

РЕЦЕНЗИЯ

от професор. **Алексей Славков Савов, д.б.**,
Началник на Национална Генетична лаборатория,
СБАЛАГ „Майчин дом” ЕАД. МУ София

Относно: Дисертационен труд за присъждане на научната степен „Доктор на науките” по научна специалност „Биохимия” на доц. д-р Регина Семьоновна Комса-Пенкова от Катедрата по химия и биохимия, физика и биофизика при Факултета по фармация на Медицински университет – Плевен, на тема: *„Нов поглед върху ролята на генетичните и негенетични рискови фактори в патогенезата на тромботични инциденти при пациенти с венозен тромбемболизъм и репродуктивни проблеми”*

Със заповед № 1313 от 04.07.2017 г. на Ректора на МУ – Плевен съм избран за член на Научното жури във връзка с дисертационния труд на кандидат доц. д-р Регина Семьоновна Комса-Пенкова, представен по процедура за придобиване на образователната и научна степен „Доктор на науките” по научна специалност „Биохимия”. По процедурата за защитата доц. д-р Регина Комса-Пенкова е представила всички необходими материали съгласно изискванията на Правилникът за развитие на академичния състав в МУ–Плевен.

Декларирам, че нямам конфликт на интереси с автора на дисертационния труд.

1. Научна биография

Доц. Регина Комса Пенкова, е завършила висшето си образование в Държавния университет г. Вилнюс, Литва със специалност „Биохимия”. През 1984 година започва работа като асистент в катедра „Химия и биохимия” на МУ-Плевен. През 1994 г. защитава дисертационен труд на тема „Термостабилност на фибриларните колагени, влияние на различни фактори“, а три години по-късно, се хабилитира като доцент.

Заемани длъжности: ръководител на секция „Биохимия”; ръководител на катедра по „Химия, Биохимия, Физика и Биофизика”, Заместник декан на Факултета по медицина, председател на МУС на Факултета по медицина, председател на Акредитационна комисия на Факултета по медицина.

Членство в научни организации: «Международна Асоциация за Медицинско Образование АМЕЕ», „Съюз на учените в България“, борд на директорите на Образователната програма на Европейско сдружение по клинично хранене и метаболизъм

(ESPEN), зам. председател на Българско сдружение по клинично хранене и метаболизъм (БУЛСПЕН).

Член на редакционни колегии на Clinical nutrition and Metabolism (ESPEN), Nutrition, (ASPEN), Клинично Хранене на (БУЛСПЕН).

Доцент Регина Пенкова е **ръководила разработването на четири пилотни проекти** по програмата на Европейския съюз за развитие и подобряване на професионалното обучение, като три от тях са наградени с отличие. **Ръководител е и на две успешни докторски дисертации** защитени през 2009 и 2012.

Научни интереси. Основните научни направления, по които работи доцент Пенкова са свързани с генетични фактори участващи в регулация на хемостазата и точно предразполагащи към тромбофилия, биохимични характеристики на съединително-тъканни белтъци и ролята им в някои патологични процеси, хранене и качество на живот.

Наукометрични данни. Публикации в български списания – 62, в чуждестранни списания -47, съавтор е на 12 глави от книги с общ импакт фактор над 65. Доцент Регина Пенкова има повече от 100 участия в национални и международни научни форуми.

Предоставеният ми за рецензия дисертационен труд включва научни разработки правени в продължение на повече от 13 години – публикациите по темата датират от 2004 година. Генетичната регулация на хемостазата и патогенезата на клиничните находки е обект на множество изследвания отразени в световната литература, които дават ценни познания в тази насока. Обект на дисертационния труд са две основни клинични групи пациенти с венозни тромбози и жени с репродуктивни неудачи, при които генетично обусловената тромбофилия е очаквано да стои в основата на медицинските проблеми. Наред с това дисертационния труд включва и редица външни фактори (пол, възраст, тютюнопушене, тегло, хормонозаместителна терапия и др), които могат да оказват модифициращ ефект на клиничната изява. Като цяло може да се каже, че дизайнът на разработката е проспективно кохортно изследване, като първоначално се търси връзка между избраните полиморфизми и клиниката, а в последствие се проследява връзката между генотипа на изследваните полиморфизми в кандидат-гени с различните външни фактори. Дисертацията е структурирана съгласно приетите изисквания. Доказателствения материал е с много високо качество и убедително свидетелства за високата ерудиция и професионализма на доцент Регина Пенкова.

2. Литературен обзор по темата

Литературният обзор е основан на над 800 актуални източници представящи различни по насоченост и подходи проучвания на някои от основните генетични маркери имащи отношение към регулацията на хемостазата. Като обект за своя дисертационен труд доцент

Пенкова избира гликопротеин $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, фактор V, Фактор II и инхибитора на плазминогенния активатор. Структурата на литературния обзор прави отлично впечатление със своята подреденост представяща: съответните гени и характеристиките им, структурата, функцията и биологичната роля на техните белтъчни продукти, генетичните варианти водещи до промени в регулацията, а от там и патологични изяви. Всичко това позволява да се проследи в детайли връзката между тези генетични варианти и ролята им за изграждане на клиничния фенотип. Основайки се на тази обемна информация в края на литературния обзор доцент Регина Пенкова прави **обобщение, с което дава основателни аргументи за избора на разработваната тема.** Независимо от факта, че изследвания в тази насока са правени от години тя е актуална, защото някои от задачите включват допълнителни проучвания на наномеханичните характеристики на тромбоцити и на микрочастици, промените в активирането на тромбоцитите, което съчетано с генетичния профил позволява много по-прецизна оценка на сложните механизми и взаимовръзки. Може да се каже, че задачите имат и фармакогенетична насоченост и биха намерили приложение при разработването на нови терапевтични подходи при тези състояния.

3. Материали и методологичен подход

Изборът на клиничните и контролни група включени в анализите е направен след прецизна селекция по отношение на демографски, полови и етнически признаци и отговаря на всички изисквания за този тип проучвания. Обемът е напълно достатъчен данните да бъдат подложени на статистически анализ и да бъдат получени достоверни резултати. Едно от достоинства на настоящата разработка е, че всички пациенти са преминали през съответните специализирани клиники на Университетската болница в Плевен, катедрата по хирургия и Центъра за репродуктивно здраве към УМБАЛ МУ Плевен и КИРМ, което е предпоставка за уеднаквяване в клиничните критерии и протоколи. Важно е да се отбележи, че проучването е проведено след одобрение на Комисията по етика на МУ Плевен.

Преданалитичните и аналитични етапи на ДНК анализа за генотипиране на изследваните маркери са описани подробно, като съдържат и някои лични модификации водещи до по-добри резултати. Самите генотипове са определени с алел специфични ендонуклеази и алел специфична амплификация, които при наличие на съответните контроли дават надеждни и възпроизводими резултати. Като забележка ще посоча, че на фигурите представящи определянето на генотиповете би било уместно да се посочат контролните проби или молекулен свидетел, каквито безусловно са ползвани в хода на работата. Същата компетентност и прецизност авторката показва и по отношение на биохимичните методи използвани в дисертационния труд - диференциална сканираща калориметрия, изотермична титрационна калориметрия, флоу-цитометрия и редицата

протоколи за работа с тромбоцити активността, целящи да се определят характеристиките, морфологията и наномеханиката им при включените в изследването индивиди. За обработка на получените данни е използван широк спектър от статистически анализ, подбран компетентно за конкретните изследвания. **Тази глава представя доцент Регина Пенкова, като изграден специалист в областта на биохимията и молекулярната генетика.**

4. Резултати

Резултатите, представени в дисертационния труд, следват структурата на литературния обзор и представят данните от проведените изследвания за всеки един от генетичните маркери в съответните клинични групи. Те съдържат напълно достатъчна като обем информация за разпределението на алелните честоти и генотиповете в изследваните групи, както и връзката им с фактори на средата, клинична изява, рискове за рецидиви а също така и връзката между генотиповете и биохимичните параметри на тромбоцитите.

Полиморфизъм PLA1/A2 в гена кодиращ гликопротеин α IIb β 3

Интересна находка, която насочва към необходимостта от проследяване и събиране на допълнителна информация е статистически значимата връзка на полиморфизма с дълбоки венозни тромбози, както и рецидивите при млади жени. От достъпната информация няма други данни от подобно проучване за нашата популация. Иновативен подход е и използването на криви на Kaplan-Meier, представящо риска от инциденти и рецидиви при този фактор. При жените носителки на полиморфния вариант допълнителен предразполагащ фактор се явява тютюнопушенето и наднорменото тегло, което също трябва да се вземе предвид при предоставяне на консултация. На лице е и един факт, който не може еднозначно да бъде обяснен - защо рискът за тромбозни инциденти при младите жени е по-високи отколкото при по-възрастните.

В някои пилотни проучвания за нашата популация е отбелязано, че няма доказана връзка между изследвания полиморфизъм и обременената акушерска анамнеза. По актуалните данни представени в настоящето изследване обаче показват, че при жените с обременена акушерска анамнеза, които са носители на полиморфния вариант е вероятно да възникнат дълбоки венозни тромбози, а това е съществено за предприемане на адекватна профилактика и проследяване.

Като допълнение към резултатите от асоциативното проучване доцент Регина Пенкова представя и резултати от изследвания на активност, морфологични и механични характеристики на тромбоцити и тяхната връзка с генотипа на пациентите. Такъв анализ се провежда за пръв у нас и предоставя ценна информация за различните нива на регулация.

Полиморфизъм 675 4G/5G в гена кодиращ инхибитора на плазминогенния активатор.

Този генетичен маркер е обект на много проучвания, като данните от тях силно си противоречат. Най-често неговата роля се коментира като рисков фактор за репродуктивни неудачи (основно ранни спонтанни аборти), но тези данни не се подкрепят от всички автори. Очевидно е, че неговата функция са опосредства и модифицира от редица други фактори и трудно би могла да бъде интерпретирана ако се разглежда самостоятелно. Полиморфния вариант се намира в промоторната част на гена и променя неговата регулацията, като реално е свързан с изявата на хипофибринолиза. Независимо от това аторката правилно отбелязва, че нарушеното равновесие между фибринолизата и коагулацията може да допринесе значително за образуването на тромби и го разглежда в контекста на разработваната тема.

Предоставените резултати изтъкват неговата роля за изявата на тромбозни инциденти, която значимо се засилва с напредване на възрастта. И тук, както бе установено при гликопротеин $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ женският пол е по-предразположен в сравнение с мъжкия. При жените допълнителен фактор увеличаващ риска от венозни тромбози отново се явява тютюнопушенето. Важно е да се отбележи, че хормоно-заместителната терапия не увеличава риска от тромбозни инциденти при хомозиготните носителки на полиморфизма и може да се приеме, че не е необходимо да се определя неговия статус при назначаването и. Намерена е и статистически значима връзка между обременената акушерска анамнеза и риска за венозни тромбози с ранна проява при жените хомозиготни носителки на полиморфния вариант. Искам да подчертая, че независимо от противоречията в наличните в литературата публикации тези данни са много ценни за нашата популация, защото различни проучвания еднозначно обръщат внимание на значителната ролята на този фактор в регулацията на хемостазата и различни клинични проблеми.

Освен асоциативното проучване дисертационния труд представя и функционални, морфологични и механични изследвания на тромбоцити и връзката на техните

характеристики с полиморфния генотип. В достъпните литературни източници няма много задълбочени изследвания в тази насока, а като вземем предвид и спецификата на клиничните групи можем да определим тази част от дисертационния труд като новаторска.

Генът за фактор V и Лайденовата мутация.

Съгласно последните Европейски препоръки за поведение при венозен тромбоемболизъм, този генетичен вариант безусловно е приет за основният функционално доказан рисков фактор за тромбозни инциденти. Неговата честота в Европейските популации варира в известна степен, като за нашата страна е определена около 7-9%. По отношение на FVL повечето резултати в дисертационни труд имат потвърдителен характер. Ранните изяви на тромбозни инциденти, както и рецидивите до голяма степен са свързани с носителския статус. За разлика от по-горе разгледаните генетични полиморфизми Лайденовата мутация не показва полово свързани разлики по отношение на риска, за възникване на тромбозни инциденти. Рискът от рецидиви обаче е статистически по-висок при жените.

Данни, които не са представяни за нашата популация е връзката на тютюнопушенето с клиничните прояви при носителите. То се явява като предразполагащ фактор за по-ранната изява, но не показва полово значими разлики. Наднорменото тегло също оказва влияние, но не в такава степен, както при генетичния полиморфизъм на гликопротеин $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ и инхибитора на плазминогенния активатор. **Може да се приеме, че влиянието на фактор V Лайден самостоятелно е много по-подчертано, отколкото при другите включени в изследването полиморфизми.**

Важна информация с потвърдителен характер е и че, хормоналната терапия подчертано увеличава риска от тромбозни инцидентите при носителите. Това дава пълни основания генетичния статус да бъде определян при назначаването на такава. За жените носителки бременността се явява, като рисков период както за венозни тромбози, така и за обременена акушерска анамнеза. При такива пациентки е наложително проследяване на бременността и предвиждане на адекватна профилактика.

Функционалните изследвания на тромбоцити и връзката им с Лайденовата мутация, които представя доцент Регина Пенкова могат да се обсъждат в различни аспекти и увеличават познанията в тази насока.

Полиморфизъм 20210 G>A в гена кодиращ фактор II

Генетичният полиморфизъм 20210 G>A на фактор II, също е с добре доказана роля в регулацията на хемостазата. И този вариант е анализиран подробно в идентична както предходните генетични маркери схема. В сравнение с фактор V Лайден рискът за тромбозни инциденти при носителите е по- малък, но това не го изключва като генетичен маркер, който трябва да бъде оценен. Резултатите от дисертационния труд показват, че няма статистически значима разлика в честотата на тромбозни инцидентите между половете. Интересен факт без категорично обяснение е по- късната изява на тромбозни инциденти при носителите с наднормено тегло. **От резултатите на дисертационния труд се вижда, че и полиморфизма в гена за фактор II има отношение към тромбозните инциденти при хормонална терапия и също както фактор V Лайден трябва да бъде вземан предвид при назначаването и.** Увеличава се и риска за обременена акушерска анамнеза. Доцент Регина Пенкова прави подробен функционален анализ на тромбоцити и съпоставя техните характеристики с генотипа и на пациенти с носителски статус на мутацията 20210 G>A. Такива изследвания при български пациенти не са провеждани до сега и имат приносен характер.

В края на дисертационния труд доцент Пенкова прави **комплексен поглед върху носителство на изследваните генетични варианти PLA1/A2, 4G/5G PAI-1, FVL и FII 20210 G>A** при жени с репродуктивни неудачи. Клиничната извадка, от която са селектирани съответните пациентки е впечатляваща и включва близо 5 000 случая с репродуктивни проблеми. Представени са интересни данни за специфични периоди през бременността, в които влиянието на даден фактор е по- значимо. **Ако информацията бъде систематизирана по- нагледно това може да даде идеи за начина на проследяване и профилактиране на бременността в зависимост от генотипа на пациентката.**

Критична забележка към тази част правя по отношение на включването на информация за полиморфизъм в гена кодиращ MTHFR. Въпреки ползната информация, той не присъства като част от поставените задачи и не се вписва логично в структурата на дисертационния труд.

Заклучение

Въз основана на впечатляващите по обем резултати доцент Пенкова представя професионална интерпретация на доказателствения материал. Тя дава логични разяснения за връзката му генетиката и външните фактори, а от там и разликата в клиничните изяви при отделните индивиди. Това, което откроява дисертационния труд от други изследвания по темата, е че дисертантката не акцентира само върху положителната статистическа асоциация на изследваните фактори с наблюдаваните фенотипи, но и анализира на функционално ниво начина на регулация на хемостазата, молекулни характеристики на тромбоцитите и връзката им с различни физиологични процеси.

Цялостната разработка представя общо 29 извода, към които нямам критични бележки и приемам като заключение на дисертационния труд. Безусловно приемам и посочените от дисертантката приноси, като биха могли да се посочат и други оригинални находки.

По дисертационния труд са представени 38 публикации в български списания и 14 в международни с общ импакт фактор над 40. Цитиранията на тези трудове са над 100 по данни от Web of Science, което покрива напълно изискванията за съответната научна степен, формулирани от Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника за развитието на академичния състав в Медицински университет – Плевен.

Доцент Регина Пенкова има впечатляваща и последователна научна биография, натоварена преподавателска и системна научна дейност. Тя е изключително колаборативен и всеотдаен в професионалан план човек.

Давам висока положителна оценка на дисертационния труд е на цялостната научна и изследователска продукция на автора и убедено препоръчам на научното жури да присъди научната степен „Доктор на науките” по научна специалност „Биохимия” на доц. Регина Комса-Пенкова, дб.

София 31.07.2017 год.

Член на НЖ:

(проф. дб. Алексей Савов)