

## Рецензия

От Проф. Жеко Байчев двмн, от ЛТУ София, Факултет по Ветеринарна медицина, пенсионер, назначен със Заповед № 21 от 11.02.2019 г. за член на научно жури на дисертационен труд на тема „Спермално плазмени протеини – роля в репродуктивния процес и нискотемпературно съхранение на сперматозоиди от кучета“, за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“, представен от Десислава Георгиева Градинарска от Института по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ при БАН, докторант със задочна форма на обучение по научна специалност „Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването“.

Дисертантът представя дисертационен труд, автореферат към него, цялата изисквана от правилника на ИБИР – БАН документация при защита на дисертационен труд за придобиване на научна степен „Доктор“. Това ме кара да приема процедурата за напълно законна.

Дисертационният труд е написан на 165 стандартни страници и включва увод – 2 страници, анализ на състоянието на изследванията по проблема (литературен обзор) – 36 страници, цел и задачи – 2 страници, материал и методи – 29 страници, резултати и обсъждане – 46 страници, дискусия – 10 страници, а останалото са изводи, приноси, предложения за практиката, литература, публикации и участие в научни форуми. Представени са и три приложения с допълнителна информация по дисертационния труд. Приемам структурата на дисертационния труд за много добра. Можем да отчетем големия обем на разработката, натоварена с много обемиста писмена информация, не толкова необходима, за да докажем значимостта на разработката и достоверността на резултатите. Това навярно е продиктувано и от големия обем научни изследвания.

От векове кучето е било и е най-добрият приятел на човека. През последните десетилетия този животински вид е обект на внимание и в България. Все по-голям е стремежът за усъвършенстване на породния състав на ценните за човека индивиди. Един от методите за поддържане на популацията и усъвършенстването на породния състав е този на биологията и биотехниката на размножаване. Предимство на тази методология, както при другите животински видове, така и при кучето е изкуственото осеменяване и не е необходимо да изброяваме тези предимства. В световен мащаб изкуственото осеменяване на кучета, преди всичко се извършва със свежа и охладена семенна течност. Все още не са постигнати необходимите параметри

за запазване оплодителната способност на сперматозоидите при съхранение при ниска температура (криоконсервация).

Обект на този дисертационен труд е оценка на сперматозоиди и спермална плазма при сепаринно фракционно изследване и предлагане на методика, която би довела до подобряване на качеството на гаметите при високоскоростно замразяване. Това ме кара да приема дисертационния труд като изключително актуален.

Заглавието ни дава възможност да насочим вниманието си към фактора плазменни протеини – влиянието им върху моталитета на сперматозоидите от семенна течност на кучета и как влияе криоконсервацията на сперматозоидите. Така че аспиранта, научния ръководител и научното звено са си свършили работата по задаването на темата. Нямам забележки.

Представеният литературен преглед ми дава основание да приема много добрата литературна осведоменост на автора. Цитирани са 245 заглавия, от които 233 на латински и 12 на кирилица. Близко 50 % от цитираните научни трудове са преди 2000 година и само 18 броя след 2010 година. Застаряваща информация. Това е действителното състояние на публикуваната научна продукция по проблема и още веднъж показва актуалността на разработката и правилната насоченост на проучването и проведените научни изследвания.

В Раздел III – Цел и задачи, предисловието преди дефинираната цел, преодолява липсваща насоченост на целта, към много добре формулирани задачи. Последните от 1 до 4 включително, са оценяване на еякулати, сперматозоиди и спермална плазма на база фракционно сепариране, като са използвани различни методи на характеристика и оценка на същите. Задача 5 напълно съответства на поставената цел и имайки в предвид проблемите със запазването на оплодителната способност на сперматозоидите при повечето животински видове при различните форми на съхранение, можем да оценим като смел подход на дисертанта и научния му ръководител за постигане на оригинални резултати в репродукцията на този животински вид – кучето.

В началото на Раздел IV Материал и методи виждаме, че изследванията са проведени върху 56 кучета, от които са получени 114 еякулата и 20 яйчника от планирана овариохистеректомия на женски животни. Обем на материал достатъчен за изпълнение на поставените задачи и постигане на достоверност на резултатите.

От страница 49 до страница 76 от (т.2 до т.17) в дисертационния труд по един по-различен от стандарта но много сполучлив начин са представени използваните материали, методите на изследване и постановка на опитите.

Този раздел е представен като по учебник, натоварен с голям обем, допълнен с фигури. Не го приемайте като съществена забележка, това навярно е стремеж за постигане на по-голям обем.

Представените получени резултати за характеристиката на сперматозоиди при фракционно получаване, са насочени за определяне на моталитет, кинематични параметри, площ на главичката на сперматозоида. След това (фиг. 19) е извършен анализ на биологичните показатели на сперматозоида в зависимост от качеството им. Напълно очаквано, най-високи стойности на количеството сперматозоиди се установяват при фракция F2. Така е и при другите видове разплодници, особено показателно е при нереза. Не е нещо ново, но в случая са установени приблизително точни стойности на концентрация при значима популация и различен породен състав при кучета. Аналогични са резултатите и от установяване на моталитет, скорост на движение и други показатели, оценящи сперматозоидите при отделните фракции. На базата на тези получени резултати е представен анализ на показателите при F2 и цели еякулати. Очакванно по-добри са стойностите при F2, относно прогресия, а при отчитане на скоростта на движение на сперматозоидите предимството на F2 спрямо целите еякулати важи само за определените като бързи. Дисертантът определя критериите за качество на свежа семенна течност на база подвижността на сперматозоидите като представя стойностите на скорост на подвижност при различни траектории на движение (VCL, VSL, VAP). И тук по-добри са резултати в стойностно изражение, при средната фракция F2 в сравнение с целите еякулати.

По същата схема е представена и характеристиката на СПП, в зависимост от получените фракции на семенната течност. Тук тази характеристика е графично представена (фиг. 27, 28), а на фиг. 29, 30, 31 е представен електрофоретичния профил на четири еякулата и на фиг. 33, 34, 35 са представени резултатите от електрофорезата. В тази задача дисертанта предполага, че установените специфични протеини за F2 са фактор за по-добрите показатели на семенната течност по отношение на биологичните показатели на сперматозоидите и от там по-добрите репродуктивни показатели, свързани с ИО на кучета. Последното не е доказано в дисертационния труд и ако желаете го приемаме като предположение за бъдеща разработка.

Продължава схемата и на възможностите на отделните фракции на семенната течност (еякулати) от кучета и прикрепването на сперматозоидите върху *Zona pelucida*. Първо чрез CASA е установено влиянието на

индуцирането чрез капацитиращи фактори (албумин, калциеви и хидрогенкарбонатни йони) върху морфологичните промени на сперматозоидите и е отчетено и представено на фиг.37 положителното им влияние върху акрозомата. Още по-добре би било ако се направи електронна микроскопия на главичката на сперматозоидите, така както го е направил и предоставил в хабилитационния си труд Ковачев К. (2003) на свежа семенна течност от кочове. Не го приемайте като забележка, а като препоръка в бъдеще за по задълбочени фундаментални изследвания. В замяна на това на фиг.40 и фиг.41 много добре са представени класификацията на кумулусните комплекси на ооцитите и тяхното състояние след отстраняването на кумулусните клетки. Още веднъж ще повтора сложността за постигане на добри резултати при ИО с криоконсервирана семенна течност.

Становището ми за сложността на тази биотехнология произтича от наличието на непълноценни сперматозоиди и проблемите на СПП при цял еякулат доказано и от автора Гергана Градинарска.

Световният опит показва, че най-добри резултати при ИО на кучето се получават при използването на свежа или охладена семенна течност. Независимо от това не малък е процента на осеменяване с разредена замразена сперма. По изпълнението на тази научна задача 5.1 Десислава Градинарска навярно се ръководи от представените в литературния обзор предимства на ИО със замразена семенна течност. Това никога не може да го отрече, но съществуват и много противоречия на тези становища. За преодоляване на това е предложен в дисертацията нов подход при замразяване, а той включва представени четири метода (въздействие) за положителното повлияване върху моталитета на сперматозоидите. Освен начина на замразяване, размразяване на семенна течност е направена и оценка на сперматозоидите, като показателите са сравнявани при F2 (средна фракция на еякулата) и цял обем на същия. Използвани са, както в предходните задачи някои от същите показатели. Да това дава оценка на възможностите на сперматозоидите при *in vitro* условия, но навярно резултатите биха били по-съвършени, ако беше извършено и отчетено ИО с криоконсервирана течност при използвания от авторите оптимизиран подход на замразяване на семенна течност. Това би натоварило с още обем дисертационния труд и го препоръчвам като препоръка за бъдещи разработки.

Резултатите са последвани от стегната точна, сравнена с литературния обзор дискусия. Тук автора изтъква предимството на ИО на кучета в сравнение с естественото покритие, ролята на СП и СПП за репродуктивния процес при

този животински вид. Дискутирани са получените резултати при изпълнението на всички задачи. В заключението автора представя някои от резултатите като потвърждение на изследванията на много изследователи, в областта на репродуктивните биотехнологии при кучетата. Съгласен съм и с това, че някои от постиженията на представения научен труд са нови и дават своя принос в областта на репродукцията на същите, водят до изясняване на процесите на запазване оплодителната способност на сперматозоидите и ще се ползват в практиката на специалистите в направлението и най-вече за обогатяване на репродуктивната наука.

Представени са шест извода. По тях нямам забележки, всичките са правилно формулирани, съответстват на поставените задачи и получените резултати. Представени са и четири приноса, като оригинални с научно-приложен характер. Десислава Градинарска има пет публикации в съавторство на английски език, свързани с дисертационния труд, и пет участия в научни форуми, три от които са с общ IF 5,453.

Към дисертанта и представения научен труд нямам съществени забележки. Приемете следните, които не намаляват представените постижения и приноси в репродукцията на кучетата.

- В Раздел V Резултати и обсъждане някои текстове са свързани повече с методологията на изследване и би било по-добре да са в раздел IV Материал и методи.

- Разработката е с принос за специалността „Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването“, огромен е положеният труд, постигнати са значими резултати по класификация и оценка на СП И СПШ при условия на нискотемпературно съхранение. Представянето на приносите като оригинални с научно-приложен характер не показва напълно стойността на научния труд. Би било по-добре приетата формулировка като оригинални и потвърдителни приноси. Могат да бъдат изтъкнати още такива.

Дисертантът представя автореферат в 51 страници. Същият включва 5 таблици и 22 фигури. Авторефератът съответства на представеното в дисертационния труд и дава възможност за запознаване с проведените изследвания и получените резултати и създава условия за дискусия.

Дисертантът Десислава Георгиева Градинарска, докторант на задочна форма на обучение, завършва Лесотехнически университет София, ВМФ и придобива образователна степен магистър-ветеринарен лекар през 2012 г. Работи като асистент от 2013 г. към секция „Репродуктивни биотехнологии и

криобиология на гаметите“ в ИБИР към БАН. Още като студентка в Университета, който завършва с отличен успех, показва стремеж към изследователска и научна дейност.

В заключение искам да подчертая положителната си оценка на дисертационния труд, представен от асистент Десислава Градинарска, за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“. Основанията ми за тази оценка са следните:

- тема, характеризираща се със своята актуалност;
- правилно структуриране на дисертационния труд;
- много добро и детайлно познаване на разработената проблематика;
- ясно и точно поставени и конкретизирани задачи;
- достатъчни по обем научни изследвания, предполагащи достоверност на получените резултати, проявена компетентност в обсъждането и направените изводи;
- убеден съм, че този дисертационен труд е с принос към биологичната наука;
- не последно и неоспоримо е личното участие на дисертанта в разработката. Не можем да не признаем компетентността и отговорността на научния ръководител.

Всичко това ми дава основание да препоръчам на членовете на Научното жури да оценят по достойнство представения дисертационен труд и присъдят научна степен „Доктор“ в областта на висшето образование ш.б „Аграрни науки и ветеринарна медицина“, научно направление ш.б.3 „Животновъдство“, специалност ш.04.02.01 „Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването“ на ас. Десислава Георгиева Градинарска.

15.03.2019 г.  
София

Изготвил:  
(проф. Жеко Байчев д.в.м.н.)