



До
Председателя на Научно жури,
определено със Заповед № Р– 109-38/ 21.01.2021г.
на Ректора на Медицински университет
“Проф. д-р Параскев Стоянов” - Варна
ул. „Марин Дринов” №55,
9002 Варна, България

СТАНОВИЩЕ

от

ДОЦ. Д-Р МИЛЕНА ГЕОРГИЕВА ВЕЛИЗАРОВА, ДМ
Катедра по клинична лаборатория, МФ, МУ-София, външен член
на научното жури, заповед № Р– 109-38/ 21.01.2021г.

Относно:

Защита на дисертационен труд на тема
**„СРАВНИТЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА БИОХИМИЧНИ
МАРКЕРИ В РАЗЛИЧНИ БИОЛОГИЧНИ МАТРИЦИ ПРИ
ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ГАСТРО-
ИНТЕСТИНАЛНИЯ ТРАКТ”**

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”
на **Д-Р МАРИЯНА ГЕОРГИЕВА ЙОРДАНОВА**

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт,
Професионално направление: 7.1. Медицина, Научна специалност:
Клинична лаборатория

Научен ръководител: доц. д-р Даниела Иванова Герова, д.м.
Научен консултант: проф. Маргаритка Бончева, д.м.

Уважаеми г-н Председател,
Уважаеми членове на Научното жури,

Представените от д-р Марияна Йорданова дисертационен труд, автореферат и допълнителни документи са в съответствие на Регламента за придобиване на ОНС „Доктор” и Правилника на МУ“Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна.

ТЕМАТА на дисертационния труд е съвременна и актуална за българската медицинска практика, като фокусът е насочен към търсене, сравнение и валидиране на биомаркери за неинвазивна диагноза на хронични гастро-интестинални заболявания (ГИЗ). Съвременните епидемиологични проучвания показват, че въпреки напредъка в развитието на медицинските технологии, поради страха от инвазивни изследвания, гастро-интестиналните заболявания са често диагностицирани в напреднал или усложнен стадий. Цел на съвременната гастроентерологична диагностика е откриване и въвеждане на специфични маркери, които да отразяват локалните процеси на възпаление и да корелират добре с ендоскопската и хистологична находка, с което да се спомогне на диагностиката, мониторирането и терапевтичното управление на заболяванията на ГИЗ, както и да се намали процента на инвазивните ендоскопски изследвания. Желателно е тези биомаркери да могат да се изследват в неинвазивно добит биологичен материал, да са медицински надеждни (по отношение на чувствителност, специфичност, отрицателни и положителни предсказващи стойности), лесно изпълними и евтини.

Дисертационният труд е написан на 216 страници, правилно структуриран в отделни раздели- Въведение -2 стр.; Литературен обзор- 40 стр.; Цел и задачи- 2 стр.; Материал и методи – 10 стр.; Резултати и обсъждане- 125 стр.; Обобщени изводи и приноси -3 стр.; Библиография-24 стр.;

ЛИТЕРАТУРНИЯТ ОБЗОР е обтоен, с подробно представяне на хроничните стомашно-чревни заболявания като сериозен социален и медицински проблем за съвременния човек в световен мащаб. Причините за развитие на ГИЗ са разнообразни, често действат едновременно и се свързват с нарушения в хранителния режим, хроничен стрес, вредни навици, неконтролна употреба на медикаменти, лоша устна хигиена и контаминация с *Helicobacter pylori* (HP), доказал своята етиологична роля в язвената болест и рака на стомаха. Възрастовото разпределение на ГИЗ показва по-висока честота на хроничните гастрити при пациенти над 50 годишна възраст, намаление на язвената болест в същата възрастова група и тенденция към нарастване на честотата на хроничните възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ) в млада възраст. Често тези заболявания се откриват трудно и късно и водят до сериозни увреждания. Затова усилията са насочени към ранна и надеждна диагностика на ГИЗ с цел подобряване на качеството на живот на пациентите и превенция на злокачествени заболявания.

В литературния обзор са описани нови подходящи биомаркери с техните предимства, недостатъци и медицинска надеждност за скрининг и диагноза на ГИЗ - ензимът аденозин дезаминаза (имуно-медиран механизъм на ГИЗ), ROS и RNS (за оценка на оксидативен стрес), фекален калпротектин (наличие на чревно възпаление) и др. Търсенията са насочени към валидиране на биомаркери, изследвани в биологичен материал, получен по неинвазивен път.

Слюнката отдавна привлича вниманието на специалистите относно възможността да се използва като заместител на рутинно използваните кръвни проби и/или други телесни течности за диагноза и мониториране състоянието на здраве и болест. Разгледани са подробно възможностите за изследване на слюнка и значението на слюнчените биомаркери в съвременния диагностичен процес. Анализите на слюнка се използват за проучвания при заболявания на устната кухина, инфекциозни заболявания (вкл. PCR

детекция на *nCoV-2019*), автоимунни заболявания (синдром на Sjögren, лупус, пемфигус и др.), злокачествени заболявания (първични образувания в устната кухина, метастази, туморни биомаркери). В световен мащаб са създадени и утвърдени саливарни мултиплексни тестове за откриване на остър миокарден инфаркт, хормонална и токсикологична диагностика, нанобиочипова ПОСТ система CARDIUS за скрининг на остър миокарден инфаркт, ПОСТ тест, одобрен от FDA, за проследяване на фертилния цикъл при жената, както и за оценка на риска от преждевременно раждане.

Използването на слюнчената течност като диагностичен инструмент е аналитично предизвикателство, свързано с високата вариабилност на биоактивните съединения в пробите, както и с липсата на установени референтни стойности за повечето рутинни лабораторни параметри. Допълнително затруднение създават подготовката на пациента и техниките на вземане на проби от слюнка. Освен това повечето от биомаркерите, изследвани в слюнка не са корелирани със съответните им плазмени показатели.

ЦЕЛТА на дисертационния труд е формулирана ясно и точно, а оменно: 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 изпълнението на тази цел докторантът си е поставил 7 задачи, които са последователно и логично изложени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ. В дисертационния труд са включени общо 300 индивида, - 114 са със заболявания на гастро-интестиналния тракт (ГИТ), а 186 са здрави доброволци. Критериите за включване са добре дефинирани и успешно разграничават индивидите в двете групи. Научното проучване е одобрено от Комисията по етика на научните изследвания на МУ-Варна. В аналитичната част са използвани стандартизирани процедури за получаване на биологични проби. Всички използвани методи, принципи, контролни материали, калибратори и автоматични аналитични платформи са коректно описани и валидирани за *in vitro* диагностика. Уместно са подобрени аналитични програми, които са с по-добри оптимални условия за измерване на аналити в ниски концентрации, както е в слюнката. Използвани са съвременни статистически програми за обработка на получените резултати.

РЕЗУЛТАТИТЕ са добре описани и онагледени с 53 фигури и 52 таблици. Изложението съответства на последователността на формулираните задачи за изпълнение. **ОБСЪЖДАНЕТО** е направено много подробно, като получените собствени резултати са дискутирани по отношение на тяхната клинична значимост и в сравнение с публикуваните международни база данни. При оптимизирането и валидирането на методите за количествено определяне на sIgA, d-ROMs, SAT и нитрити в слюнка са спазени всички изисквания на Стандарт БДС EN ISO/IEC 17025, спомагащ компетентността на лабораториите за изпитване и калибриране на количествени лабораторни методи с цел подобряване възможността за генериране на валидни резултати. Аналитичната надеждност е оценена по стандартна процедура чрез определяне на линейност на метода, долна граница на откриване (LOD), границата на количествено определяне (LOQ), точност, достоверност и метод на аналитичната добавка. Получените резултати от верификацията и валидацията на методите доказват висока аналитична надеждност и пригодност за целите на проучването.

Проучена е възрастова и полово обусловената вариация на 7 биохимични аналити и на клетъчните компоненти в слюнка, без да се наблюдават съществени вариации в изследваните биохимични параметри и клетъчни елементи в нестимулирана слюнка от здрави лица. Докторантът представя убедителни резултати от оценката на ефектът от потпопушенето върху слюнчения състав. Установени са статистически значими

вариации при сравнение между пушачи и непушачи в тези биохимични показатели и клетъчни компоненти, които се свързват с възпалителни и некротични тъканни промени (LDH, нитрити, левкоцити и епителни клетки) или участват в специфичната и неспецифична имунна защита на оралната мукоза (sIgA и UA). Нарушения баланс между оксиданти и антиоксиданти в слюнката обуславя наличието на оксидативен стрес при пушачи, като същата диспропорция се доказва и серума на изследваните лица.

Една от задачите на дисертационния труд е да бъдат установени референтни граници, съобразени със специфични регионални и традиционни условия на бит и култура. Повечето изследователи не определят собствени референтни граници и се основават на упоменатите в брошурите на китовете, с които работят. Докторантът е подбрал добре аргументиран подход по отношение на хомогенността на референтната група индивиди, създаването на референтни условия, подбор на аналитичен метод и избор на статистически метод за обработка на получени резултати от изследване на отделните параметри. Този процес е трудоемък и изисква строго стандартизиране на всички референтни условия, което има значителен принос и повишава стойността на дисертационния труд.

Докторантът е направил задълбочено проучване на взаимовръзката между саливарни и серумни нива при пет показателя (ALB, TP, sIgA, LDH и UA). Отсъствието на корелативни зависимости се потвърждава и от изследванията на редица автори, които също не откриват корелация между слюнчените и серумни нива за повечето показатели, изследвани при здрави индивиди. Вероятно това се дължи на факта, че слюнката не е просто пасивен "ултрафилтрат" на серума и съставът ѝ се определя от разнообразни фактори, водещи до различни съотношения на нейните компоненти в сравнение с тези в кръвен серум.

Една съществена част и акцент на дисертационния труд е изследването на избрани биохимични маркери и клетъчни елементи в слюнка и серум от пациенти с хронични ГИЗ, които са свързани с възпалението, оксидативния стрес и имунологичните механизми на защита. Поради специфичните промени при инфекция с *Helicobacter pylori* (HP), пациентите с HP (+) хронични гастрити са отделени и коментирани в отделна група.

Изследването на клетъчния състав на слюнката представлява интересно предизвикателство поради липсата на публикувани литературни данни за промените при норма и патология. Вероятно настоящото проучване е едно от първите, в което се обръща задълбочено внимание на клетъчния състав на слюнката и клиничната значимост на лабораторните находки.

Значим научен и приложен принос на дисертационния труд е корелационния анализ на ендоскопските промени в стомаха и изследваните параметри в слюнка и серум. В настоящето проучване CRP е изследан в серум, а не в слюнка, където стойностите му са изключително ниски и се изискват специално разработени аналитични методи и платформи. Установени са сигнификантно по-високи серумни нива на CRP при пациенти с HP (+) хронични гастрити, дори и без ясна клинична симптоматика в сравнение с HP (-) хронични гастрити и здрави лица. Наличието на умерена и статистически значима позитивна корелация между слюнчените нива на албумин и тези на серумния CRP е поредно доказателство за значимостта на слюнчения албумин при изследване на HP (+) пациенти.

Логичен завършек на теоретичната и практическата част на дисертацията са ИЗВОДИТЕ (13 на брой). Направени са заключения по всички поставени задачи, което показва последователност в изпълнението им и критичен подход към интерпретацията на резултатите. Наред с успешното валидиране и верифициране на методите за количествено определяне на sIgA, ROS, AOC и нитрити в слюнка, определяне на референтни граници на някои показатели в слюнка и корелационната връзка между изследваните биохимични

параметри в слюнка и серум, докторантът прави предложение за въвеждане в рутинната практика на допълнителни биомаркери за мониториране активността на ГИЗ.

От съществена значимост за стойността на дисертационния труд са ПРИНОСИТЕ с оригинален характер, които са представени в две направления: научно-приложни и потвърдителни. Прави впечатление, че повечето приноси са иновативни и се дължат на проучвания, които правят за пръв път в България.

Библиографията съдържа 413 източника, от които 3 на кирилица, като 129 (31%) от тях са от последните 5 години. В подготовката на дисертационния труд докторантът е използвал най-съвременни данни, публикувани в световната литература, както и исторически данни за цялостен преглед и оценка на разглеждания проблем. Препоръчвам да се стандартизира цитирането на литературните източници, тъй като това е направено по различен начин за представените публикации.

Д-р Йорданова представя 3 публикации, свързани с дисертационния труд- 2 в чуждестранни и 1 в българско списание. Резултатите от проведените проучвания по темата на дисертацията, са представени на 11 научни форуми у нас и в чужбина под формата на постери.

Авторефератът е добре структуриран в 99 стр., онагледен с 40 таблици и 37 фигури, като отразява основните раздели и същността на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на **д-р Марияна Георгиева Йорданова** е с висока научна и практическа стойност, обхваща богат теоретичен и клиничен материал, отговаря на критериите на Закона за развитие на академичния състав в република България и Правилника за неговото приложение, както и на Правилника на МУ-Варна за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“.

Всичко това ми дава основание да предложа на високо уважаваното НАУЧНО
ЖУРИ да присъди **ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“** на
Д-Р МАРИЯНА ГЕОРГИЕВА ЙОРДАНОВА.

08.03.2021

С уважение: 
Доц. д-р М. Велizarова, дм