

ДО:
ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО ЖУРИ
ОПРЕДЕЛЕНО СЪС ЗАПОВЕД
№Р-109-210/27.04.2021 година.
НА РЕКТОРА НА МУ-Варна
ПРОФ. ВАЛЕНТИН ИГНАТОВ, ДМН
гр. Варна

РЕЦЕНЗИЯ

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

Относно:

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД НА ТЕМА
„ПЪРВИЧНА, ПОСТЕРИТРЕМИЧНА, ПОСТТРОМБОЦИТЕМИЧНА МИЕЛОФИБРОЗА –
УЧАСТИЕТО НА ИНФЛАМАТОРНИ ЦИТОКИНИ (INTERLEUKIN 6, INTERLEUKIN 8)
И РЕГУЛАТОРИТЕ НА ЖЕЛЕЗНИЯ МЕТАБОЛИЗЪМ (ХЕПСИДИН) В ПАТОГЕНЕЗАТА НА
АНЕМИЧНИЯ СИНДРОМ”

за придобиване на образователната и научната степен „ДОКТОР” по направление 7.
Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина и научна специалност
„Хематология и переливане на кръв”

Научен ръководител – доц. д-р Илина Димитрова Мичева, дм

Д-р Стела Костова Димитрова

докторант към

Катедра “Вътрешни болести”, Факултет „Медицина“, Медицински университет-Варна

УВАЖАЕМА Г-ЖО ПРЕДСЕДАТЕЛ НА НАУЧНО ЖУРИ,

Предоставям на Вашето внимание рецензия относно дисертационния труд за получаване на образователната и научна степен „доктор” от докторант Д-р Стела Костова Димитрова съгласно изискванията на Правилника за развитието на академичния състав в Медицински университет «Проф. Д-р Параскев Стоянов» - Варна във връзка със заповед №Р-109-210/27.04.2021 година на Ректора на МУ-Варна.

I. Кратки биографични данни за докторанта:

Д-р Стела Костова Димитрова завършва висше образование магистър по медицина във Медицински университет “Проф. д-р Параскев Стоянов” през 2014 год. Придобива медицинска специалност по Клинична хематология (2019 год.). Професионалното развитие на докторантката включва работа като лекар в Клиниката по хематология, УМБАЛ Св.Марина - Варна (от 2015 год), а от 2017 год. и като асистент към МУ-Варна.

Още от студенските си години д-р Стела Костова Димитрова работи за присъединяване към активната научна общност. Участва в обмен на студенти към програма за сътрудничество между МУ-Варна и Първи държавен университет „Сеченов“, Москва (2012 год.), а като дипломиран лекар осъществява кратки специализации в Клиника по хематология и Център по

Трансфузиология към Първи държавен университет „Сеченов“, Москва – двуседмична специализация (2017 год.) и в Трансплантационно отделение, Клиника по хематология на Медицински Университет в гр. Любляна, Словения (2018 год.). През 2018 год. преминава 6-месечно обучение в класическия Masterclass, организиран от Европейската хематологична асоциация и през 2019 год. успешно преминава Европейски хематологичен изпит. Активно се включва в дейността на Българското медицинско сдружение по хематология.

Д-р Стела Костова Димитрова е публикувала 5 статии в научни списания, три от които по темата на настоящата докторантура. Участвала е с доклади и постери на международни и национални симпозиуми и конференции.

II. Обща оценка на дисертационния труд:

Представеният дисертационен труд е посветен на трайно **актуален научно-медицински проблем** – миелопролиферативната неоплазия миелофиброза (МФ). Миелофиброзата е клонално разстройство на хемопоетични стволови клетки, характеризиращо се със спленомегалия (поради екстремедуларна хемопоеза), хиперкатаболни симптоми (поради свръхекспресия на възпалителни цитокини) и анемия (поради костномозъчна недостатъчност и хиперспленизъм). Заболяването поражда костномозъчната стволово-клетъчна ниша, при което в допълнение към прогресивната фиброза, настъпва абнормна експресия на цитокини, която провокира както локално, така и системно възпаление. Един от ефектите на проинфламаторната среда е нарушаване на процесите на еритропоеза. Повишената дисрегулация на възпалителните цитокини в костния мозък на пациенти с МФ е свързано и с дисрегулация на циркулиращия хепцидин, което пречи на метаболизма и използването на желязо. В резултат настъпва анемия, която е сред основните характеристики на заболяването и се свързва с по-ниско качество на живот и неблагоприятна прогноза. Независимо от интензивните проучвания на тази нозологична категория и появяващите се терапевтични опции, анемията остава до голяма степен неразрешен проблем. Проучванията на факторите, участващи в патогенезата ѝ, са безспорно актуални и перспективни.

Дисертационният труд, представен от докторант д-р Стела Костова Димитрова **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 Стела Димитрова |
|---------------------|---|------------------------|-----------------------------------|
| А | 1. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ | 50 | 50 |
| | ОБЩО ЗА ГРУПА „Г“ | 30 | 65 |
| Г | 7. Научна публикация и доклади в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация | 60/n | 50 |
| | 8. Научна публикация и доклади в научни издания в нереперирани списания с научно рецензиране или публикувани и редактирани колективни томове. | 30/n | 15 |

1. Дисертационният труд е представен във вид и обем от общо 123 страници, като съдържа: съдържание (4 страница); използвани съкращения (3 страници); изложение, структурирано в следните раздели - I. литературен обзор (50 страници); II. работна хипотеза, цел и задачи (1 страница); III. изследователски материали и методи (5 страници); IV. резултати от проучването (31 страници); V. дискусия (11 страници); основни изводи от проведените изследвания, заключения и приноси (3 страници); приложение (4 страници - формуляр за информирано съгласие за вземане, съхранение и анализ на проби от биологичен материал); списък с публикации по темата (1 страница); използвана литература (23 страници). Библиографията включва 237 печатни източника на английски език, 29.5% от които са от последните години (2016-2020 год.). Резултатите от проведените изследвания са онагледени с 34 фигури и 2 таблици.

Приложен е автореферат в обем от 67 страници, който отразява основните моменти на дисертацията и съдържа (1) списък на публикациите във връзка с дисертационния труд, който включва 3 публикации (1 на английски език и 2 на български език), от които 2 са в реферирани в Web of Science ± Scopus; и едно участие с постер в европейски конгрес; (2) справка с оригиналните и потвърдителни приноси на докторанта.

2. Дисертационният труд показва, че докторант д-р Стела Костова Димитрова притежава 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 миелофиброзата и патогенетичните фактори на асоциираната анемия в обем от 50 страници, структуриран в няколко основни направления:

2.1.1. Общ преглед върху миелофиброзата и анемичния синдром при нея. Разгледани са основните характеристики на заболяването, рисковите фактори, в т.ч. анемията и се обсъжда патогенезата на нейното развитие.

2.1.2. Регулация на метаболизма на желязото. Разгледани са, от една страна, механизмите на клетъчно и на системно ниво, както и ефектите на желязото върху клетъчния имунитет.

2.1.3. Представен е задълбочен преглед на синтеза, функциите и регулацията на хепцидина, както и връзката му със заболявания – възпалителни, автоимунни, онкологични и онкохематологични, в т.ч. миелопролиферативни неоплазии и миелофиброза.

2.1.4. Разделът върху проинфламаторната регулация на анемичния синдром се фокусира върху интерлевкин-6 (IL-6) и интерлевкин-8 (IL-8), изследването на които ще залегне в настоящия дисертационен труд. Разгледани са биологичните им роли, както и участието им в генезата на анемията при автоимунни, онкологични и онкохематологични заболявания. Специално внимание е посветено на миелофиброзата.

Анализът на представените в обзора данни позволяват на д-р Стела Костова Димитрова да се насочи към основното направление на проучванията, които да залегнат в настоящия дисертационен труд, и да формулира целта – да се изследва участието на хепсидина, IL-6 и IL-8 в патогенезата на анемията при миелофиброза. За постигането ѝ са формулирани и конкретните задачи: сравнителен анализ на серумните нива на хепсидина, IL-6 и IL-8 при пациенти с първична и вторична миелофиброза спрямо здрави контроли; корелация на изследваните биомаркери с основни клинично-лабораторни показатели и анализ на потенциала им за прогнозиране на хода на анемичния синдром и общата преживяемост.

2.2. Представените от докторант д-р Стела Костова Димитрова **Материали и методи** са подбрани в съответствие с поставената цел и основни задачи. Дисертационният труд се основава на изследването на общо 68 пациента с първична и вторична (пост-тромбоцитемична и пост-еритремична) миелофиброза, диагностицирани на базата на комплекс от диагностични

критерии, както и на 12 здрави контроли. Разделът не съдържа характеристиката на пациентската кохорта, но това е представено в раздела за резултати. Не така стои въпросът с контролната група здрави лица, за които на практика липсва каквато и да е информация.

Детайлно е представен ELISA методът, чрез който са определени еднократно серумните нива на човешки хепсидин-25, IL-6 и IL-8. За по-ясно разбиране на същността на извършените изследвания би било препоръчително представяне на принципа и същността на метода, а не само методичните стъпки съгласно инструкциите на производителя. Използван е пакет от статистически методи за анализ на дискретни и непрекъснати величини. Адекватно са указани диапазоните на стойностите на корелационния коефициент R, които демонстрират силата на евентуално установена корелация. За оценка на прогностичния потенциал на изследваните биомаркери по отношение на общата преживяемост на пациентите с миелофиброза съгласно задача №6 би било необходимо използване на съответните статистически методи, каквито не са залегнали в настоящата разработка.

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

- Представени са основните характеристики на пациентите, включени в проучването, както и подходите за групирането им по различни характеристики за целите на последващия анализ. Данните са представени в структуриран табличен вид и ни предоставят реален разрез на пациентите с миелофиброза в един голям клиничен център по отношение на основните демографски и клинично-лабораторни параметри.

- Проведен е сравнителен анализ на серумните нива на хепсидина, IL-6 и IL-8 при пациенти и при здрави контроли, на базата на който са построени ROC криви и докторантката дефинира съответните прагови стойности, които дискриминират нивата при пациенти и при здрави контроли. Така получените прагови стойности са залегнали в по-нататъшните анализи. Установено е, че пациентите с миелофиброза се характеризират с по-високи средни серумни нива на хепсидина, IL-6 и IL-8 спрямо здравите лица, но анализът на базата на определената прагова стойност потвърждава статистически сигнификантни различия само по отношение на хепсидина и IL-6.

- Анализирана е връзката на серумните нива на хепсидина, IL-6 и IL-8 с клинично-лабораторни и молекулярно-генетични характеристики на пациентите. Установена е слаба обратно-пропорционална корелация на серумните нива на хепсидина с хемоглобиновото съдържание и значимо по-ниски стойности на хемоглобина при пациентите с надпрагови стойности на IL-6. Това се транслира в по-високи трансфузионни нужди. На практика не се намира корелация с нивото на серумното желязо. Докторантката намира значима правопрпорционална връзка между феритина и IL-6. Набелязват се някои интересни асоциации със серумното желязо и феритина в отделни подгрупи, които обаче трудно биха могли да бъдат интерпретирани поради много малкия брой пациенти (фиг. 13-15). Така напр. на фигура 14 е представен сравнителен анализ между пациенти с пост-ПВ миелофиброза с ниско/високо серумно желязо, като общият брой на пациентите е само 9. Резултатите дават основание да се очаква, че набирането на по-голям брой пациенти в бъдещи проучвания биха могли да потвърдят важни асоциации с основни показатели на обмяната на желязото и анемичния синдром.

- Анализиран е прогностичния потенциал на серумните нива на хепсидина, IL-6 и IL-8 по отношение на риска от анемия. Установено е, че надпраговите нива на изследваните биомаркери са свързани с неколкократно завишен риск от развитие на анемия, като най-висок RR се намира по отношение на IL-6 [RR=10.58 (1.62-69.28)]. Независимо от заглавието, в което се посочва търсенето на зависимости с възникването и задълбочаването на анемията, не са

представени резултати в динамика, т.е. при колко пациенти заболяването е дебютирало с анемия и при колко тя е настъпила в хода на заболяването, както и при колко пациенти ниските нива на хемоглобина допълнително са се понижили и с колко. Тези данни биха обогатили разработката и дали възможност за допълнителни солидни изводи.

- Представени са резултати относно връзката между общата преживяемост, риска от смърт и изследваните биомаркери – по-висок риск от смърт при надпрагови стойности на хепсидина и IL-6, като съответно 76.9% и 88.4% от починалите са с надпрагови стойности. Не е посочен, обаче, броят на починалите пациенти, нито са представени данни за общата преживяемост.

- Докторантката дефинира т.нар. “рисков профил”, който включва едновременно надпрагови стойности на хепсидина, IL-6 и IL-8 и се установява при 32 пациента (47.1%). Данните показват, че “рисковият профил” се асоциира с мъжки пол, носителство на *JAK2 V617F* мутация, степен 3 на костномозъчна фиброза, симптоматична болест, анемия с високи стойности на феритин и трансфузионни нужди >2 единици еритроцитен концентрат/месечно.

2.4. В представения раздел **Дискусия** д-р Стела Костова Димитрова 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) по-високи серумни нива на хепсидина, IL-6 и IL-8 при пациенти с първична и вторична миелофиброза спрямо здрави лица. (2) връзката на по-високите нива на хепсидина с по-ниски стойности на хемоглобина, носителство на *JAK2 V617F* мутация, хемотрансфузионна зависимост и неблагоприятен риск определен по DIPSS; (3) наличието на правопрпорционална зависимост между изследваните биомаркери - хепсидин, IL-6 и IL-8. Изводите относно независимата прогностична роля на хепсидин, IL-6 и IL-8 по отношение на развитието на анемия и общата преживяемост се нуждаят от допълнителен анализ със съответни статистически методи (напр. мултивариационен анализ; Kaplan-Meier и log-rank test; Cox proportional hazard regression model).

2.5. Приемам следните формулирани от д-р Стела Костова Димитрова **Приноси**, обособени в две основни групи:

Оригинални приноси: за първи път в нашата страна е проведено изследване на серумните нива на хепсидин, IL-6 и IL-8 при пациенти с миелофиброза и е оценена връзката с основни клиничко-лабораторни показатели, в т.ч. свързани с анемичния синдром; дефиниран е “рисков профил”, който включва едновременно надпрагови стойности на хепсидина, IL-6 и IL-8 и са установени значими асоциации с характеристики на заболяването и параметрите на анемията.

Потвърдителни приноси: потвърдени са по-високите стойности на хепсидина, IL-6 и IL-8 при пациенти с миелофиброза спрямо здравите лица и тяхната връзка с анемичния синдром; потвърдена е правопрпорционалната връзка между хепсидина и проинфламаторните цитокини IL-6 и IL-8.

III. Препоръки и забележки.

- Част от забележките и препоръките са изложени в съответните раздели.
- Резултатите са представени само като % пациенти, без да е посочен конкретният им брой, което в част от анализите не дава реалната представа за размера на сравняваните кохорти. Някои от подгрупите са много малки, което не позволява надежден статистически анализ с използвания статистически пакет и, съответно, формулиране на солидно обосновани изводи.

- Не е посочено кога в еволюцията на заболяването е проведено еднократното изследване на хепсидина, IL-6 и IL-8. Вероятно при част от пациентите това е осъществено към диагнозата, а при други - в различни времеви точки, тъй като в изследването са включени пациенти и с >5-годишна история на миелофиброзата, като набирането им е стартирало през 2020 год. Не може да се изключат различия в стойностите на параметрите в различните етапи на заболяването, което би могло да повлияе на резултатите и основните заключения. Препоръчително е продължаване на проучванията в бъдеще, като данните се допълнят с динамично проследяване на изследваните параметри в съпоставка с клиничната история.
- Не е спазен единен стандарт при изписване на литературните източници.
- Тези констатации не променят труда по същество. Надявам се настоящите забележки и препоръки да бъдат полезни за по-нататъшните проучвания на докторантката, която демонстрира сериозна заявка за бъдеща научно-изследователска кариера.

IV. Заключение.

В заключение, представеният дисертационен труд на д-р Стела Костова Димитрова - докторант към Катедра "Вътрешни болести", Факултет "Медицина", Медицински университет-Варна, на тема „ПЪРВИЧНА, ПОСТЕРИТРЕМИЧНА, ПОСТТРОМБОЦИТЕМИЧНА МИЕЛОФИБРОЗА – УЧАСТИЕТО НА ИНФЛАМАТОРНИ ЦИТОКИНИ (INTERLEUKIN 6, INTERLEUKIN 8) И РЕГУЛАТОРИТЕ НА ЖЕЛЕЗНИЯ МЕТАБОЛИЗЪМ (ХЕПСИДИН) В ПАТОГЕНЕЗАТА НА АНЕМИЧНИЯ СИНДРОМ" 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-Варна.

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 СТЕЛА КОСТОВА ДИМИТРОВА.**

Изготвил становище:

17.06.2021 год.



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