

# РЕЦЕНЗИЯ НА ДИСЕРАЦИОНЕН ТРУД

от

**Полковник проф. д-р Ивайло Петров Въжаров, д.м,  
професор по гастроентерология,  
специалист по вътрешни болести и гастроентерология**

Относно дисертационен труд на тема: **”Сравнително изследване на биохимични маркери в различни биологични матрици при пациенти със заболявания на гастро-интестиналния тракт“** за присъждане на образователна и научна степен **„ Доктор”** по научна специалност **„Клинична лаборатория“** в професионално направление 7.1 Медицина.

**Докторант: д-р Марияна Георгиева Йорданова - Василева**

**Научен ръководител: Доц. Даниела Иванова Герова, д.м**

**I Общо представяне на получените материали**

Рецензията е изготвена въз основа на Заповед Р-109-38/21.01.21 год. на Ректора на МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна и решение от проведено първо заседание на научното жури.

Автор на дисертационния труд е д-р Марияна Георгиева Йорданова – Василева, специалист по Клинична лаборатория, асистент в Катедра „Обща медицина и Клинична лаборатория“, Факултет „Медицина“ на МУ – Варна, докторант в свободна форма на обучение към МУ - Варна. Темата на дисертационния труд е *„Сравнително изследване на биохимични маркери в различни биологични матрици при пациенти със заболявания на гастро-интестиналния тракт“* за присъждане на образователна и научна степен **„Доктор“** в област на висшето образование по Професионално направление: 7.1. Медицина и Научна специалност: Клинична лаборатория

Представени са всички необходими документи за придобиване на ОНС **„Доктор“**, съгласно Закона за развитие на академичния състав в Република България и правилника за неговото приложение и Правилника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ – Варна.

## **II Данни за кандидата**

Д-р Марияна Георгиева Йорданова е родена в гр. Варна на 17.02.1960 година. Завършва Медицина през 1987 година в МУ – Варна. Работи като ординатор във II-ро Вътрешно отделение на Общинска болница – гр.Шумен. Придобива квалификация ректоскопия и фиброгастроскопия през 1992 и 1993 година. Придобива специалност Вътрешни болести през 1995 година. В периода 1998-2004 г. работи като радиобиолог във ХЕИ – Варна. Втора основна специалност по Клинична лаборатория придобива през 2004 г. От същата година оглавява отделението по Клинична лаборатория и имунология във ВМА-МБАЛ-Варна. От 2010 г. е хонорирован асистент към Катедра „Обща медицина и Клинична лаборатория“, а от 2013 редовен асистент към същата катедра. През 2017 година е зачислена като докторант в свободна форма на обучение към МУ-Варна. Провежда упражнения по основната научна дисциплина Клинична лаборатория за специалността **„Акушерка“**, **„Медицинска сестра“**, **„Медицина“**, а така също за известно време и за специалност **„Магистър фармацевт“**. Водила е лекционен курс на специалност **„Медицински лаборант“**. Д-р Йорданова провежда курсове СДО включени в план-програмата ва ВМА от 2008 год.

Има общо 25 публикации и 20 участия в научни форуми с представяне на постер или орална презентация. Член е Българското дружеството по Клинична лаборатория и

Българското дружество по Авиационна, Морска и Космическа медицина. Владее руски и английски. Притежава много добра компютърна грамотност.

### **III Структура на дисертационния труд**

Дисертационният труд по наукометрични изисквания отговаря на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ – Варна. Написан е на 216 страници на правилен граматичен български език. Онагледен е с 52 таблици и 53 фигури, което улеснява анализа на резултатите и тяхното обобщение, както и мащаба на направеното проучване. Структуриран е съгласно правилата на оформяне на дисертационен труд и съдържа всички основни елементи. Библиографията включва 414 литературни източника, от които 3 на кирилица и 411 на латиница повечето от последните 10 години (78%), а от тях 50% са от последните 5 години.

### **IV Актуалност и значимост на дисертационния труд**

Представената ми за рецензия докторска дисертация обхваща важна тема, касаеща приложение на слюнчени, серумни и фекални биомаркери като алтернатива на ендоскопските изследвания в диагностиката и мониторирането на пациенти с хронични заболявания на гастро-интестиналния тракт (ГИТ). Тези заболявания се явяват значим медико-социален проблем в съвременния свят, с нарастваща честота, включително и в България. Възможността естествено свързаните с ГИТ биологични материали слюнката и фецес, да се използват като алтернатива на серума придобива все по-голямо значение в съвременната медицина. Настъпващите промените в състава им както при локални, така и при системни заболявания, ги превръща в удачен и перспективен биологичен материал за откриване и изследване на нови биомаркери в областта на гастроентерологията, които да корелират добре с ендоскопската и хистологична находка и да спомагат диагностиката, мониторирането на хода и терапията на хроничните гастро-интестиналните заболявания. Неинвазивното и лесно добиване дава предимство на тези биологични материали като възможност за намаляване броя на инвазивните чести, неприятни и рискови ендоскопски изследвания при проследяване хода на хроничните заболявания на ГИТ.

Дисертационният труд е първото обстойно проучване в страната с охарактеризиране на слюнката и приложението ѝ като диагностичен биологичен материал при хронични заболявания на ГИТ.

### **V Литературен обзор**

Литературният обзор е 40 страници, обхваща всички аспекти на разработената тема и е подкрепен от 3 информативни фигури. Прави се обзор на използваните познати и прилагани в гастроентерологията серумни и фекални маркери в диагностиката на хроничните възпалителни заболявания на ГИТ. Анализирани са обстойно слюнката като биологичен материал, нейният състав, функционално значение и приложение в различни аспекти на медицината. Разглеждат се нови и все още не така навлезли в рутинната практика лабораторни показатели за локално възпаление като фекален калпротектин. Анализирани са световният опит в приложението му не само като дискриминатор при разграничаването на специфичния възпалителен процес при болест на Крон и улцерозен колит от функционални чревни нарушения, но и като маркер в управлението на хроничния рецидивиращ възпалителен процес. Особено внимание е отделено на друг нов маркер свързан с имуномедиацията характер на хроничните възпалителни чревни заболявания - ензима аденозиндезаминаза. За него има твърде оскъдни данни в научната литература в приложението му в диагностиката и мониторирането на тези заболявания. Разгледани са нитрозативния и оксидативен стрес като съществен патогенетичен механизъм при заболяванията на ГИТ, играещ роля в

поддържане на възпалението и увреждане на лигавицата. Направеният анализ на научната литература по темата на дисертацията е задълбочен, изготвен компетентно от докторанта, показващ усилена подготовка и познаване на проблематиката.

Целта е ясно формулирана - да се проучат, валидират и сравнят подобрени биохимични маркери и клетъчни елементи в различни биологични матрици (слюнка, серум и фецес) и да се изясни ролята им за диагностиката и мониторирането на пациенти с хронични заболявания на горния и долен отдел на гастроинтестиналния тракт. За постигането ѝ са поставени 7 основни задачи и 10 подзадачи, които са дефинирани ясно и адекватни за решаване на поставената цел.

#### **VI Клиничен материал и методи използвани в дисертационния труд**

Разделът Материал и методи е развит на 10 страници. За целите на проучването са изследвани общо 300 индивида, подобрени през периода септември 2017 – юни 2019 година. От тях 114 са със заболявания на гастро-интестиналния тракт (ГИТ), а 186 са здрави доброволци. Групата на болните лица включват 54 лица с хронични възпалителни чревни заболявания (болест на Крон и улцерозен колит) и 60 с хроничен гастрит. Ясно са формулирани критериите за включване и изключване в проучването. Полученият материал е достатъчен за статистическа обработка и гарантиращи достоверност на резултатите.

Описани са подробно използваните биологични материали (серум, слюнка и фецес), начин на добиването им, както и методите, апаратурата и реактивите използвани при определянето на съответните показатели в тях. Използваните лабораторни методи са съвременни и надеждни, даващи достоверни резултати и съответстват на препоръките на световните стандарти в областта на лабораторната диагностика. Нерутинно използваните параметри като dROMs, SAT, sIgA и нитрити в слюнка са описани подробно и се обосновава необходимостта от валидирането им преди употреба. Получените резултати са обработени със съвременни статистически методи.

#### **VII Резултати, обсъждане, изводи заключение и приноси на дисертационния труд.**

Резултатите са представени в 7 раздела (124 стр.), систематизирани и онагледени със съответни фигури и таблици. Дисертационния труд е изпълнен в четири експериментални етапа: 1. Апробиране и валидиране на аналитични методи за изследване на подобрени биохимични маркери и клетъчен състав в слюнка. 2. Проучване на биологичната вариация на подобрени слюнчени и серумни биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка от здрави лица в зависимост от пол, възраст и тютюнопушене и определяне на референтните им интервали. 3. Изследване на избраните биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка и серум от пациенти с хронични заболявания на горния ГИТ. 4. Изследване на избраните биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка и серум и фецес от пациенти с хронични възпалителни чревни заболявания.

Първият раздел набляга върху преданалитичната стандартизация на процедурата по пробовземане на слюнката и оптимизиране и валидиране на нерутинни и малко познати в лабораторната практика тестове (dROMs, SAT, sIgA и нитрити). Изследваните аналитични характеристики на методите за количествено определяне на упоменатите по-горе показатели, съответстват напълно на изискванията на стандарт БДС EN ISO/IEC 17025 за валидация на методи на изпитване, като се доказва тяхната висока аналитична надеждност и възможността за осигуряване на качествени и достоверни резултати.

Изследването относно влиянието на факторите пол и възраст върху слюнчените биохимични показатели и клетъчни елементи, не установява съществени възрастови и полови вариации в изследваните слюнчени параметри в нестимулирана слюнка от

зdravi лица. Докато факторът тютюнопушене, особено когато е с голяма давност, оказва значими промени в състава на слюнка при здрави лица. Наблюдава се намаляване на показателите осигуряващи имунната защита на оралната мукоза (sIgA и UA), а се увеличават биохимични показатели, свързвани с възпалителни и некротични тъканни промени (LDH и нитрити) и на всички клетъчни елементи (RBC, WBC, EC и Bact.)

Определянето на референтни граници на изследваните биохимични показатели и клетъчни елементи в нестимулирана слюнка е един плюс в работата на докторанта. Референтните граници са определени според препоръките на IFCC, както относно стандартизиране на процедурата по пробовземане, така и подбора на референтната група, избор на аналитични и статистически методи. Те са формирани от представителна извадка от българската популация и отразяват специфичните национални особености на бит и култура и са сравними с публикувани референтни диапазони от изследвания, проведени с нестимулирана слюнка.

Оценката на оксидативния стрес както в слюнка, така и в серум показва, че полът не оказва влияние върху посочените показатели, докато факторът възраст се очертава като най-съществен по отношение на баланса оксиданти/антиоксиданти и задълбочаване на ОС с възрастта. Факторът тютюнопушенето е друг определящ фактор, водещ до дисбаланс между оксиданти и антиоксиданти и възникване на ОС. Направената корелационна взаимовръзка между нормалните концентрации на изследваните аналити в двата биологични материала – слюнка и серум е също едно предимство на работата, хвърлящо повече светлина върху слюнката като биологичен материал и възможността тя да бъде като алтернатива на серум/плазма. Липсата на значима корелационна взаимовръзка между изследваните биохимични параметри в слюнка и серум при здрави индивиди доказва, че тя не е пасивен ултрафилтрат на серума и съставът ѝ се определя от разнообразни фактори.

Групата на **пациентите с хронични гастрити** (60 индивида) е разделена на две подгрупи според наличие на антитела и антигени, свързани с НР инфекция - (НР(+)) и (НР(-)) гастрити. Отчетени и класифицирани са пациентите по ендоскопски характеристики на възпалителния процес и топографското разпространение. Доказва се, че НР(+) инфекция оказва съществено влияние върху състава на слюнката в хода на възпалителния процес. Отражението е както върху стойностите на биохимичните параметри, така и на броя на клетъчните елементи. Етиологичния причинител, води до значимо нарастване най-вече на слюнчените LDH, ALB и нитрити, които притежават и най-добър диагностичен потенциал по отношение възможността да разграничават болни с хроничен гастрит от здрави лица.

Значимо увеличените серумните нива на ROS и изчерпания AOC, с възникване на оксидативен стрес в резултат на НР инфекция, корелират в умерена статистически значима степен, съответно положително и отрицателно с ендоскопската находка при хроничния гастрит. Това потвърждава патогенетичната им роля в поддържане на възпалителния процес и стомашно-лигавичните увреди.

Оценката на диагностичният потенциал за хроничните гастрити доказва, че слюнчените LDH, албумин, sAA, нитрити, превъзхождат този на серумните показатели, а серумните показатели на ОС (BAP, dROMs) имат по-висока диагностична надеждност спрямо рутинно прилагания възпалителен маркер CRP.

Пациентите с **хронични възпалителни заболявания на червата** (54 индивида) са разделени по отношение активността на заболяването (активна форма, лека форма или ремисия), използвайки клинични индекси на активност на заболяванията, както и по отношение на терапията (монотерапия и комбинирана терапия).

Хроничният чревен възпалителен процес (ХВЧЗ) оказва съществено влияние върху състава на слюнката. Промените за всички изследвани слюнчени параметри и клетъчни елементи са особено подчертани във фазата на активност на заболяването и се различават статистически значимо както спрямо контролната група, така и спрямо пациенти в лека форма или ремисия на заболяването. Измежду всички изследвани слюнчени биохимични показатели LDH, sIgA и sAA се открояват с най-добра информативна стойност в сравнение със съответните им серумни показатели, докато серумните TP и ALB превъзхождат слюнчените по отношение оценка на ефекта на хроничния възпалителен процес върху общото състояние и метаболитни промени при всички пациенти с ХВЧЗ.

При пациентите с ХВЧЗ също се наблюдава нарушен баланс между оксиданти/прооксиданти. По-високи стойности на ROS в серум и слюнка се установяват при пациентите с активност на възпалението спрямо останалите две групи, като по-значими промени се установява в параметрите на ОС в слюнката в сравнение със серума. Увеличените нива на ROS и изчерпвания АОС при пациенти с ХВЧЗ, корелират статистически значимо с индексите на активност на ХВЧЗ (CDAI – за болест на Крон, Мауо индекс – за улцерозен колит).

Регистрираното многократното увеличение на фекалния калпротектин при ХВЧЗ, особено във фазата на активност на възпалението, потвърждава, че той е надежден показател да отдиференцира локалните възпалителни чревни промени от функционални такива, да разграничава пациентите с различна степен на активност/тежест на заболяването и да предсказва появата на усложнения в бъдеще.

Проученият нов серумен биомаркер – аденозиндезаминаза (ADA), като показател играещ роля в имуно-медиацията възпалителен процес при ХВЧЗ, показва статистически значимо покачване в активната фаза на заболяването и дискриминира здрави от болни и такива с активност на възпалението от тези с ремисия. Диагностичният потенциал на този биомаркер превъзхожда всички останали изследвани и рутинно използвани показатели. Диагностичната му надеждност се доближава в най-голяма степен до тази на FC, което го прави перспективен потенциален маркер в изследването на пациенти с ХВЧЗ.

### **VIII Изводи и приноси**

Обсъждане на резултатите е направено след всеки раздел и са изведени основни изводи за съответния разглеждан етап на проучването. Докторантът е съумял, използвайки съвременните литературни данни да анализира и обобщи собствените си резултати и аргументира приложимостта на слюнката и фецеса като неинвазивен биологичен материал в лечебно-диагностичния процес на хроничните заболявания на ГИТ.

Направените от докторанта изводи са 13 на брой, логични, точно и ясно формулирани и дават отговор на поставената цел. Изведените приноси са 9, които оценявам като значими с висока национална и международна научна и практическа стойност. От тях 8 с научно-приложен характер и 1 с потвърдителен характер.

Оптимизирани и валидирани са нерутинни методи за количествено определяне на маркери на оксидативен стрес (ROS и АОС), нитрити и sIgA в слюнка. Проведеното изследване на множество биохимични показатели, клетъчни елементи и показатели на ОС в нестимулирана слюнка с определяне на биологичната им вариация в зависимост от пол, възраст и тютюнопушене е уникално до момента в страната. Определени са референтни граници (РГ) на изследваните параметри в слюнка за представителна извадка от българската популация, отразяваща специфичните национални особености на бит и култура. При сравняване на изследваните параметри в серум и слюнка е установено, че слюнката не е пасивен ултрафилтрат на серума и съставът ѝ е в тясна

взаимовръзка с физиологични и патологични състояния на индивида. За първи път в България се изследват показатели на ОС в слюнка и серум при хронични заболявания на ГИТ, като се доказва ролята им в патогенезата на хроничния възпалителен процес. Доказва се по-добрият диагностичен потенциал на някои от слюнчените биохимични параметри и показатели на ОС в сравнение със съответните им серумни показатели, както при НР инфекция, така и при разграничаване фазите на активност на хроничното чревно възпаление. За пръв път в България е проучена и обективизирана ролята на ензима ADA като маркер отразяващ системните процеси, проявяващи се при хроничното чревно възпаление. Потвърдена е високата диагностична надеждност на FC, като специфичен и чувствителен маркер за локалното чревно възпаление, приложим както в диагностиката, така и в мониторирането и прогнозата на ХВЧЗ.

#### **IX Преценка на публикационната дейност, свързана с дисертационния труд**

Публикациите във връзка с дисертационния труд са 3 в реферирани медицински списания. Представени са и 11 доклада от национални и международни научни форуми. Две от публикациите имат общо 7 цитирания (1 от български автор и 6 от чуждестранни автори).

Авторефератът е оформен според изискванията. Съдържа 100 страници, структуриран е правилно и възпроизвежда в синтезиран вид най-съществените моменти от дисертационния труд във всичките му раздели. Включени са 40 таблици и 37 фигури

#### **X Лични впечатления, критични бележки и препоръки.**

Познавам д-р Марияна Георгиева Йорданова от 2004г. Личните ми впечатления от нея са положителни – показва организационни умения, прецизност, чувство за висока отговорност към поетите задължения и висока квалификация като лабораторен лекар. Нямам критични забележки и препоръки.

#### **XI Заключение**

Представеният дисертационен труд е собствена разработка на изключително актуална тема с важни и значими научно-практически приноси. Д-р Марияна Георгиева Йорданова демонстрира придобити теоретични и методични познания и професионална компетентност, като е изпълнила планираните задачи точно и систематично. Считаю, че дисертационният труд по обем, съдържание и актуалност отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в република България и препоръчвам на уважаемото Научно жури да присъди на д-р Марияна Георгиева Йорданова образователна и научна степен „Доктор” по професионално направление 7.1 Медицина, научна специалност „Клинична лаборатория”

10.03.2021

Варна

Изготвил рецензията:.....

(проф. д-р Ивайло Въжаров, д.м.)