

## РЕЦЕНЗИЯ

от професор Алексей Славков Савов, д.б,  
Началник на Национална Генетична лаборатория,  
СБАЛАГ „Майчин дом” ЕАД. МУ София

**Относно:** Дисертационен труд на д-р Мария Костадинова Левкова, асистент, редовен докторант за придобиване на ОНС „Доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологични науки, докторантска програма „Генетика“ с тема на дисертационния труд **„Молекулярно-генетични и имунологични биомаркери при медико-генетичното консултиране на семейства с инфертилитет”**.

Със заповед № Р-109-17 / 15.01.2021г. на Ректора на МУ – Варна съм избран за член на Научното жури във връзка с дисертационния труд на д-р Мария Костадинова Левкова. По процедурата за защитата д-р Левкова е представила всички необходими материали съгласно изискванията на „Правилникът за развитие на академичния състав” в МУ–Варна.

Декларирам, че нямам конфликт на интереси с автора на дисертационния труд.

### **Кратки биографични данни за кандидата.**

Мария Левкова е завършила Първа Езикова Гимназия Варна с интензивно изучаване на английски и немски език през 2010 година и Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ Варна като първенец на випуска през 2016 година. От 2017 година е лекар специализант в Лаборатория по Медицинска генетика, УМБАЛ Св. Марина, Варна и Асистент в катедра Медицинска генетика, МУ Варна. Има три краткотрайни специализации у нас и три в чужбина. Доктор Левкова има участие в четири национални изследователски проекти, като два от тях са свързани с темата на дисертационния труд. Прави впечатление високата публикационна активност на докторанта представяща петнадесет публикации в пълен текст (една в реферирано списание с импакт фактор) за периода 2017-2021 година. Във връзка с дисертационния труд са реализирани три публикации, от които една в реферирано и индексирано списание в чужбина е ~~импакт фактор~~ и две участия в научни форуми, което съответства на изискванията на „Правилникът за развитие на академичния състав”.

Предоставеният ми за рецензия дисертационен труд е свързан с актуална и социално значима тема – изясняване на молекулярно-генетични и имунологични биомаркери при двойки с инфертилитет. По отношение на отрицателния демографски прираст, особено подчертан в последните десет години нашата страна е на едно от водещите места сред европейските страни. Като оставим на страна социалните фактори, изясняването на биологичните причини стоящи в основата на този проблем е от съществено значение за адекватна консултация на двойките. Дисертационния труд отразява опита на Лабораторията по Медицинска

генетика в УМБАЛ Св. Марина“, гр. Варна в областта на въвеждане и проучване ролята на множество молекулярно-генетични и имунологични биомаркери при генетични заболявания и предразположения.

Дисертационният труд е структуриран съгласно приетите изисквания, представен на 126 страници и съдържа 24 фигури и 18 таблици. Библиографията обхваща 272 литературни източника, от които 7 на кирилица и 265 на латиница.

**Доказателствения материал е с много високо качество и убедително свидетелства за професионалния опит, на докторантката.**

### 1. Литературен обзор по темата

По отношение на литературния обзор д-р Мария Левкова е изправена пред не-леката задача да се запознае и подбере измежду значителен брой публикации по темата, тези, които най-точно ще представят идеята на нейния дисертационен труд. Отлично впечатление прави, че има включени и трудове на български автори, което и позволява да изгради правилна преценка въз основа на някои популационни характеристики за очакваните резултати от планираните генетични изследвания. Литературният обзор е разделен условно на две части – „Генетични причини за инфертилитет при мъжете“ и „Имуногенетични маркери при жени с повтарящи се спонтанни аборти“. От диагностична гледна точка в медицинската практика при мъже с нарушения в спермограмата най-широко са застъпени изследванията на кариотипа, PCR базирани тестове за наличие на микроделеции върху Y хромозомата, както и ролята на *CFTR* гена, особено при мъже с обструктивна азооспермия (CBAVD). Доктор Левкова разглежда механизмите на тези генетични маркери в най-съвременна светлина, като **начина, по който е синтезирала и подредила информацията свидетелстват за отличните и познания по генетика.** В подкрепа на това посочвам използваната класификация на молекулните дефекти в *CFTR* гена и тяхното влияние върху функцията на белтъчния продукт. Представени са и някои моногенни причини имащи отношение към репродуктивни проблеми при мъжете – синдром на Картагенер, синдром на андрогенна нечувствителност и други, които поради ниската честота съвсем основателно не са обект на настоящето проучване. На сегашния етап близо 50% от случаите на инфертилитет при мъжете остават идеопатични, което налага търсенето на нови генетични маркери. В подкрепа на това са и данни за проучвания на някои нови кандидат гени, - *ZPBP2*, *TEX14* и *DNAH6*, които докторантката е включила в литературния обзор. *Препоръчвам, освен приетото изписване на гените да бъде представен и техният код по OMIM, например синдром на Kalman – OMIM # 308700, синдром на Картагенер – OMIM # 244400. Друга незначителна препоръка е, че е прието имената на гените да се изписват с курсив италиански например (CFTR) за разлика от имената на техните белтъчни продукти.*

През последните години генетичните фактори свързани с рецидивиращите спонтанни аборти при жените, както и някои патологични състояния на бременността бяха разглеждани основно по отношение на риска за развитие на тромбофилия. Те не са коментирани в литературния обзор, което не приемам като

пропуск. Напротив д-р Левкова насочва внимание към имуногенетични маркери, които все още не са напълно проучени и не се използват в рутинната практика. Тя разглежда подробно структурата и функцията на *HLA-G* гена (OMIM \* 142871), и набелязва молекулни варианти, които могат да имат отношение към репродуктивни неуспехи. Другият кандидат ген обект на настоящето проучване е *TNF*- алфа (OMIM \*191160). Някои от алелните му форми се дискутират, като фактори предразполагащи към повтарящи се спонтанни аборти.

**В края на литературния обзор д-р Левкова прави компетентно обобщение на литературните данни и логично обосновава поставените в настоящия дисертационен труд цели и задачи.**

## **2. Цели и задачи**

Целта е формулирана конкретно и във връзка с нея са предвидени пет задачи. Всички те представят изграждането на комплексен подход за анализ на имунологични и генетични биомаркери в помощ на медико-генетичното консултиране на семейства с неизяснен инфертилитет.

## **3. Материали и методологичен подход**

Клиничната група в разработения дисертационен труд включва **170 лица** (100 пациенти и 70 контролни лица), разделени в две групи:

- Изследване на генетични маркери във връзка с мъжки инфертилитет и
- Изследване на генетични маркери във връзка с женски инфертилитет

Критериите за включване или изключване от клиничните групи са много добре обмислени и дават гаранции за правилната интерпретация на крайните резултати. Броят на изследваните лица е достатъчно голям за статистическа обработка на данните от генетичните изследвания. От съществено значение е факта, че **всички включени в проучването участници са предварително оценени и имат нормален мъжки или женски кариотип, без светлинномикроскопски доловими структурни или бройни аберации.**

**Генетичните изследвания** са извършени със съвременни техники за анализ – амплификация в реално време, директно секвениране и др. и **отговарят на стандартите по медицинска генетика.** Подробните протоколи са в подкрепа на уменията, които е придобила д-р Мария Левкова по време на своите специализации. Аз имам отлични впечатления от нейната работа по време на обучението си в Национална генетична лаборатория. Подбраните статистически методи за анализ на данните са изцяло подходящи за поставените цели. В тази глава са включени *две фигури 5-та и 6-та*, които представят резултати и е поуместно да бъдат представени в съответната глава.



#### 4. Резултати

Дисертационния труд на д-р Мария Левкова се отличава с подробни анализи на получените резултати и компетентното им обсъждане в светлината на наличните литературни данни. По отношение на ролята на микроделециите на Y хромозомата засягащи регулацията на сперматогенезата може да се каже, че те са съществен фактор свързани с нарушения на репродуктивния потенциал при мъжете и е уместно да бъдат изследвани не само при пациенти с азооспермия, тъй като вариациите в концентрациите на сперматозоидите могат да варират в широки граници. Има данни, че при някои мъже с делеция в AZFc региона е наблюдавана и нормоспермия. При анализа на честотата на тези молекулни дефекти в различните популации д-р Левкова представя една интересна идея за връзката им с различните хаплогрупи на Y хромозомата, което заслужава да бъде подложено на допълнителни проучвания.

Друг важен фактор свързан с нарушения на репродуктивните способности при мъжете е *CFTR* гена. Въпреки, че преобладава мнението, че молекулни дефекти в него са представени основно с обструктивна азооспермия, не са изключени и различия в клиничната находка. За настоящата работа с основание са избрани вариантите на полипиримидиновия тракта на интрон 8 на гена, както и две мутации p.Phe508del c.1521\_1523delCTT и p.Arg117His c.350G>A, които в различни генотипове имат отношение към мъжкия инфертилитет. Интригуващи са данните от анализа на динуклеотидната повторена последователност в интрон 8, доколкото няма много проучвания при пациенти с репродуктивни проблеми. Безспорно на фона на високата алелна хетерогенност на гена изследването на лимитиран брой мутации може се приеме като ограничение, но критичните забележки на д-р Левкова в това отношение дават ясна представа, че тя отчита този фактор и дава аргументирана препоръка за по-ефективен аналитичен подход.

Основано на факта, че HLA-G молекулите участват в модулирането на имунния отговор на границата между майчиния организъм и плацентата друг обект на дисертационния труд е един делеционен - инсерционен полиморфизъм в *HLA-G* гена (OMIM \*142871), който според някои данни участва в механизмите на регулация на фетоплацентарния растеж. След компетентна статистическа обработка и анализ резултатите показват, че носителството на инсерцията от 14 нуклеотидни двойки в хомозиготно състояние, е потенциален рисков фактор за спонтанна загуба на бременността. Подкрепям намеренията на д-р Левкова изследванията да бъдат разширени, обхващайки по-големи и разнообразни от клинична гледна точка групи жени с репродуктивни проблеми, за да бъде проучена по-добре ролята на този генетичен маркер.

Хипотезата при подбора на втория генетичен маркер в групата на жените със спонтанни аборти, че промените в експресията на *TNF* – алфа (OMIM \*191160) водят до увеличени нива на неговия белтъчен продукт, който е проинфламаторен цитокин, който по време на бременност може да наруши толеранс от страна на майчината имунна система към плода. Потенциално това може да се окаже рисков фактор за спонтанен аборт. Като обект на изследване и избрана еднуклеотидна замяна (-308 AA), за която има

противоречиви данни, че има значение за успешното износване на бременността. Резултатите представени от докторанта не намират статистически значими разлики между алелни и генотипни честоти в двете групи и отхвърлят ролята на този полиморфизъм за репродуктивните проблеми в изследваната извадка. Тъй като сходни резултати са представени и от други автори, подкрепям мнението на д-р Левкова, че не са необходими по-обстойни изследвания за българската популация. Тя не изключва възможността да има други полиморфизми в *TNF*-алфа гена, които да предразполагат към риск за спонтанни аборти.

## 5. Изводи

Докторантката представя пет извода, които отговарят точно на поставените задачи. Подкрепям направената от нея финална оценка, както и мнението и, че въвеждането на нови молекулярно-генетични и имунологични биомаркери в клиничната практика при двойки с инфертилитет, ще подобряват шансовете им за успешна репродукция. Към приносите по дисертационния труд бих прибавил и анализа на разпределение на алелите на динуклеотидната повторена последователност в интрон 8 на гена, сред мъже с репродуктивни проблеми и здрави контроли, за която няма данни за българската популация.

## Заключение

Във финалните глави на дисертационния труд д-р Мария Левкова мотивирано излага своите виждания за бъдещото развитие на проучванията касаещи факторите засягащи фертилитета при мъжете и жените. Цялостният труд оставя впечатление, че тя е натрупала богат клиничен и изследователски опит, което и дава предимства за по-нататъшно развитие, като лекар и преподавател. Не мога да не отбележа уменията и да анализирам и подлагам на критика собствените резултати, както и да систематизирам тези на други автори.

Давам висока положителна оценка на цялостната научна и изследователска продукция на автора и убедено препоръчам на научното жури да присъди научната степен „Доктор” на д-р Мария Костадинова Левкова.

София 07.02.2021 год.

Член на НЖ:

  
(проф. дб Алексей Савов)