

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Красимира Илиева Икономова, дм  
Началник Клинична лаборатория и имунология  
Национална многопрофилна транспортна болница – София  
на дисертационния труд за придобиване образователно-научна степен „Доктор”  
на  
Д-р Марияна Георгиева Йорданова

### СРАВНИТЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА БИОХИМИЧНИ МАРКЕРИ В РАЗЛИЧНИ БИОЛОГИЧНИ МАТРИЦИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНИЯ ТРАКТ

Научен ръководител: доц. д-р Даниела Иванова Герова, д. м.  
Научен консултант : проф. Маргаритка Бончева, д.м.  
Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт  
Професионално направление: 7.1. Медицина  
Научна специалност: Клинична лаборатория

Хроничните стомашно-чревни заболявания обикновено протичат скрито и незабележимо, а наличието на изразена симптоматика се установява в напредналите стадии на заболяването. Своевременната и ранна диагностика се основава на използването на достъпни, чувствителни и специфични биомаркери, получени по неинвазивен начин. Слюнката и фецесът са естествено свързани с гастро-интестиналния тракт. Неинвазивното и лесно добиване на тези биологични материали е щадящо и приемливо за пациентите. Изследването им се явява алтернатива за избягване на честите и рискови ендоскопски манипулации, предприемани при проследяване хода на хроничните гастро-интестинални заболявания. Съставът на слюнката и фецеса се променя както при локални, така и при системни заболявания. В хода на патологичния процес част от тези промени могат да се установят чрез класически кръвни изследвания, показващи активност на възпаление, промяна в ензимната активност, наличие на антитела срещу различни структури на гастроинтестиналния тракт. Поставянето на категорична диагноза се основава на морфологичните промени, обективизирани с ендоскопско изследване. Сравняването на промените в слюнка, серум и фецес с обективната находка от гастро и колоноскопията спомага за подбор на перспективни биомаркери.

С навлизането на нови високочувствителни технологии като масспектрометрия, полимеразна верижна реакция, микрочипове и наносензори, се стигна до идентифицирането и характеризирането на нови слюнчени компоненти. Тук се включват ДНК, РНК, протеини, метаболити и микроорганизми с важно диагностично значение и приложение. Въведено е понятието „саливомика“, което отразява знанията за различните комплексни и динамични съставки в слюнката. Увеличеният брой на идентифицираните и охарактеризирани слюнчени компоненти разширява диапазона на приложение на слюнката за диагностичния процес на

множество заболявания. Това определя темата на предложения за рецензия труд като актуална, съвременна и значима.

Дисертационният труд е написан на 216 стандартни страници. Структуриран е по следния начин: заглавна страница, списък на използваните съкращения и съдържателен текст на дисертацията, групиран в глави: въведение – 2 стр., литературен обзор – 40 стр., цел и задачи – 2 стр., материал и методи – 10 стр., резултати и обсъждане – 121 стр., изводи – 2 стр., приноси – 2 стр. Дисертационният труд е онагледен с 52 таблици и 53 фигури. Библиографската справка включва 413 литературни източника, от които 3 на кирилица и 410 на латиница. Болшинството от статиите са публикувани през последните десет години.

**Литературният обзор** обхваща 4 раздела. Направен е общ преглед на хроничните гастроинтестинални заболявания – гастрити, язвена болест, възпалителни заболявания на червата – улцерозен колит и болест на Крон. Изтъкната е връзката на инфекцията с хеликобактер пилори и хроничните гастрити. Разгледани са имунните механизми за възникване на възпалителните чревни заболявания. Проследени са основните лабораторни показатели при стомашно-чревните заболявания – маркери на възпаление (CRP, CYE), имунологични маркери – антителата против дрождите *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), pANCA, аденозин дезаминаза (ADA), реактивни кислородни и азотни радикали (ROS и RNS), фекален калпротектин (FC).

Специално внимание е обърнато на слюнката като перспективна биологична матрица. Подробно е разгледан биохимичният и клетъчен състав на слюнката, ролята и в специфичния и неспецифичния имунитет, участието ѝ в оксидативния стрес и антиоксидантна защита. Описани са най-честите фактори, променящи състава и защитната способност на слюнката – тютюнопушене и употреба на алкохол. Подробно е разкрито приложението на слюнката в съвременния диагностичен процес. Значителни промени в слюнката се наблюдават при заболявания на устната кухина. В оралната течност се доказват редица инфекциозни причинители – хепатит А, хепатит В, хепатит С, ХИВ, COVID19. Слюнчени промени се наблюдават при редица аутоимунни, сърдечно-съдови, бъбречни и злокачествени заболявания. Развитието на технологиите през последните две десетилетия направи възможно стандартизирането на хормоналния анализ (кортизол, тестостерон, естрадиол, прогестерон) в оралната течност. Слюнката е утвърден биологичен материал за изследване в областта на съдебната медицина и токсикологията.

Поради факта, че слюнката не е рутинно използван в лабораторията биологичен материал, за употребата ѝ в клиничната практика е необходимо стандартизиране на преаналитичните изисквания. Съществуват противоречиви данни относно вариациите на слюнчените анализи в зависимост от пол, възраст и въздействие на различни екзогенни фактори. Разнопосочни са данните за референтните граници на редица слюнчени биохимични показатели и клетъчните елементи. Не е достатъчно изяснена промяната в слюнчените изследвания в зависимост от активността и тежестта на патологичния процес по-специално при гастро-интестиналните заболявания. Не са проучени корелационните взаимоотношения между нивата на редица показатели в серум и слюнка в състояние на здраве и болест.

Като цяло литературният преглед показва добра информираност, критичен анализ и

логично обединяване на научните факти. Изводите от литературния преглед са логични и правят плавен преход към следващата глава на дисертационния труд.

**Целта на дисертационния труд** е 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

**Целта** е формулирана ясно и точно. Логично са изведени и **7 конкретни задачи**.

**Материали и методи.** В изследването са включени 300 индивида – 114 със заболявания на гастроинтестиналния тракт (54 с хронични възпалителни чревни заболявания и 60 с хроничен гастрит) и 186 здрави доброволци. От всяко лице са взети кръв и слюнка. Фекални проби са събрани от цялата пациентска група, както и от двадесет и пет лица от контролната група. Изследваните хематологични показатели включват кръвна картина и СУЕ, а от биохимичните показатели са определяни алфа-амилаза, лактат-дехидрогеназа (LDH), пикочна киселина, общ белтък, албумин, желязо, CRP, IgA, аденозин-дезаминаза (ADA). За определяне показателите на оксидативен стрес в серум са използвани d-ROMs тест (определящ концентрацията на реактивни кислородни форми – ROS) и BAP тест, предназначен за определяне на общия антиоксидантен потенциал на плазмата. Диагностиката на хеликобактерната инфекция се извършва по два способа – количествено определянето на IgG антитела в серум и антиген тест във фецес. Изследваните лабораторните показатели в слюнка включват pH, относително тегло, sIgA, общ белтък и албумин, пикочна киселина, алфа-амилаза, лактат-дехидрогеназа. Като показатели за оксидативен стрес и антиоксидантна защита са определяни нитрити, d-ROMs тест, антиоксидантен капацитет на слюнка (Saliva Antioxidant capacity Test – SAT). Определянето на клетъчния състав на слюнката включва флуоцитометрично изследване на еритроцити, левкоцити, епителни клетки и бактерии. Във фецес е изследван калпротектин и антиген за хеликобактер пилори. Използваните лабораторни методи са съвременни и надеждни. Те дават възможност за получаване на достоверни резултати, съответстващи на общоприетите световни стандарти за подобен род проучвания. Получените резултати са обработени със съвременни статистически методи.

**Резултатите**, значителна част от които са публикувани, са представени в 7 раздела. Те са логично систематизирани и добре онагледени с подходящи таблици и фигури. След всеки раздел е направено обсъждане, насочено към всеки конкретен проблем.

В първия раздел са представени резултатите от апробиране и валидиране на аналитични методи за изследване на характерни биохимични и клетъчни маркери в слюнка. Съобразно преданалитичните изисквания са разработени и приложени правила за събиране, обработка и съхранение на орална течност. Оптимизирани и валидирани са методи за изследване на следните слюнчни показатели – реактивни кислородни радикали (d-ROMs тест), антиоксидантен капацитет (SAT тест), нитрити, секреторен имуноглобулин IgA. При оптимизирането и валидирането на методите са спазени всички изисквания на Стандарт БДС EN ISO/IEC 17025. Изследваните характеристики на изредените по-горе методи показват висока аналитична надеждност, гарантираща качествени и достоверни резултати.

При изследване влиянието на пола и възрастта върху слюнчените показатели не е

установена съществена биологична вариация. Тютюнопушенето обаче води до значителни промени – увеличава стойностите на показателите, свързани с възпалителни и некротични тъканни промени (лактат-дехидрогеназа и нитрити, общ белтък и албумин), а параметрите, отговорни за имунната защита на оралната мукоза (sIgA и пикочна киселина) намаляват. При пушачи всички изследвани клетъчни елементи (левкоцити, еритроцити, епителни клетки, бактерии) са с по-високи стойности.

Определени са референтните граници на редица слюнчени показатели. Процедурата е извършена съобразно препоръките на IFCC. Референтните граници са основани на представителна извадка от българската популация и са сравними с границите от подобни изследвания.

При оценка на оксидативния стрес в слюнка и серум при здрави не са установени възрастови и полови различия. В слюнка и серум на пушачи е установено статистически значимо нарастване на оксидантите и значимо намаление на слюнчения антиоксидантен капацитет (АОС).

От извършеното количествено сравнение на анализи от серум и слюнка е установено, че общият белтък и албуминът са с по-ниски концентрации в слюнката. Пикочната киселина, рН, IgA са в приблизително еднакви количества в серум и слюнка, докато алфа-амилазата, лактат-дехидрогеназата и нитритите са в по-високи концентрации в слюнката. При здрави индивиди не е доказана значима корелационна взаимовръзка между изследваните биохимични параметри в слюнка и серум. Различните съотношения на слюнчените компоненти в сравнение с тези в серума показват, че слюнката не е просто пасивен "ултрафилтрат" на серума, а съставът ѝ се определя от множество локални и системни фактори.

**Пациентите с гастрити** са разделени както по отношение на наличие и липса на инфекция с хеликобактер пилори, така и по ендоскопската характеристика на гастрита – еритематозен, ерозивен и атрофичен. От всички изследвани биохимични показатели в слюнка с най-добър диагностичен потенциал за хронични гастрити показват LDH, албумин и нитрити.

При пациенти с хеликобактер пилори положителен гастрит е доказано е статистически значимо нарастване на броя на еритроцитите, левкоцитите и епителните клетки в слюнката. В серума на същата група пациенти се установяват по-високи нива на ROS и намаление на антиоксидантния капацитет. Те корелират в умерена степен и статистически значимо с ендоскопските промени в стомашната лигавица. Диагностичен потенциал на изследваните слюнчени и серумни параметри при хроничните гастрити е както следва – серум: ВАР, dROMs, CRP, слюнка: лактат-дехидрогеназа, албумин, нитрити, sIgA, алфа-амилаза, общ белтък.

**Пациентите с хронични възпалителни заболявания на червата** са разделени по отношение активността на заболяването (активна форма, лека форма или ремисия) и по отношение на терапията (монотерапия и комбинирана терапия).

Степенуването на диагностичния потенциал на слюнчените параметри е както следва – лактат-дехидрогеназа, sIgA, алфа-амилаза, албумин, пикочна киселина, нитрити, общ

белтък. При пациентите с активна форма на заболяването в слюнка и серум се установяват значимо по-високи стойности на ROS спрямо пациентите с лека форма или ремисия, както и спрямо контролната група. Установена е значителната позитивната корелационна зависимост между генерираните ROS и индексите на възпалителна активност (CDAI – за болест на Крон, Mayo индекс – за улцерозен колит). В хода на възпалителния процес са установени и статистически значими различия в броя на слюнчените левкоцити и епителни клетки.

Фекалният калпротектин показва сериозно покачване при пациентите с активна форма на възпаление на червата (над 45 пъти в сравнение с контролната група) и умерено покачване (над 9 пъти в сравнение с контролната група) при пациентите с лека форма или ремисия. Изследването е с висока диагностична надеждност, служи за разграничаване на пациентите с различна активност на заболяването и е маркер за поява на усложнения в бъдеще.

Серумните концентрации на ADA са значимо по-високи при пациентите с умерена и тежка форма на заболяването в сравнение с тези с лека форма, както и с контролната група. ADA участва в имуно-медиацията възпалителен процес на червата, притежава по-добър диагностичен потенциал от рутинно използваните серумни възпалителни маркери и се явява обещаващ допълнителен биомаркер за чревно възпаление.

**Обсъждането на резултатите** е направено след всеки раздел. Считам това за удачна форма, тъй като се получава по-ясна представа за всеки отделен проблем. Авторката се е справила отлично, като е успяла да съчетае информацията от богатата си литературна справка с интерпретацията на собствените си резултати. Д-р Йорданова показва широка осведоменост по отношение физиологията, патофизиологията и биохимията на гастро-интестиналната система. Познанията ѝ върху микробиологията и имунологията на стомашно-чревния тракт са предпоставка за задълбочен анализ на получените резултати. Удачно подбраните статистически методи са способствали за разкриване на допълнителна информация при обработката на данните.

**Изводите** на дисертационния труд - 13 на брой - са ясно и точно дефинирани. Те произтичат от резултатите и отговарят на поставените цел и задачи.

Изтъкнати са **6 приноса** – 8 с научно-приложен характер и 1 с потвърдителен характер.

Проведено е уникално до момента изследване на множество биохимични показатели, клетъчни елементи и показатели на оксидативен стрес в нестимулирана слюнка. Определени са референтните граници на изследваните параметри в слюнка при репрезентативна група от българската популация. Установени са биологични вариации в зависимост от пол, възраст и тютюнопушене. Оптимизирани и валидирани са методи за количествено определяне на показателите на оксидативен стрес (ROS И AOC), нитрити и sIgA в слюнка. 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 оксидативен стрес в слюнка и серум при хронични заболявания на гастро-интестиналния тракт и е доказана ролята им в патогенезата на хроничния възпалителен процес. При сравняване на серумни и слюнчни показатели е доказан по-добър диагностичен и прогностичен потенциал

на някои от слюнчените биохимични параметри и показатели на оксидативен стрес. Това дава предимство на слюнчните показатели при разграничаване фазите на активност при хроничните гастро-интестинални заболявания. За пръв път в България е проучена и обективизирана ролята на серумния ензим аденозин-дезаминаза като маркер, отразяващ системните процеси, проявяващи се при хроничното чревно възпаление. Потвърдена е високата диагностична надеждност на фекалния калпротектин като специфичен и чувствителен маркер за възпаление на червата. Изследването може успешно да се прилага както при диагностиката, така и при мониториране на чревните заболявания.

Споделям приносите на труда, които имат както научнотеоретичен, така и научноприложен характер. Те са с висока национална и международна научна и практическа стойност.

**Публикациите** във връзка с дисертационния труд са 3 в реферирани медицински списания. Представени са и 11 доклада от национални и международни научни форуми.

**Авторефератът** отговаря на изискванията. Отразява в синтезиран вид най-съществените моменти от дисертационния труд във всичките му раздели.

**В заключение**, въз основа на представения ми материал, считам че д-р Марияна Георгиева Йорданова е придобила теоретични и методични познания и професионални умения, като е изпълнила планираните задачи точно и систематично. Считам, 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 образователната и научна степен „Доктор” по професионално направление 7.1 Медицина, научна специалност „Клинична лаборатория”.

03.03.2021.  
гр. София

Проф. д-р Красимира Илиева Икономова, дм