

## СТАНОВИЩЕ

От Доц. д-р Кремен Цветанов Цветков, д.м.

Катедра по Акушерство и гинекология – МУ , Варна

Относно дисертационен труд за присъждане на научно - образователна степен „Доктор“ , Област на висше образование: 4. „Природни науки, математика и информатика“, Професионално направление: „Биологически науки“, Шифър 4.3. Докторска програма: „Генетика“, Катедра Медицинска генетика при Медицински университет - Варна.

Тема на дисертационния труд: „Молекулярно-генетични и имунологични биомаркери при медико-генетичното консултиране на семейства с инфертилитет“

Автор: Д-р Мария Костадинова Левкова

Представеният за защита дисертационен труд съдържа общо 126 страници с включени в него: 18 таблици, 24 фигури. В библиографията са отбелязани общо 272 литературни източника, от които 7 на кирилица и 265 на латинеца.

### **Актуалност на проблема**

В своя дисертационен труд д-р Мария Левкова е разработила проблем, отличаващ се с несъмнена актуалност. Възпроизводството на човека и динамиката на демографските процеси са един изключително сложен комплекс от икономически, социални, медицински, психологически, географски, религиозни и морално-етични компоненти, които дават много сериозно отражение върху цялостното развитие на една страна.

Безплодието в семейството става все по-актуален проблем за страни със сериозна демографска криза, каквата е нашата. Отрицателният естествен прираст, все по-застаряващото население и рязкото намаляване на хората в детеродна възраст, са само част от проблемите. Около 15 % от двойките, опитващи се да заченат дете, са инфертилни, като поне в половината от случаите това се дължи на причини от страна на мъжа. По непълни данни на различни организации и фондации, занимаващи се с проблемите за

безплодието, броя на двойките с репродуктивни проблеми в България е между 145 и 200 000. През последните години ролята на молекулярно-генетичните и имунологични биомаркери за оплождането, протичането на бременността и нейното успешно завършване стават все по-актуални.

### **Кратки биографични данни и учебно-преподавателска дейност**

Д-р Мария Левкова е родена през 1991г. Завършва висшето си образование в Медицински университет – Варна през 2016г. като първенец на випуска си. Предстои ѝ изпит за придобиване на специалност по Медицинска генетика. От 2017г. е редовен асистент в Катедрата Медицинска генетика, МУ-Варна. Д-р Левкова има 15 пълнотекстови публикации, 1 от които е в реферирано чуждестранно списание с импакт фактор. Д-р Левкова има проведени 6 специализации, 3 от които са в чужбина. Има 4 участия в изследователски проекта. Публикациите, свързани с дисертационния труд, са три, съобразени с изискванията на Медицински университет - Варна. Отличното владение на английски и немски език е допълнителна предпоставка за задълбочени научни познания. Тя е член на Българско дружество по генетика и геномика на човека, European Society of Human Genetics (ESHG), European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)

**Прегледът на литературния обзор** ясно показва, че дисертантката е проучила задълбочено голям брой съвременни литературни източници, като 265 от тях са на латиница и са от последните 10 години. Обзорът притежава добра познавателна стойност, построен е логично и може да служи за основа на разработването на дисертационен труд. Описани са молекулярно-генетичните и имунологични биомаркери за нуждите на медико-генетичното консултиране при семейства с репродуктивни проблеми.

**Целта** дисертационния труд е да се проучат молекулярно-генетичните и имунологични биомаркери за установяване тяхната роля в етиологията на инфертилитета за нуждите на медико-генетичното консултиране при семейства с репродуктивни проблеми.

**Основните задачи** са 5 на брой, като интерес представляват:

1) Да се оптимизира и въведе в Лабораторията по Медицинска генетика молекулярно-генетичен подход за идентификация на потенциално рискови

генни варианти и мутации, свързани с изясняване на причините за женски и мъжки инфертилитет.

2) Да се селектират групи български пациенти с клинична диагноза инфертилитет (мъже и жени) и потърси фамилна обремененост за репродуктивни нарушения и ролята ѝ като индикация за провеждане на молекулярно-генетичен анализ.

3) Да се определи генетичният статус по отношение някои значими гени при мъже с инфертилитет (Y микроделеции, патогенни и полиморфни варианти в CFTR гена), самостоятелно или в комбинация, и потърси сигнификантна връзка чрез сравнителен анализ с контролна група лица.

4) Да се определи генетичният статус по отношение някои потенциално значими имуногенетични гени/маркери при жени с инфертилитет (варианти в TNF – алфа гена и HLA-G гена), самостоятелно и в комбинация, и потърси сигнификантна връзка чрез сравнителен анализ с контролна група лица.

5) Да се обобщи ролята на изследваните имунологични и генетични биомаркери и изградят препоръки при използване на молекулярната диагностика в помощ на медико-генетичното консултиране на семейства с неизяснен инфертилитет.

## **Материал и методи**

Проучването е проспективно и е проведено в Лаборатория по медицинска генетика при УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД – Варна в периода месец ноември 2018 г. до месец юни 2020 г. В проучването са включени общо 170 лица (100 пациенти и 70 контролни лица), които според основните задачи на проучването автора разделя в следните прицелни групи:

### **1) Изследване на генетични маркери във връзка с женски инфертилитет**

- 50 жени с два и повече аборта.
- 50 жени здрави кпнтролни индивида без анамнеза за спонтанни аборти и с поне две успешно завършили бременности (родени на термин деца).

### **2) Изследване на генетични маркери във връзка с мъжки инфертилитет**

- 50 мъже с концентрация на сперматозоидите в еякулата под  $5 \times 10^6$  на милилитър.
- 20 мъже здрави контролни индивиди с поне едно родено дете.

Критериите, които е използвала д-р Левкова за включване на лицата са следните:

- Всички включени в проучването участници са с неизяснен инфертилитет, като имат нормален мъжки или женски кариотип, без светлинномикроскопски доловими структурни или бройни аберации.

**За мъжете участници с репродуктивни проблеми:**

- Възраст над 18 години
- Липса на потомство
- Предварително направена спермограма в лаборатория по избор на участника и брой на сперматозоидите в еякулата под  $5 \times 10^6$  на милилитър.
- Липса на анатомични, ендокринологични и др. състояния, които биха обяснили репродуктивните проблеми.

**За жените участници с репродуктивни проблеми:**

- Възраст над 18 години
- Липса на живородено дете
- Наличие на поне два ранни спонтанни аборта преди 24 та гестационна седмица
- Липса на анатомични, ендокринологични и др. състояния, които биха обяснили репродуктивните проблеми.

**За жените участници, които са здрави контролни индивиди:**

- Възраст над 18 години
- Липса на анамнестични данни за преживени спонтанни аборти
- Наличие на поне две успешни бременности и родено на термин дете

**За мъжете участници, които са здрави контролни индивиди:**

- Възраст над 18 години
- Наличие на поне едно здраво родено дете

**Критерии за изключване**

- Възраст под 18 години
- Наличие на анатомични, ендокринологични и др. състояния, които биха обяснили репродуктивните проблеми
- Участници, които откажат да подпишат информирано съгласие

При разработване на дисертационния труд д-р Мария Левкова е използвала следните методи:

- 1) Клинични методи
- 2) Лабораторни методи, които включват пред-аналитична обработка на материала и аналитична обработка на материала.
- 3) Методи за медико-статистическа обработка на данните (графичен анализ, обработка на количествените показатели, непараметрични анализи, оценка на риска)

### **Собствени резултати и обсъждане**

Установени са двама пациенти с делеции в AZFc региона на Y хромозомата. По отношение на 5T варианта в CFTR гена е намерена сигнификантна разлика в разпределението на този вариант между двете изследвани групи мъже и е потвърдена потенциалната му роля за нарушена сперматогенеза.

Разпределението между двете изследвани групи жени по отношение на 14 bp инсерция/делеция вариант в HLA-G гена показва статистически значима разлика и инсерция вариантът в хомозиготен генотип може да се асоциира с по-висок риск за прекъсване на бременността. Не се установява статистически значима зависимост между носителството на – 308 GA полиморфизма в TNF – алфа гена и риска за настъпване на спонтанен аборт в изследваната популация жени.

### **Изводи и Приноси**

Формулирани са 5 извода и 6 практически приноса, като четири от тях са с оригинален и потвърдителен характер. С ясна научно-практическа стойност се откроява първия принос с оригинален характер.

### **Приноси с оригинален характер**

- 1) За пръв път сред български пациенти с мъжки инфертилитет беше изследван 5T вариантът в CFTR гена, който има потенциална роля като етиологичен фактор за нарушената сперматогенеза при носителите му.
- 2) За пръв път в български пациенти жени с инфертилитет бяха изследвани полиморфни варианти в гени, участващи в регулацията на имунната система с потенциална роля в репродуктивния изход от бременността; в частност 14 bp инсерция вариантът в HLA-G гена се асоциира с по-висок риск за настъпване на спонтанен аборт при носителките; – 308 GA полиморфизмът в TNF – алфа гена не се

свързва с по-голям риск за настъпване на прекъсване на бременността.

### **Приноси с потвърдителен характер**

- 1) Потвърдено е значението на Y микроделециите като причина за намалена концентрация на сперматозоиди в еякулата при носителите им.
- 2) Потвърдена е необходимостта от оценка на молекулярно генетичните мутации и полиморфни варианти в CFTR гена при мъже с нарушена сперматогенеза

### **Приноси с приложен характер:**

- 1) Насочването на пациенти с репродуктивни проблеми към Кабинет за медико-генетична консултация има съществено значение в подхода за обслужване на семейства с репродуктивни неудачи, както за назначаване и интерпретиране на допълнителни генетични изследвания, за подпомагане изясняването на причините, така и с цел подобряване на възможностите на съставяне на индивидуален план за репродуктивно поведение при тези двойки.
- 2) На специалисти в областта на инфертилитета се препоръчва: при мъже с нарушена сперматогенеза (необструктивна азооспермия и тежка олигозооспермия под  $1 \times 10^6$  /ml) молекулярно-генетично изследване за Y микроделеция и за полиморфни варианти (5T варианта) и мутации в CFTR гена; при жени с повтарящи се спонтанни аборти – изследване на 14bp инсерция/делеция варианта в HLA-G гена като имунологичен биомаркер със сигнификантно значение за повтарящи се спонтанни аборти.

### **Заклучение**

Дисертационния труд на д-р Мария Левкова „Молекулярно-генетични и имунологични биомаркери при медико-генетичното консултиране на семейства с инфертилитет“ е актуален и отговаря на наукометричните критерии, а така също и на правилника за академично развитие на МУ – Варна за присъждане на научно-образователна степен „Доктор“.

След съобразяване с направените от мен критични бележки, с дълбоко уважение препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват положително за присъждане на научно-образователна степен “доктор“ по научната специалност „Генетика“ на д-р Мария Костадинова Левкова.

11.03.2021 г.

Доц. д-р Кремен Цветков, д.м.

