

РЕЦЕНЗИЯ

относно дисертационния труд на
на д-р Галя Борисова Георгиева-Александрова
докторант на самостоятелна подготовка
в Катедра «Химия и биохимия», Факултета по фармация,
Медицински университет – Плевен

на тема:

**Ролята на snp rs1799889 и rs5918 за активиране на тромбоцити в
тромбоцитни концентрати (in vitro) и при тромботични заболявания**

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

Биографични данни и квалификация на докторанта

Галя Борисова Георгиева е завършила висше образование с ОКС „магистър“ по “Медицина” в МУ-Плевен през 2000.. През 2010 г. придобива специалност „Биохимия“ в системата на СДО и от 2019 г. е зачислена за специализация по трансфузионна хематология.

Професионалната кариера на д-р Георгиева започва като училищен и общопрактикуващ лекар, а от 2005 г. е избрана за асистент по биохимия в МУ-Плевен. От 2019 г. е ординатор, а след това и началник на отделение в РЦТХ Плевен.

Д-р Георгиева владее руски и английски на много добро ниво и има много добри умения и знания за ползване на различни софтуерни продукти.

Д-р Георгиева представя списъци, включващи общо 10 публикации, пълен текст (една под печат), от които 2 са в списания с ИФ, а други 2 в списание, реферирано в Scopus (Akush Ginekol). Представени са също списъци общо 14 участия в научни форуми, 5 от които в чужбина. Досега в списания, реферирани в световни бази данни са забелязани 10 цитати на статии с учтието на д-р Георгиева. Д-р Галя Георгиева има и активно участие в научно-изследователската дейност на секция «Биохими», което се доказва от представения списък на 10 НИП, финансирани от МУ-Плевен, в които тя е член на научния колектив.

1. Актуалност на дисертационния труд

Тромбозата и тромбоемболиите, придизвикани от запушване с тромб на кръвоносни съдове, са рискови състояния, които могат да доведат до сериозни увреждания на засегнатите органи (бял дроб, сърце, бъбреци, мозък, плацента) и до летален изход. Активирането на тромбоцитите интравазално и в тромбоцитен концентрат е сложна многофакторна и бърза поредица от процеси и освобождаване на биоактивни молекули, повлиявани от редица фактори. Сед тях са тромбоцитният гликопротеин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и инхибитор -1 на плазминогеновия активатор (PAI-1), които са и обект на изследване на настоящия дисертационен труд. Установено е наличието на редица полиморфни варианти в гените на тези тромботични фактори, като два от тях, а именно полиморфизмът PLA1/A2 (rs5918ITGB3) в гена на тромбоцитния гликопротеин IIb/IIIa и 4G/5G (rs1799889(-) в гена на PAI-1 са със значим ефект респективно върху активността и експресията на тези протеини и от там върху процеса

на тромбообразуване и риска за развитие на редица заболявания, при които се наблюдава тромбоза, съдова оклузия и исхемична некроза на тъканите.

В тази връзка, резултатите от дисертационния труд на д-р Георгиева, имаща за цел да проучи приноса на носителството на двата тромбофилични полиморфни варианти: PLA1/A2 в гена на GP IIb/IIIa и 4G/5G в гена на PAI-1 върху активирането и свързаните с това промени в топологичните и наномеханични свойства на тромбоцитите, биха допринесли за допълване знанията за финните механизми на регулация на процеса на хемостаза и тромбообразуване. В допълнение, имайки предвид прилагането в клиничната практика на трансфузия на тромбоцитни концентрати за коригиране на заболявания с нарушена хемостаза и риск от кървене, резултатите от *in vitro* изследванията на тромбоцитите и отделените микрочастици в тромбоцитни концентрати от донори, биха дали рационална основа за оценяване риска от нежеланни тромботични инциденти при трансфузирани реципиенти.

Ето защо смятам, че темата на дисертационния труд е актуална и голяма част от резултатите от проведените изследвания имат приносен оригинален научно-теоритичен и приложен характер.

2. Описание на дисертацията:

Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд на д-р Георгиева е написан на 130 страници и включва следните раздели: въведение – 2 страници; литературен обзор – 38 страници, цели и задачи – 2 стр; материали и методи – 13 стр; резултати обсъждане 53 стр, изводи – стр; приноси – 1, публикации по дисертацията – 1 и библиография – 13 стр. В библиографията са включени общо 249 литературни източници (всички на латиница). Представен е списък със съкращения, което улеснява възприемането на представената информация.

Литературният обзор е визуализиран с 16 фигури, взаимствани от литературни източници. В тази връзка текстът към всяка от тези фигури трябва да включва като референция съответния литературен източник или интернет сайт. В раздела «Материали и методи» са представени 7 таблици, които трябва да бъдат номерирани и да имат съответното описание (Заглавие на таблицата). Резултатите от изследванията са визуализирани с 10 таблици и 22 цветни информативни фигури, повечето от които са изображения от атомно-силова микроскопия (АСМ), хистограми и скатер диаграми от флоуцитометричните изследвания.

Оценка на литературния обзор

При разработването на литературния обзор, д-р Георгиева е обобщила голям обем информация относно активирането на тромбоцитите, видовете и ролята на отделяните тромбоцитни микрочастици, начините за изолиране на тромбоцитни концентрати с клинично приложение, относно структурата, биологичната и физиологична роля, сигналните пътища отключвани и регулирани от тромбоцитния гликопротеин $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (GP IIb/IIIa, фибриногенов рецептор) и на инхибитор-1 на плазминогеновия активатор (PAI-1). Специално внимание е отделено на генетичните полиморфизми, обект на дисертационния труд, PLA1/PLA2 в гена за GP IIb/IIIa (rs5918) и 4G/5G в гена за PAI-1, тяхната функционална активност върху конформацията или експресията на съответните протеини и асоциацията им с различни патологични състояния, включително инфаркт на миокарда, инсулт, атеросклероза, венозен тромбоемболизъм (ВТЕ) и и репродуктивни неудачи и повтаряща се загуба на плода.

Литературният обзор показва задълбочените знания и информираност на докторантката по проблемите и способността и да прави критичен анализ на научната литература и да извежда основните понятия, процеси, регулаторни механизми и нерешените въпроси в разглежданите процеси.

Направеното „Заклучение на литературния обзор“, дава кратко обобщение на ролята на тромбоцитния гликопротеин GP IIb/IIIa и PAI-1 при активирането и

агрегацията на тромбоцитите, което предоставя солидна основа за извеждането на целта и задачите.

Основната цел на представения дисертационен труд е изясняване приноса на носителството на двата полиморфизми (PLA1/A2 (rs59181TGB3) и 4G/5G (rs1799889(-)) в гените GPIIb/IIIa и PAI-1 върху активирането на тромбоцити и свързаните с това топологични и наномеханичните свойства на тромбоцитите при здрави контроли, дарители и при пациенти с ДВТ, други съдови инциденти, и при жени с ранни загуби на плода, и значението на тези полиморфизми при трансфузии.

Определените задачи за решаване на поставената цел са описани ясно и конкретно.

Материали и методи

В проучването са включени 146 контролни индивиди, 50 донори на кръв, 172 пациенти с данни за тромбоза и 46 жени с ранна загуба на плода. Съотношението на половете в групите на контролите и пациентите са относително еднакви, което дава основание за анулиране ефекта на пола при проведените асоциативните анализи. Пациентите, включени в изследването са подбрани адекватно с добре формулирани критерии със съдействието на екипи от Клиниките "Съдова хирургия" и "Кардиология и ревматология" от УМБАЛ „Д-р Г. Странски, Плевен и от Медицинския център „Клиничен институт за репродуктивна медицина“ ЕООД гр. Плевен.

Групите с контроли и пациенти включват достатъчен брой индивиди за получаване на убедителни резултати от асоциативните изследвания.

Тромбоцитните концентрати и информация за епидемиологичните изследвания при трансфузиите са получени от Районния център по трансфузионна хематология (РЦТХ) Плевен, където докторантът работи.

Използваните методи са напълно адекватни на поставените задачи и включват проточна флуоцитометрията, **Атомно-силова микроскопия (АСМ)** и основни молекулярно-биологични методи като, изолиране на геномна ДНК от кръв, оценяване качеството на изолираната ДНК с агарозна гел електрофореза, генотипиране с алел специфичен PCR- и PCR-RFLP базирани методи.

Лабораторните ДНК-анализи са проведени в лабораторията за ДНК анализ към МУ – гр. Плевен, сектор Биохимия, флуоцитометричните изследвания в Института по микробиология към БАН, а изследванията с АСМ в Института по биофизика и биомедицинско инженерство към БАН.

Лабораторните методи и използваните статистически анализи са описани обстойно и задълбочени като са представени принципите на методите и детайли в протоколите на лабораторните анализи.

Резултати

Тази част от дисертационния труд е най-съществената като в нея са представени достатъчно по обем резултати, които са оригинални и имат приносен научно-теоритичен и приложен характер. Резултатите са визуализирани с 10 таблици и 22 цветни представителни фигури, повечето от които са хистограми, скатер диаграми и изображения от Атомно-силовата микроскопия.

Главата «Резултати» включва последователно описание на резултатите, последвани от кратки дискусии на всеки еден отделен резултат и се извеждат изводи за всеки отделен изследван полиморфизъм. Такова фрагментиране не дава възможност за получаване на цялостен поглед върху ефектите на разглежданите полиморфизми върху промените на тромбоцитите при активирането им при здрави индивиди и пациенти с тромбозна симптоматика и репродуктивни неудачи и в тромбоцитни концентрати.

Убедено мога да кажа, че получените в дисертационния труд резултати са много като количество, имат висока научна стойност, оригинални са и имат приносен характер.

Едни от най-важните резултати с приносен характер са тези, доказващи че морфологията, наномеханиката, степента на активирането на тромбоцитите зависят от полиморфизма A1/A2 (rs5918 ITGB3) в гена за GP IIb/IIIa при всички изследвани групи индивиди: здрави дарители, пациенти с тромботични инциденти и жени с ранна загуба на плода. По-малката височина на активираните тромбоцити, по-честото слепване, загубата на дисковдната форма, по-големия брой освободени малки обекти най-вероятно представляващи тромбоцитни микрочастици (PMP) и/или гранули, както и по-високата степен на тромбоцитната еластичност (модула на Young) са характеристики, наблюдавани по-често при носители на вариантния A2 алел (алел C на rs5918)

С резултатите от асоциативните изследвания, д-р Георгиева доказва също, че вариантният A2 алел (алел rs5918C) се явява рисков фактор ранна загуба на плода, за дълбока венозна тромбоза при жени, за по-кратка преживяемост и за риск за повтарящи се тромботични инциденти при жени под 45 години.

Друга група оригинални резултати са получени при изследванията на взаимовръзката на носителството на вариантния 4G алел на полиморфизма 4G/5G (rs1799889(-)) в гена на PAI-1 с морфологичните и механичните особености на тромбоцитите, със степента на тромбоцитната еластичност (модула на Young), активността на тромбоцитите, с риска за развитие на ДВТ и ранна загуба на плода.

Резултати, имащи потенциално приложен характер са тези от проучванията на влиянието на трансфузията на тромбоцитни концентрати от донори, носители на вариантите алели в изследваните полиморфизми върху реципиенти със съдово заболяване.

Оценка на изводите и приносите

Изводите от проведените изследвания са разписани обстойно и отговарят на получените резултати. Приносите, които са 5 на брой, са конкретни, но не става ясно кои са оригинални с научно-теоретичен характер или потвърдителни с такъв характер и кои са с приложен характер.

В допълнение смятам, че както в текста на раздел «Резултати», така и при формулировката на изводите и приносите е нужно да се конкретизира носителството на кой от алелите на изследваните полиморфизми имат описаните ефекти. Използваните понятия «носителство на полиморфизъм» или «носителският статус на полиморфизъм» са неточни понятия, които не дават реална информация.

Публикационна активност

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 4 статии, като една е в списание с ИФ (2.096), реферирано в Web of Science и има квартил (Q2), друга статия е публикувана в списание, реферирано в Scopus, без ИФ и е с квартил Q4, а последните две са в българско списание с научно рецензиране. Резултати от дисертационния труд са представени на един научен форум в чужбина. Така с тези наукометрични показатели са изпълнени минималните изисквания за ОНС „доктор“ в научно направление 4.3. Д-р Георгиева е първи автор на една от публикуваните статии.

Забележки и препоръки

Въпреки моето положителното мнение относно научната стойност на проведените изследвания и получените резултати, смятам, че при преставянето на тези резултати в дисертационния труд има редица неточности и недостатъчна яснота и изчерпателност.

1. Смятам, че за да бъдат доказани описаните резултати от Скатер диаграмите на единичните представители на различните групи контроли и пациенти, носители или неносители на вариантите генотипи/алели, показващи нивото на гранулираност на тромбоцитите (фиг 23) и нивото на тромбоцитните частици (фиг. 24) е било необходимо данните от флоуцитометрията на всички пациенти и контроли да бъдат обобщени и обработени статистически и да бъдат представени в подходящи таблици или фигури със съответните стойности за статистическа достоверност (p-стойности)

2. Когато се използват изрази като «Стойностите на са значително по-високи» (стр. 63) е било необходимо да бъдат представени конкретните средни

стойности (или медиани) и стойностите на статистическа достоверност, получени от проведените статистически анализи (p-стойностите). Такива липсват.

3. Както споменах по-горе, в дисертационния труд многократно се наблюдава неправилно използване на понятието «носител на полиморфизъм», вместо «носител на вариантният алел на полиморфизма» или «носител нагенотип».

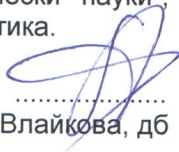
Тъй като разработването на докторантура е степен в обзаването на един млад учен, смятам, че мога да си позволя да направя две препоръки към д-р Георгиева. Едната засяга прецизността в използвания научен стил и представянето на резултатите в следващите нейни научни изяви и публикационна активност. А втората, имайки предвид факта, че тя е първи автор само в една от публикациите, включени в дисертацията, препоръчвам в бъдеще по-голяма активност при подготовката на публикации и научни съобщения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на д-р Галя Борисова Георгиева-Александрова представлява един актуален, интердисциплинарен научен труд. Той е разработен задълбочено и са получени достатъчно на брой резултати с висока научна стойност и приносен характер.

Считам, че настоящият дисертационен труд и наукометричните показатели отговарят на изискванията за съответната научна степен, формулирани от ЗРАСРБ и Правилника за прилагането му в Медицински университет – Плевен, което ми дава основание да дам положителна оценка и да предлага на почитаемото научно жури да присъди на д-р Галя Борисова Георгиева-Александрова ОНС „Доктор“ по Научна специалност „Биохимия“, Професионално направление 4.3. „Биологически науки“, област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“.

04.08.2021


Проф. Татяна Влайкова, дб