистохимични и молекулярно-биологични методи: аспириране на незрели и събиране на овулирани ооцити; оцветяване с хематоксилин и еозин за оценка на фоликулогенезата в яйчници и успеха на суперовулацията; двустъпков имунопероксидазен метод за определяне локализацията на митохондриално кодирана NADH дехидрогеназа 1 (MT-ND1), хроматографски анализ с масспектрална детекция, qRT-PCR за определяне на генна експресия на Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b. Броят копия митохондриална ДНК е определен чрез съотношението между експресията на цитохром В (като митохондриално кодиран ген) и бета-актин (като ядренокодиран ген). Използван е богат набор от статистически методи, за доказване на достоверността на резултатите и вариациите между групите.

Описанието на опитните постановки е изчерпателно и добре илюстрирано с подходящи схеми (10 бр.) и таблици (8 бр.), което показва много добра методическа подготовка на докторантката.

8. Резултати и дискусия

В този раздел, докторантката умело анализира и интерпретира получените резултати. Резултатите са научно издържани и представени в съответствие с поставените задачи, макар и да не следват същата подредба. Резултатите са представени с помощта на 25 фигури и 6 таблици. Добре е съчетано графичното и таблично представяне на резултатите и статистическия анализ.

Дискусията е адекватна и се базира на получените резултати. Прави добро впечатление уменията на докторантката да съпоставя и дискутира своите резултати с тези на други автори, което показва висок професионализъм.

От особен интерес и с научен характер са резултатите за динамиката в протеиновата локализация на MT-ND1. Резултатите показват наличие на реакция за MT-ND1 във всички яйчникови структури. Докато при контролната група, локализацията на MT-ND1 е ограничена основно в гранулозните и тека клетките и по-слабо в ооцита до стадий антрален фоликул, то при опитните групи реакцията се засилва в тека клетките и ооцита още на стадий вторичен фоликул и намалява в гранулозните и кумулусните клетки. В опитната групата с изхранвана добавка, се наблюдава увеличаване интензитета на имунохистохимичната реакция за MT-ND1 в интерстциалните клетки (заобикалящи развиващите се първични фоликули) и в ооцитите, а в гранулозните клетки тя е много слаба.

Интригуващи са и резултатите относно промяната на броя копия mtDNA в отделните яйчникови структури и динамиката на генна експресия на изследваните ДНК-метилтрансферази. Наблюдава се тенденция за увеличаване броя копия mtDNA в кумулсните клетки на третираните с добавка животни в сравнение с нетретираните (I-ва група), съчетана с най-ниска експресия на митохондриален протеин MT-ND1 в тези клетки. Докато генна активност за Dnmt1 е най-висока в ооцити от контролната група и достоверно по-ниска в опитните групи, то mt-Dnmt1 е с достоверно по-високи стойности при третираната с добавка опитна група в сравнение с контролната. За Dnmt3a и Dnmt3b се наблюдава тенденция за повишаване на генната активност в ооцити, изолирани от опитните групи. Достоверно по-високи стойности са отчетени за Dnmt3a в нетретираната с добавка опитна група в сравнение с контролната група.

9. Изводи и приноси

На базата на резултатите и дискусиата са обобщени 6 извода и 5 приноса с научно-приложен характер, които са ясни и логично представени.

10. Наукометрични показатели

Във връзка с темата на дисертационния труд са представени 3 публикации в които докторантката е водещ автор. И трите статии са в български списания с научно рецензиране, а едното от тях се реферира в световната база данни. Резултатите от извършените експерименти са докладвани на 2 национални и 3 с международно участие научни форуми.

11. Автореферат

Авторефератът следва структурата на дисертационния труд и отразява най-важните резултати в него. Написан е на 37 страници и включва 26 фигури и 7 таблици.

12. Критични бележки и препоръки

По отношение на дисертационния труд нямам критични забележки. В текста се срещат някои стилски и граматични неточности. Бих препоръчал на докторантката да засили колаборативната работа с колеги от другите секции, както и със научни групи извън ИБИР.

Заклучение

В заключение считам, че предоставеният ми за рецензия дисертационен труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос за науката и практиката. Той отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилникът за неговото прилагане и Специфичните изисквания за научната степен «Доктор» на ИБИР-БАН.

Всичко това ми дава основание да дам своята положителна оценка на научната разработка на докторантката и си позволявам да препоръчам на уважаемите членовете на Научното жури да гласуват положително и да присъди на Ваня Димитрова Младенова образователната и научна степен «Доктор» по научна специалност “Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването” (шифър 04.02.01), Професионално направление 6.3. – Животновъдство, Област на Висше образование 6 – Аграрни науки и ветеринарна медицина.

26.09.2019 г.
гр. София

Изготвил:

(доц. Павел Рашев)