

ДО:
ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО ЖУРИ
ОПРЕДЕЛЕНО СЪС ЗАПОВЕД
№Р-109-377/06.10.2020 година.
НА РЕКТОРА НА МУ-Варна
ПРОФ. КРАСИМИР ИВАНОВ
гр. Варна

СТАНОВИЩЕ

От проф. д-р Маргарита Любенова Генова, дм
Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания - София

Относно:
ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД НА ТЕМА
„КЛИНИЧНО ПРИЛОЖЕНИЕ НА ПРОГНОСТИЧНИТЕ ФАКТОРИ И ИНТЕГРИРАНЕТО ИМ В
СКАЛА ЗА ОЦЕНКА НА РИСКА И ВРЕМЕТО ДО ЛЕЧЕНИЕ,
ПРИ НЕЛЕКУВАНИ ПАЦИЕНТИ С В-ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ”

за придобиване на образователната и научната степен „ДОКТОР” по направление 7.
Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина и научна специалност
„Хематология и преливане на кръв”
Научен ръководител – проф. д-р Лиана Герчева-Кючукова, дм

Д-р Ваня Славчева Попова

докторант към

Втора катедра по Вътрешни болести, Факултет „Медицина“, Медицински университет-Варна

УВАЖАЕМА Г-ЖО ПРЕДСЕДАТЕЛ НА НАУЧНО ЖУРИ,

Предоставям на Вашето внимание становище относно дисертационния труд за получаване на образователната и научна степен „доктор” от докторант Д-р Ваня Славчева Попова съгласно изискванията на Правилника за развитието на академичния състав в Медицински университет «Проф. Д-р Параскев Стоянов» - Варна във връзка със заповед №Р-109-377/06.10.2020 година на Ректора на МУ-Варна.

I. Кратки биографични данни за докторанта:

Д-р Ваня Славчева Попова завършва висше образование магистър по медицина във Висш медицински институт - Плевен през 1990 год. Придобива медицински специалности по Вътрешни болести (МУ-София, 1997 год.) и Клинична хематология (ВМИ-Плевен, 1999 год.). Професионалното развитие на докторантката включва работа като лекар в Поликлиника в гр. Койнаре (1990-1995 год), след което – като асистент/старши асистент в Клиниката по хематология на УМБАЛ „Д-р Георги Странски” ЕАД (от 1996 год. до момента). Ръководи занятия за обучение на студенти по медицина пети курс на английски и български език - лекции и упражнения по хематология.

Д-р Ваня Славчева Попова демонстрира принадлежността си към активната научна общност. Участва в няколко научно-изследователски проекта, като до момента са реализирани

два проекта на тема В-хронична лимфоцитна левкемия, финансирани от Медицински Университет- Плевен. Получени резултати в тези проекти също са включени в насоящата дисертация. Д-р Ваня Славчева Попова е публикувала 22 статии в български и чужди научни списания, участвала е с доклади и постери на симпозиуми и национални конференции. Взела е участие в клинични изпитвания.

II. Обща оценка на дисертационния труд:

Представеният дисертационен труд е посветен на трайно **актуален научно-медицински проблем**, тъй като хронична лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) представлява най-честата левкемия при възрастни пациенти, 90% от всички хронични лимфоидни левкемии и общо около 7% от лимфоидните неоплазии, с годишната заболеваемост от средно 4,2 на 100 000 души и нарастваща с възрастта. Заболяването се извява в широк спектър от асимптомно протичане без необходимост от активно лечение за различен период от време до бързо прогресиращ резистентен към лечение процес. Макар и като цяло с индолентен клиничен ход, заболяването поставя сериозни медицински, фармако-икономически и социални проблеми, като на практика остава неизлечимо с понастоящем достъпните терапевтични подходи. Средната преживяемост варира в широки граници в зависимост от рисковата група. Известни са многобройни клиничко-лабораторни показатели, които се асоциират с продължителността на времето до стартиране на лечение, както и с параметрите на свободната от прогресия и обща преживяемост. Проучването на практическата им приложимост в реалната медицинска практика е наложително за внедряването на устойчиви модели и практики на прогнозиране при пациентите с ХЛЛ. В тази връзка собствените проучвания върху ключови биомаркери в съпоставка с клиничните параметри за протичане при пациенти с хронична лимфоцитна левкемия дават възможност за дефиниране на практически приложими обособени по риск групи пациенти с оглед оптимизиране на терапевтичното поведение, което ги прави безспорно актуални и перспективни.

Дисертационният труд, представен от докторант Д-р Ваня Славчева Попова **съответства на основните изисквания** на Правилника за прилагане на закона за развитието на академичния състав в Република България:

Представената научна продукция в настоящия конкурс изпълнява минималните национални изисквания по чл.26 от ЗРАСРБ (ДВ, бр.30 от 2018 г., в сила от 04.05.2018 год.) и чл. 1а от ППЗРАСРБ (ДВ, бр.56 от 2018 г., в сила от 06.07.2018 год.) за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ в Област на висше образование 7. „Здравеопазване и спорт“ Професионално направление 7.1. Медицина (Таблица).

Група от показатели	Показател	Брой точки за „доктор“	Брой точки на д-р Ваня Попова
А	1. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“	50	50
	ОБЩО ЗА ГРУПА „Г“	30	30,75
Г	7. Научна публикация и доклади в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация	60/n	22
	8. Научна публикация и доклади в научни издания в нереферирани списания с научно рецензиране или публикувани и редактирани колективни томове.	30/n	8,75

1. Дисертационният труд е представен във вид и обем от общо 123 страници, като съдържа: съдържание (1 страница); използвани съкращения (2 страници); изложение, структурирано в следните раздели - I. литературен обзор (33 страници); II. работна хипотеза, цел и задачи (2 страници); III. Изследователски материали и методи (9 страници); IV. Резултати от проучването (30 страници); V. дискусия (19 страници); основни изводи от проведените изследвания, заключения и приноси (3 страници); две приложения (Информационен лист за пациента; анкетна карта); библиография. Дисертацията е онагледена с 49 фигури, съдържа и 30 таблици. Библиографията включва 199 печатни източника, от които 4 на български език; 1 на руски език и 194 на английски език, 41,2% от които са от последните години (2015-2020 год.).

Приложен е автореферат в обем от 64 страници, който отразява основните моменти на дисертацията и освен това съдържа (1) списък на публикациите във връзка с дисертационния труд, който включва 4 публикации на английски език, от които 2 са в реферирани в Scopus и Web of Science; (2) списък на 2 участия в научни форуми в България; (3) справка с оригиналните, потвърдителни и приложни приноси на докторанта.

2. Дисертационният труд показва, че докторант д-р Ваня Попова притежава задълбочени теоретични знания по своята специалност и способности за провеждане на изследвания, резултатите от които представляват принос в медицинската наука и практика.

2.1. Дисертационният труд съдържа **Литературен обзор**, който ясно показва добрата информираност на докторантката по проблемите на хроничната лимфоцитна левкемия в обем от 33 страници, структуриран в няколко основни направления:

2.1.1. Общ преглед върху В-клетъчната онтогенеза и позиционирането на хроничната лимфоцитна левкемия в този процес. Разгледани са теориите за произхода на неопластичния клон и се обсъжда патогенезата на заболяването.

2.1.2. Клинични аспекти на хроничната лимфоцитна левкемия. Акцентът на обзора е върху възможностите за прогнозиране на клиничния ход още към момента на диагнозата на базата на доказано информативни и практически приложими показатели с оглед оптимизиране на клиничния подход и лечение. Изчерпателно са представени класически клинично-лабораторни, цитогенетични, молекулярни и флоуцитометрични биомаркери. Изложена е концепцията за необходимост от комплексна оценка на риска.

Анализът на представените в обзора данни позволяват на д-р Ваня Славчева Попова да формулира съществени нерешени за нашата страна проблеми, които да залегнат в настоящия дисертационен труд. Работната хипотеза е фокусирана върху ролята на молекулярно-генетичния профил за индивидуалното протичане на заболяването и възможността за прилагане на сурогатни, лесно приложими методични подходи за оценка на основните подлежащи генетични нарушения.

Д-р Ваня Славчева Попова показва умения за критичен анализ и обобщение на цитираните научни факти, въз основа на което формулира **целта** на дисертационния труд – да се проучи и анализира въздействието на достъпни клинично-лабораторни и молекулярно-генетични показатели върху времето до необходимост от стартиране на лечение при нелекувани болни от В-хронична лимфоцитна левкемия. За постигането ѝ са формулирани и конкретните задачи: комплексни проучвания на демографски показатели, клиничен стадий и серумния маркер $\beta 2$ -microglobulin като фактори, свързани с времето до необходимост от лечение, както и проучвания на честотата на хромозомни аберации и експресията на LPL и ADAM29 гените при нелекувани пациенти.

2.2. Докторант д-р Ваня Славчева Попова е представила прецизно използваните в научната разработка **Материали и методи**, които са подбрани в съответствие с поставената цел и основни задачи. Дисертационният труд се основава на изследването на общо 97

пациента с хронична лимфоцитна левкемия, диагностицирани на базата на имунофенотипна констелация. За съжаление от анализа са изключени пациентите с атипични имунофенотипни констелации. Използван е богат панел от клинични и лабораторни параметри. Приложените методи са подробно описани и обяснени в раздела по начин, който позволява ясно разбиране на същността на извършените изследвания: турбидиметричен метод за изследване на серумен $\beta 2$ -microglobulin; флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) за изследване на p53, ATM и DLEU1 гените върху интерфазни ядра; мултиплексна полимеразноверижна реакция след обратна транскрипция (RT-PCR) за изследване на експресията на LPL и ADAM29 гените. Използван е пакет от статистически методи за анализ на дискретни и непрекъснати величини. Времето до лечение е анализирано по метода на Kaplan & Meier, като различията между отделните групи статистически са оценени чрез log-rank test. Работата би спечелила много, ако беше оценена и независимата прогностична стойност на отделните параметри едновременно с действието на различни фактори чрез допълнителен мултивариационен анализ.

2.3. Дисертационният труд представя **Научни резултати**, описани коректно, онагледени с фигури, графики, снимков материал и таблици, както следва:

- Проведени са проучвания на демографските фактори пол и възраст по отношение на времето до лечение без да се установяват значими различия в обособените групи.
- Проведени са проучвания на клинични показатели по отношение на времето до лечение. Потвърдена е значимата разлика между клиничните стадии, дефинирани съгласно критериите на Binet, включително между пациентите със/без спленомегалия, която е един от дефиниращите стадия показатели. В тази връзка, би могъл да бъде представен анализ и за значението на останалите компоненти на стадийната система (хематологични показатели, брой засегнати лимфоидни групи), което би могло да хвърли допълнителна светлина върху относителната тежест на всеки един от показателите за евентуалната прогноза.
- Оценена е връзката на туморния обем с времето до лечение. За целта са представени резултатите от анализа както на директния показател за туморен товар - абсолютен лимфоцитен брой (установена значима връзка с провеждане на лечение и времето до започването му); така и на индиректния показател - серумен $\beta 2$ -microglobulin, завишените стойности на който значимо дефинират група с по-кратък период до започване на лечението, независимо от високия дял съпътстващи заболявания и без необходимост от преизчисляване в зависимост от бъбречната функция. В допълнение, показана е умерена корелация на $\beta 2$ -microglobulin с възрастта на пациентите и стадия.
- При 62 пациента са поведени проучвания на основни молекулярно-цитогенетични маркери. Установено е разпределението на най-честите, клинично значими хромозомни аберации, определени чрез локус специфични сонди и FISH. В дисертацията се съобщава честотата на аберациите като самостоятелна находка, което обяснява по-ниските стойности спрямо публикуваните данни в научната литература - del13q (42.6%), del11q (3.3%), del17p/p53 (9.8%), като са установени разлики в зависимост от стадия на заболяването. В 8.2% е налице >1 аберация и са представени клинично-лабораторни показатели на тези пациенти. Преизчислената честота на отделните аберации, в т.ч. и в случаите, в които има >1 аберация, позволяват генериране на резултати близки до литературните, както следва del13q (48,4%), del11q (9,7%), del17p/p53 (12,9%). Анализ на времето до лечение е проведен само по отношение на процентната изява на del13q без да е намерена зависимост, но и без да е пояснено как е определена дискриминащата стойност от 70%. Работата би спечелила, ако анализът обхване всички изследвани маркери. Препоръчвам на докторант д-р Ваня Попова да публикува цялостен задълбочен анализ на молекулярно-цитогенетичните данни, тъй като до момента това е едно от най-представителните проучвания на приложението им за

прогнозиране на времето до започване на лечение при пациенти с хронична лимфоцитна левкемия в страната. В тази връзка бих препоръчала в бъдещи публикации да бъде прилагана утвърдената номенклатура, да бъде подбран подходящ снимков материал, представящ находките в норма и в патология за всеки един от изследваните маркери, да бъде унифицирана и прецизирана анотацията на фигурите.

- При 48 пациента е проведено проучване на експресията на LPL и ADAM29 гените. Изследването е първо в страната и е използвано като заместител на IGVH статуса на базата на литературни данни и дефинираните в "Материали и методи" критерии за "мутирал IGVH статус" (при наличие на отчетливи продукти на амплификацията, включващи 1 банд, съответстващ на експресия на ADAM29 или на 2 продукта, съответстващи на ADAM29 и LPL), "немутирал IGVH статус" (при наличие на отчетлив продукт на амплификацията, включващ 1 банд, съответстващ на LPL); "неопределен IGVH статус" (при отсъствие на продукти на амплификацията на ADAM29 и LPL). Не са провеждани собствени сравнителни изследвания. Проучването на практика идентифицира еквиваленти само на "мутирал" и "немутирал" IGVH статус. Т.нар. "мутирал" статус е характеризирани с по-висока честота на del13q и липса на del11q, докато del17p и наличието на >1 аберация са разпределени в двете категории. Таблица №26 представя съществено различие между двете групи по отношение на необходимостта от лечение, без обаче да е посочено дали тази разлика е статистически значима, така както е ясно демонстрирана разликата по отношение на времето до лечение. Резултатите на докторанта по отношение на прогностичната роля на изследваните с RT-PCR биомаркери е изключително интересна и с потенциал за практическо внедряване, но бих препоръчала обозначаването на групите да става на базата на реалните находки, напр. „ADAM29(+)/LPL(±)“ / „ADAM29(-)/LPL(+)“, а не "мутирал IGVH статус"/ "немутирал IGVH статус". Използването на експресионните маркери като заместители на мутационния статус е добре аргументирано с литературни данни, но все пак не е идентично.

- Данните са обобщени в модифицирана прогностична схема. Пациентите са разпределени в рискови групи, като медианата на времето до лечение значимо се различава между групата с нисък риск, с междинен риск и общо с висок и много висок риск.

2.4. В представения раздел **Обсъждане на резултатите** д-р Ваня Славчева Попова прави анализ на данните от собствените изследвания и тези на други изследователски групи, намерени в литературните източници, което ѝ позволява да формулира обобщения и **Изводи**, по отношение на: (1) разпределението на пациентите според клиничния стадий към момента на диагнозата и връзката с времето до започване на лечение. (2) значението на серумните нива на β 2-microglobulin за прогнозиране на времето до започване на лечение; (3) разпространението на хромозомните аберации, връзката им с молекулярните биомаркери, съответстващи на мутационния статус и последствията за прогнозата; (4) предимствата на комплексния подход за стратифициране на риска.

2.5. Приемам най-общо формулираните от д-р Ваня Славчева Попова **Приноси**, обособени в три основни групи:

Оригинални приноси: за първи път в нашата страна е изследвана връзката между експресията на молекулярни биомаркери и времето до започване на лечение; като за първи път тези маркери са използвани и като заместител на класически прогностични фактори при комплексната оценка на риска при новодиагностицирани пациенти с хронична лимфоцитна левкемия.

Потвърдителни приноси: потвърдено е прогностичното значение на клиничния стадий, серумните нива на β 2-microglobulin и хромозомните аберации, установени чрез молекулярно-цитогенетично изследване, по отношение на времето до лечение.

Приноси с приложен характер: разработен е подход за скрининг на риска, като е изготвена анкетна карта за практическо приложение.

III. Препоръки и забележки.

- Част от изводите са формулирани без в раздел “Резултати” да са представени съответните собствени наблюдения на докторанта (5,6,8) и остава впечатлението, че се основават в по-голяма степен на литературни данни; част от изводите звучат като констатация (1,2).
- Резултатите от FISH изследването на молекулярно-цитогенетичните маркери не са изписани коректно съгласно утвърдената номенклатура.
- В допълнение, анотацията на микрофотографиите от FISH изследванията е непълна (Фиг. 36, 38, 40 – дисертация / Фиг. 22, 24, 26 – автореферат). В случай, че на една фигура се демонстрират находки от един и същи пациент, то това трябва да е ясно представено в описанието. Фиг.36 (дисертация)/Фиг.22 (автореферат) първо, съдържа описание само на находки по отношение на TP53 като е демонстрирана del(17p), но не и описаната монозомия; а от друга страна – липсва описание по отношение на ATM, каквато микрофотография е включена.
- Не е спазен единен стандарт при изписване на литературните източници, а не по-малко от 26% (n=43) от цитираните заглавия са непълни или неточни.
- Значителна част от фигурите в разделите “Литературен обзор” и “Дискусия” са взимствани от други автори, макар и с ясно обозначени източници, което не е добра практика в научната литература. Докторантът напълно притежава потенциала да разработи свои модификации на базата на високата теоретична подготвеност, която демонстрира в работата си.
- Тези констатации могат в голямата си част да бъдат приети като технически пропуски и грешки, които не променят труда по същество.

IV. Заключение.

В заключение, представеният дисертационен труд на д-р Ваня Славчева Попова-докторант към Втора катедра по Вътрешни болести, Факултет „Медицина“, Медицински университет-Варна, на тема „ КЛИНИЧНО ПРИЛОЖЕНИЕ НА ПРОГНОСТИЧНИТЕ ФАКТОРИ И ИНТЕГРИРАНЕТО ИМ В СКАЛА ЗА ОЦЕНКА НА РИСКА И ВРЕМЕТО ДО ЛЕЧЕНИЕ, ПРИ НЕЛЕКУВАНИ ПАЦИЕНТИ С В-ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ” представлява собствена разработка на докторанта по актуален научно-медицински проблем, структуриран и оформен съгласно изискванията. Дисертационният труд с приложените към него научни публикации демонстрира познанията и възможностите за научно-изследователски проучвания на докторанта и отговаря на критериите на Закона за развитието на академичния състав в Република България и правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ.

На базата на гореизложеното давам положителна оценка на дисертационния труд и предлагам на почитаемото Научното жури да присъди образователната и научна степен “ДОКТОР” по направление 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина и научна специалност „Хематология и преливане на кръв” на **ДОКТОРАНТ Д-Р ВАНЯ СЛАВЧЕВА ПОПОВА.**

Изготвил становище:

03.11.2020 год.


проф. д-р Маргарита Любенова Генова, дм
СБАЛХЗ - София