

РЕЦЕНЗИЯ

ОТ

чл. кор., проф. д-р ДРАГА ИВАНОВА МИТЕВА - ТОНЧЕВА, д.м.; д.б.н.,

Катедра по медицинска генетика, Медицински Университет - София,
избрана за член на Научното жури с Решение на Факултетния съвет при Факултет
„Медицина“ към МУ - Варна (Протокол № 36/12.01.2021), Заповед № Р-109-17/
15.01.2021 на Ректора на МУ – Варна и за официален рецензент (Протокол № 1/
26.01.2021 г.)

по дисертационен труд на тема „Молекулярно-генетични и имунологични биомаркери
при медико-генетичното консултиране на семейства с инфертилитет“

с автор д-р Мария Костадинова Левкова

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“, Област на висше
образование: 4. „Природни науки, математика и информатика“, Професионално
направление: „Биологически науки“, Шифър 4.3., Докторска програма: „Генетика“ с
кандидат в МУ – Варна,

Научни ръководители: Проф. д-р Людмила Бончева Ангелова, д.м., Доц. д-р Трифон
Георгиев Червенков, д.б.

Рецензията е изготвена в съответствие със Закона за развитие на академичния
състав в Република България и Правилника за неговото приложение в Медицински
университет – Варна.

Д-р Мария Костадинова Левкова е представила за рецензия дисертационен труд,
разпределен съответно на основен текст – 91 страници, приложения – 9 страници и
библиография – 24 страници. Литературната справка съдържа 272 източника, от които
7 публикации са на български език, а останалите на английски език.

1. Оценка на актуалността на темата

Дисертационният труд е посветен на важен медицински проблем със социална и
здравна значимост. Актуалността на тематиката е определена от високата честота на
инфертилитета, засягащ около 15% от двойките в репродуктивна възраст и създаващ
отрицателен демографски прираст. Това е стар проблем за науката и практиката, но

интересен за изследване с нови изследователски подходи чрез молекулярно-генетични и имунологични методи за анализ.

Актуалността на дисертацията се определя от целта на изследването, дизайна и използваните съвременни методики на проучването. Ролята на генетичния статус и носителството на патогенни мутации, свързани с женски и мъжки инфертилитет, както и значението на имуногенетични маркери са проблем, който следва да бъде задълбочено проучен в съответствие с добрите практики в национален и международен мащаб.

Съвременният аспект на дисертацията се дължи на поставените задачи и тяхното изпълнение, които включват анализи на Y микроделеции, патогенни и полиморфни варианти в *CFTR* гена във внимателно подбрана група от мъже с инфертилитет и изследване на варианти в *TNF* – алфа гена и *HLA-G* гена при жени с инфертилитет.

Част от тези биомаркери биха могли да се наследят в следващото поколение и да създадат репродуктивни проблеми с фамилен характер. Нужно е медико-генетичното консултиране на такива пациенти да се базира на биомаркери с добре изяснени фенотипно-генотипни корелации.

Това обуславя актуалността и приноса на проучването, което засяга значителен брой двойки с неизяснен инфертилитет.

Материалът на дисертационния труд е разделен на стандартни части.

Въведение, което представя значимостта на проблема и необходимостта от извършване на ново научно изследване.

Обзорът е написан задълбочено и обхватно, отразява високо ниво на познание на чуждата и българската литература. Началото започва логично с дефиниране на използваните понятия за улеснение на читателите. Литературната справка представлява аналитичен и центриран преглед върху проблема за известни генетични причини за репродуктивните нарушения, засягащи двата пола. Подробно са разгледани известните фактори за мъжкия инфертилитет - хромозомни аберации и възможности на микрочиповата технология за определяне на субмикроскопски дефекти; Y микроделеции, свързани с нарушена сперматогенеза, структура на AZF региона и моногенни дефекти, асоциирани с определени синдроми. Поставен е акцент върху мутации в *CFTR* гена и тяхната функционална значимост. Цитирани са предишни изследвания на български пациенти. Посочени са случаи на мъжки инфертилитет без

доказана мутация в *CFTR* гена и са отразени нови кандидат гени при мъже с нарушена репродукция. Много подробно са описани полиморфизми в *HLA-G* гена, като вероятни участници в модулиране на майчиния имуноен отговор и в нарушаване на имунния толеранс на майчиния организъм към фетуса при жени с множествени спонтанни аборти.

Предложена е работна хипотеза за роля на определени молекулярно генетични и имуногенетични маркери за нарушена репродукция при български пациенти. Изследването има потенциал да помогне за по-добро определяне на значението им като рискови фактори за нарушения на сперматогенеза и за развитието на бременността.

2. Оценка на целта, задачите и методологията

Целта на дисертационния труд е добре и ясно формулирана – чрез проучване на молекулярно-генетични и имунологични биомаркери да се определи тяхната роля в етиологията на инфертилитета и да се изведат препоръки, чрез които да се подобри медико-генетичното консултиране при семейства с репродуктивни проблеми.

Задачите са изведени логически от целта и са насочени към нейното реализиране. Те включват в началния етап оптимизиране и внедряване на адекватни методични подходи, за да бъдат получени качествени резултати. Важно значение за планиране на изследванията има внимателната селекция на групите пациенти с клинична диагноза инфертилитет (мъже и жени), точно дефиниране на включващи/изключващи критерии за участие на „случаи/контроли в проучването. Изследваните групи включват достатъчен брой индивиди (общо 170 лица), което гарантира получаване на достоверни резултати. Важно място в задачите е отделено на търсене на фамилна обремененост за репродуктивни нарушения. Формулирани са и молекулярно-генетичните маркери, които ще бъдат изследвани при мъже (Y микроделеции, патогенни и полиморфни варианти в *CFTR* гена) и при жени с инфертилитет (варианти в *TNF* – алфа гена и *HLA-G* гена), самостоятелно и в комбинация сравнени с контролна група лица.

Тези изследвания не са самоцелни. Една от основните задачи на д-р Левкова е да се направят препоръки за използване на молекулярната диагностика на имунологични и генетични биомаркери в медико-генетичното консултиране на семейства с неизяснен инфертилитет.

Използваният спектър от клинични и молекулярно-генетични методи е адекватен на поставените задачи. Те са подробно описани и доказват, че изследването е изцяло дело на докторантката. Получените резултати са убедителни и демонстрирани с високо качествени снимкови материали. Наличието на микроделеции в Y хромозомата е определяно с Real Time PCR; полиморфизъм 14 bp инсерция/делеция в *HLA-G* гена е диагностициран с конвенционален PCR, последван от гел-електрофореза; 308 GA полиморфизъм в *TNF* – алфа гена е определян с алел-специфичен PCR метод. Мутации и варианти в *CFTR* гена (delF508, вариант 5T в интрон 8, TG повтори и R117H) са идентифицирани чрез директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди.

Резултатите са подложени на статистическа обработка със софтуерни програми.

3. Оценка на резултатите

Получени са интересни резултати от молекулярно генетичните изследвания на 50 мъже, отговарящи на критериите за включване в проучването.

Данните показват наличие на микроделеции в AZFc региона на Y хромозомата при 2-ма мъже, които са съответно с азооспермия и с тежка олигозооспермия. Проведеното изследване за полиморфни варианти в *CFTR* гена доказва един хомозигот носител на вероятно патогенен вариант 5T (5T/5T) с тежка олигозооспермия; двама хетерозиготи по 5T варианта (5T/7T), единият с азооспермия, а другият с тежка олигозооспермия. В останалите мъже е доказано следното разпределение на генотипите: 42-ма мъже са хомозиготи (7T/7T); 4 участници са хетерозиготи (7T/9T) и 1 – хомозигот (9T/9T). Обработените резултати с непараметрични методи за генотипи на IVS8T вариант в *CFTR* гена показват статистически значима разлика между пациенти и контроли. Няма статистически значими различия между двете изследвани групи и по отношение на броя TG повтори в *CFTR* гена и не е доказан кумулативен ефект от Y микроделеции и изследваните полиморфизми в *CFTR* гена. Негативните данни от добре планирани изследвания също имат научна стойност.

Сред изследваната група мъже е доказан един хетерозиготен носител на маркер delF508 в комбинация с 7T варианта в *CFTR* гена и нито един носител на мутацията R117H.

Резултатите от молекулярно-генетичните изследвания на жени с репродуктивни проблеми, участнички в проучването, са убедителни по отношение на 14 bp

инсерция/делеция полиморфизъм в *HLA-G* гена – 9 жени са хомозиготи за дивия вариант (Del/Del), 15 жени са хомозиготи за мутантния тип (Ins/Ins) и 26 са хетерозиготи (Del/Ins). Анализът случаи/контроли направен по отношение на разпределението на общия брой див и мутантен тип алели показва наличие на статистически значима разлика, но без достоверност на резултата по разпределение на генотиповете. Значение за практиката има фактът, че рискът за спонтанен аборт е 2,12 пъти по-висок за хомозиготни носителки на инсерционен варианта в сравнение с хомозиготни носителки на делеционен вариант.

Резултатът от изследването на 308 GA полиморфизъм в *TNF* – алфа гена показва, че 8 участнички са хетерозиготи (AG), а останалите са хомозиготи по дивия алел (GG). След статистическа обработка на данните не се доказват разлики в разпределението на алели и генотипи между пациенти/контроли и липсва кумулативен ефект от наличието на 14 bp инсерция/делеция полиморфизъм в *HLA-G* гена и на – 308 GA полиморфизъм в *TNF* – алфа гена. Резултатите са убедителни, добре интерпретирани и са представени с 24 фигури и 18 таблици, които са с много високо качество.

4. Оценка на обсъждането

Обсъждането е направено адекватно на получените резултати, които са разгледани в контекста на данни от предишни изследвания. Текстът е структуриран логически правилно и разкрива задълбочено познаване на материята. Сред спектъра от разнопосочни данни за честотата на Y микроделециите в световен и национален мащаб, данните на докторанта потвърждават ролята на микроделециите в AZFc региона на дългото рамо на Y хромозомата като причина за намалена концентрация на сперматозоиди в еякулата при носителите им. Доказано е, че двете диагностицирани Y микроделеции имат де ново произход и не са наследени от бащите. Известно е, че AZFc делецията асоциира с азооспермията, но единият от изследваните пациенти, носител на този дефект, е с олигозооспермия. От практическа гледна точка са важни и проведените двукратно опити за ICSI оплождане след извършено микрохирургично TESE, от които при единият е установена клинично бременност, завършила неуспешно в 8 гестационна седмица.

Оригинални са изследванията на полиморфизми в *CFTR* гена, който е определен като нов кандидат ген за нормална сперматогенеза. Интересен резултат от изследване на факторите, свързани с нарушена фертилност при мъжете, е потвърждаване на потенциална роля за сперматогенезата на 5T варианта в *CFTR* гена, характерен с

нарушен сплайсинг. Въпреки съществуващи данни за комбинирано действие на 5T вариант с разположените в близост TG повтори, изследването не доказва такава връзка и подкрепя твърденията за самостоятелно действие на 5T маркера върху нарушената сперматогенеза при носителите му. Доказана е сигнификантна разлика в разпределението на генотиповете за IVS8(n)T варианта в *CFTR* гена между контролната и експерименталната група. В изследваната група мъже с инфертилитет не са открити носители на мутация R117H.

TNF алфа генът е мултифункционален проинфламаторен цитокин. Той принадлежи към суперсемејството на тумор некрозирац фактор (*TNF*) и участва в регулирането на различни молекулни процеси и биологични пътища. Интересът към ролята на генни варианти в патогенезата на спонтанните аборти е голям, но литературните данни са противоречиви. Резултатите на д-р Левкова не доказват, че -308 GA вариант в *TNF* – алфа гена играе сигнификантна роля като рисков фактор за спонтанни аборти при самостоятелно действие или в комбинация с 14 bp инсерция/делеция варианта в *HLA-G* гена. Позитивни данни за връзка със спонтанни аборти са получени за 14 bp инсерционен вариант в *HLA-G* гена. Направена е препоръка за евентуално използване в рутинно в клиничната практика при жени с повтарящи се спонтанни аборти.

Позитивните резултати от изследването показват, че определени молекулни маркери биха могли да бъдат използвани в медико-генетичната консултация на пациенти с проблеми на репродукцията.

Изводите са изведени логично от получените резултати.

Приемам предложените приноси на дисертационния труд, които имат оригинален или потвърдителен характер. Високо оценявам приносите с приложен характер, тъй като те биха могли да подобрят работата на медико-генетичните кабинети при консултации на семействата с репродуктивни проблеми чрез въвеждане на персонализиран подход и поведение при тези двойки.

Заклучение – като имам предвид актуалността на проблема, използваните съвременни техники, получените резултати с важен научен и практически приложен принос за използване на молекулярно генетични и имуногенетични маркери при нарушена репродукция, определям дисертационният труд като успешно разработен,

отговарящ на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ).

Във връзка с гореизложеното, оценявам високо резултатите на докторантката и си позволявам да препоръчам убедено на уважаемото Научно жури да присъди на д-р Мария Костадинова Левкова образователна и научна степен “ДОКТОР” в област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика”, професионално направление: „Биологически науки”, Шифър 4.3, Научна специалност: „Генетика”.

28.02.2021 г.

София


Рецензент:

Чл. кор. Проф. д-р Драга Тончева-Митева,
Катедра по медицинска генетика,
Медицински Университет -София