

Научен секретар

МУ - Плевен

Вх. № НС-203/24.08.2021г.

СТАНОВИЩЕ

относно дисертационния труд на  
на асистент Георги Маринов Големанов,

докторант на самостоятелна подготовка  
в Катедра «Химия и биохимия», Факултета по фармация,  
Медицински университет – Плевен

на тема:

**Носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI -1  
и полиморфизъм PL A1/A2 в гена на тромбоцитен гликопротеин IIb/IIIa, като  
възможни рискови фактори за репродуктивни проблеми при жени със  
синдром на  
поликистозни яйчници**

представен за присъждане на научна степен “ДОКТОР”  
по научна специалност „Биохимия”,  
в област на висшето образование 4. „Природни науки, математика, и информатика”,  
профессионалено направление 4.3. “Биологически науки”

изготвена от проф. Татяна Иванова Влайкова, дб  
Катедра “Медицинска химия и биохимия”, Медицински факултет,  
Тракийски Университет, Стара Загора,  
и Катедра „Медицинска биохимия“, ФФ, МУ-Пловдив  
тел: 00888 002438, e-mail: [tatyana.vlaykova@trakia-uni.bg](mailto:tatyana.vlaykova@trakia-uni.bg)

**Биографични данни и квалификация на докторанта**

Георги Маринов Големанов е завършил висше образование с ОКС „бакалавър“  
по „биология“ в БФ на ПУ „„Паисий Хилендарски““ през 2011, а през 2014 придобива  
ОКС „магистър“ по „Биофармацевтична биохимия“ в същия университет. От 2015 е  
зачислен за специализация по биохимия в системата на СДО към МЗ, а от 2016 е  
зачислен като докторант на самостоятелна подготовка към Катедра „Химия и  
Биохимия, Физика и Биофизика“ на МУ-Плевен.

Професионалната кариера на ас. Големанов в областта на биохимията  
започва през 2012 г., когато е назначен за химик, а от 2014 за асистент по биохимия в  
Катедра „Химия и Биохимия, Физика и Биофизика“ на МУ-Плевен. Като такъв провежда  
упражнения и семинари по биохимия със студенти от специалности „Медицина“,  
„Фармация“, „Акушерка“, „Медицинска сестра“, „Помощник фармацевт“, „Ерготерапия“.  
През 2017 Георги Големанов е преминал педагогически курс „Основи на медицинската  
педагогика“, към катедра „Обществено здраве“, МУ-Плевен.

От април 2020 г., ас Големанов е главен изследовател във Вирусологична  
лаборатория, към Научноизследователския институт на МУ-Плевен.

Ас. Големанов владее руски и английски на много добро ниво и има много  
добри умения и знания за ползване на различни софтуерни продукти.

От 2013 насам, Георги Големанов е член на изследователските екипи на 10  
НИП, финансираны от МУ-Плевен и на един проект, финансиран от Ф”НИ“, проведен  
съвместно с екип от Института по биофизика, БАН. Георги е участвал в един  
специализиран курс за следдипломна квалификация. Представя списък с общо 13  
публикации, от които 3 от тях са в списания с ИФ и други 3 в списание, реферирано в  
Scopus (Akush Ginekol), а останалите са в списание , реферирано в НАЦИД (Journal of  
Biomedical and Clinical Research). Досега в списания, рефериирани в световни бази  
данни са забелязани 14 цитати на статии с училието на Георги Големанов.

**1. Актуалност на дисертационния труд**

Дисертационният труд на ас. Големанов има за цел да проучи ролята на полиморфизми в гена на инхибитор-1 на плазминогеновия активатор (*PAI-1 4G/5G*) и в гена на тромбоцитния гликопротеин  $\text{IIb/IIIa}$  (*PL A1/A2*), като възможни предразполагащи фактори за развитие на Синдрома на поликистозни яйчници (СПКЯ), и някои негови усложнения в Българската популация.

Синдромът на поликистозните яйчници (СПКЯ) е едно от най-честите ендокринни заболявания при жените в световен мащаб, като високата честота, очертава това заболяване не само като медицински, но и като социален проблем. СПКЯ е сложно мултикомплексно заболяване с не докрай изяснена етиология, включваща участие на множество генетични фактори за предразположение, комбинирани, в сложни взаимодействия, с негенетични/придобити фактори. Все още в международната научна литература отсъстват изчерпателни данни за ролята на генетичните фактори за развитието на СПКЯ. Още по малък е броят на научните изследвания, проучващи връзката на полиморфизми в гените на някои фактори за тромбофилия със СПКЯ и съпътстващите го репродуктивни проблеми, като особено осъкдана е информацията, относно ролята на полиморфизмите на плазминоген активатор-инхибитор 1 (*PAI-14G/5G*) и тромбоцитен гликопротеин  $\text{IIb/IIIa}$  (*PL A1/A2*).

В тази връзка, смятам, че дисертационният труд на ас. Големанов е актуален и резултатите от него ще допринесат за разширяване знанията за генетичната етиология на СПКЯ и свързаните с него репродуктивни проблеми.

## 2. Описание на дисертацията:

### *Структура на дисертационния труд*

Представеният дисертационен труд в настоящия вариант е написан в обем от 131 стандартни страници, структуриран в разделите: въведение 2 стр., литературен обзор – 45 стр; цел и задачи – 2 стр, материал и методи – 26 стр, резултати и обсъждане – 44 стр, обобщение – 2 стр, изводи и приноси – 2 стр, библиография – 9 стр., в която са включени общо 126 литературни източници (всички на латиница). В началото на дисертацията има и страница със най-често срещани съкращения, което улеснява четенето и рабирането на текста. Резултатите са онагледени с 36 таблици, 30 фигури и са включени 2 приложения.

### *Оценка на литературния обзор*

Литературният обзор с въведението и резюмето в неговия край, е информативен и написан с добър научен стил. В него се представя анализ на научната информация относно етиологията, клиниката, диагностиката и репродуктивните проблеми при СПКЯ. Представени са интересни взаимовръзки между хиперинсулинемията (ХИ) и инсулиновата резистентност (ИР) и овулаторните нарушения при жените със СПКЯ. Разгледани са също структурата и механизмите на действие на човешкия серумен фетуин- $A/\alpha_2$  и въвличането му в развитието на ИР и в патогенетичните механизми на СПКЯ.

Голяма част от литературния обзор е отделена на наличната информация в научната литература относно проучванията върху различни генетични полиморфизми, асоциирани със заболяването. Георги Големанов е представил много компактно конкретни полиморфизми в кодиращите гени на хормони, адипокини, цитокини, рецептори, белтъци от сигналните пътища, плазмени транспортни протеини, ензими участващи в синтезата и метаболизма на стероидите и в ремоделирането на ECM и др., за които има доказателства, че са асоциирани с СПКЯ.

Сред този огромен лист от предразполагащи генетични фактори, Георги Големанов и неговият научен ръководител Проф. Регина Комса-Петкова, са се насочили към два полиморфизма, за които в литературния обзор е обърнато много специално внимание: *PAI-1 4G/5G* в гена на инхибитор 1 на плазминогеновия активатор и *PL A1/A2* в гена на тромбоцитен гликопротеин  $\text{IIb/IIIa}$ . Обстойно е разгледана наличната информация относно структурата и хромозомната локализация на гените на *PAI-1* и на тромбоцитният рецептор GP  $\text{IIb/IIIa}$ , тяхната роля във

физиологичните процеси на кръвосъсирване и фибринолиза, както и функционалните ефекти и асоциацията на конкретните полиморфизми, обект на дисертационния труд, като рискови фактори за репродуктивни проблеми при жени със СПКЯ.

Обсъжданите взаимовръзки в литературния обзор са визуализирани много добре със схеми, които допринасят за по-лесното разбиране на сложните преплитачи се процеси и механизми на регулация и патогенеза при развитието на СПКЯ.

Литературният обзор показва задълбочените знания и информираност на докторанта по проблемите, обект на разглеждане и изясняване в дисертационния труд. Георги Големанов е навлязal и се е задълбочил не само в молекулярно-биологичните механизми и процеси, но и в клиниката и диагностиката на това често срещано ендокринно заболяване при жените в репродуктивна възраст.

**Оценявам положително направеното** „Заключение на литературния обзор“, в което ас. Големанов успешно обобщава анализираната научна информация относно етиологията на СПКЯ и очертава нерешените и неясни въпроси, което дава рационална основа за извеждането на основната цел и задачите на дисертационния труд.

### **Материал и методи**

В проучването са включени 129 жени със СПКЯ и контролна група от 99 жени без СПКЯ, подбрани, със съдействието на екип от Центъра за репродуктивна медицина „Репромед“ – гр. Плевен. Лабораторните анализи са проведени изцяло в лабораторията за ДНК анализ към МУ – гр. Плевен, сектор Биохимия с финансовата подкрепа на пет НИП, финансиирани от МУ-Плевен.

Използваните методи са описани подробно, с протоколна точност, което доказва личното участие на докторанта в изпълнението на лабораторните анализи. В изследването се прилагат основни молекулярно-биологични методи като, солева екстракция на геномна ДНК от кръв, оценяване количеството и качеството на изолираната ДНК спектрофотометрично и с агарозна гел електрофореза и апел специфичен PCR- и PCR-RFLP базирани методи за генотипиране за двата проучвани полиморфизми в гените PAI-1 и на тромбоцитния гликопротеин IIb/IIIa. В този раздел е описан и нов интересен иновативен подход за бързо генотипиране на панел от мутации в гени на тромбофиличните фактори, е използваната Strip Assay CVD технология на фирмата Vienna Lab. В този панел са включени общо 26 мутации в гените на 10 тромбофилични фактори. Но въпреки препоръките от вътрешната защита, в раздела „Резултати и обсъждане“, отново няма представени и дискутирани резултати от анализи проведени с този нов подход.

Резултатите са обработени статистически с пакет от статистически анализи и електронни таблици и калкулатори, но липсва необходимата изчерпателност при представянето на прилаганите статистически методи.

### **Резултатите и обсъждане**

Този раздел озаглавен „Резултати и обсъждане“ е във формат, различен от общоприетите стандарти, при които се описват резултатите в една отделна глава, а след това във раздел „Дискусия“ се обсъждат всички резултати в светлината на световната научна литература. В дисертационния труд се прави обсъждане (дискусия) след всеки отделен резултат. В края на този раздел е направено „Обобщение на собствените резултати“, което до голяма степен се пропокрива с следващата задължителна част „Изводи“.

Пре обстойния преглед на антропометричните характеристики и клинични особености на жените със СПКЯ, включени в изследванията, ас. Глеманов потвърждава голямата частота на олигоменореята (48.06%) и аменореята (34.11%), което съответства на включването на тези клинични признания, в критериите на Ротердамският консенсус за диагностика на синдрома. Потвърдено е също, че при жените със СПКЯ най-чести сред репродуктивните проблеми са първичният стерилитет (14.73%) и ранните спонтанни аборт (13.95%).

Изследванията в дисертационния труд на ас. Големанов главно са фокусирани върху двата полиморфизма 4G/5G в гена на PAI-1 и PL A1/A2 в гена на тромбоцитен

гликопротеин IIb/III, като се разглежда генотипната и алелна честота при контролните жени и при тези с СПКЯ като цяло и в подгрупите с различни репродуктивни проблеми и такива без репродуктивни проблеми. Тези анализи са направени с цел доказване вероятната роля на вариантните алели и генотиповете с вариантен алел като рискови за развитието на синдрома и/или на репродуктивни проблеми при жените с този синдром. Резултатите са разписани много обстойно и са визуализирани с голям брой таблици и фигури, известна част от които ненужно включват повторения на резултатите (таблица 18 и фиг 14; и таблица 27 и фиг. 23 и други такива двойки от еднакви данни)

Представените резултати доказват, че вариантният 4G алел на генетичния полиморфизъм PAI-1 4G/5G, хомозиготният генотип по вариантния 4G алел (4G/4G), както и генотипите съдържащи поне един 4G алел (4G/4G+4G/5G), сигнификантно повишават пъти риска за развитие на Синдрома на поликистозните яйчници (СПКЯ) в Българската популация в сравнение с 5G алела, или генотипите, съдържащи поне един 5G алел (5G/5G+4G/5G) или 5G/5G генотипа. съответна.

За разлика от PAI-1 4G/5G полиморфизма, за другия изучаван генетичен полиморфизъм PLA1/A2 (1565T/C), ас. Големанов не установява статистически значими асоцииации и прави извода, че този полиморфизъм не може да се счита за фактор, свързан с предпосочицата към синдрома на поликистозните яйчници в Българската популация.

Друг значим резултат от изследванията, е установеният близо 3 пъти по-висок риск за репродуктивни проблеми при жени с СПКЯ носителки на 4G/4G генотипа на PAI-1 4G/5G полиморфизъм в сравнение с тези пациентки, които имат поне един 5G алел в генотипа си (5G/5G+4G/5G).

В допълнение, двойното хомозиготно носителство на двета вариантни алела т.е. едновременното носителство на PAI-1 4G/4G и PI A2/A2 генотипи, покачва значително (до 28 пъти) риска за репродуктивни неудачи, под формата предимно ранни спонтанни аборт при жени със СПКЯ в Българската популация.

#### **Оценка на изводите и приносите**

На основата от проведените случай-контрола асоциативни изследвания в този дисертационен труд са направени 6 изводи, които точно съответстват на резултатите. Тъй като подгрупите с различни репродуктивни проблеми при жените с СПКЯ са много малки, изводите от тези анализи, особено при двойното носителство, трябва да бъдат изказани много по-внимателно, с голяма степен на вероятност, а не толкова категорично както са представени.

Приносите са разделени на приноси с оригинален и приложен характер. Смятам, че формулировката на тези с оригинален характер не е осмислена добре и не показва същността на приносите, които наистина са получени от този дисертационен труд.

#### **Публикационна активност**

На основата на резултатите от дисертационния труд са публикувани 3 статии в пълен текст, като една от тях е в списание с ИФ (Q2), а другите 2 в списание, реферирано в Scopus (Q4), с което се удивлятворяват изискванията от правилника на МУ-Плевен. Резултатите от изследванията в дисертационния труд са представени и като 3 научни съобщения на един международен форум в чужбина и на други 2 в България. Личният принос на докторанта се доказва от факта, че той е първи автор на една от статиите и втори на двете останали, както и на едно от научните съобщения.

#### **Забележки и препоръки**

Смятам, че въпреки сериозния си ангажимент към Вирусологичната лаборатория на МУ-Плевен, ас. Големанов е положил значителни усилия след вътрешната защита да се съобрази с направените препоръки и да коригира дисертационния си труд, който в настоящия вариант е значително по-добър. Удовлетворена съм, че са въведени корекции съобразно препоръките във фигуранте от

раздела „Резултати“ като са премахнати индикаторите за стандартно отклонение (error bars). Само във фигура 19, тази корекция не е направена

Освен това, в допълнение на направените по-горе забележки за статистическите методи, формулировката на приносите и липсата на представени резултати от описаните анализи с използваната Strip Assay CVD технология, смятам, че ас. Големанов като цяло е необходимо да влага по-голямо внимание и акуратност при представянето на резултатите си с цел избягване на разминаване и/или неточности на данни. Примери за такова разминаване в дисертацията е Таблица 27, в която данните за генотипните честоти на пациентките със СПКЯ се различават съществено от тези в другите таблици за същия полиморфизъм при пациентки с СПКЯ т.e. с данните в таблица 28, 29, 30, 31, 33; в Таблица 34 – трети ред – грешки във вида на алелите «носители на A2», вместо «носители на A1» и др.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният за рецензиране дисертационен труд на ас. Георги Големанов отговаря напълно на изискванията за присъждане на образователна и научна степен «Доктор». Той е разработен задълбочено и има достатъчно на брой резултати с приносен характер, които са отразени в публикации в списания, реферираны в световните бази данни Web of Science и Scopus. Представената дисертационна работа показва, че ас. Големанов е придобил значителен обем от знания и набор от умения да провежда и организира научни изследвания и способност да анализира получените резултати, което е и целта на обучението за научно-образователната степен „доктор“.

Въз основа на изказаното по-горе, си позволявам да представя на уважаемите членове на Научното жури **моето положително мнение** и да предложа на Научния съвет на ФФ, МУ-Плевен да присъдят на **асистент Георги Маринов Големанов** образователната и научна степен „ДОКТОР“.

02.08.2021



Проф. Татяна Влайкова, дб