

## Рецензия

на дисертационен труд

на ас. д-р Милка Пенчева Михайлова,  
Дикторант в Катедра «Химия и биохимия», Факултета по фармация,  
Медицински университет -- Плевен

на тема

### **БИОХИМИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ФРУКТОЗАМИН – МАРКЕР НА НЕЕНЗИМНО ГЛИКИРАНИ БЕЛТЪЦИ ПРИ ХИПЕРГЛИКЕМИЧНИ СЪСТОЯНИЯ**

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

изготвена от проф. д-р Татяна Иванова Влайкова, дб  
Катедра Химия и Биохимия, Медицински факултет,  
Тракийски Университет, Стара Загора,  
тел: 0888 002438, e-mail: tvlaykov@mf.uni-sz.bg

#### 1. БИОГРАФИЧНИ ДАННИ ЗА КАНДИДАТА

Ас. д-р Милка Пенчева Михайлова е завършила образователна степен „Магистър по медицина“ през 1985 г. във ВМИ-Плевен (сега МУ-Плевен), а през 1991 придобива медицинска специалност „Биохимия“ в системата на СДО към МЗ (МУ-София). Д-р Михайлова провежда следдипломно обучение към Лондонски колеж по класическа хомеопатия, Хомеопатично общество, София и към Центъра за образование и развитие на хомеопатията, Франция, МУ-София и получава дипломи по Класическа и Клинична хомеопатия. През 1991-1993 г. д-р Михайлова провежда двугодишна специализация в Медицински университет, Франкфурт на Майн, Германия под ръководството на проф. Рийтбрук по тематика, свързана с дисертационния труд.

В допълнение д-р Михайлова е провела в МУ-София и МУ-Варна 5 обучителни курсове по клинично хранене, патобиохимия на метаболитния синдром, биохимия и ендокринология, проведени от водещи специалисти в научните направления от Швейцария и Белгия. Участвала е и в редица курсове за следдипломна квалификация по хомеопатия у нас и в чужбина. Д-р Михайлова упражнява активна лечебна дейност с хомеопатична лекарска практика.

Д-р Михайлова е един от дългогодишните и много опитни преподаватели по биохимия в Катедра „Химия и биохимия“ на МУ-Плевен. Тя е асистент от 30 години и участва в организацията и провеждането на практическите упражнения, учебни модули, изпити и някои лекции по Биохимия, провеждани на български и английски език. Д-р Михайлова от много години е завеждащ учебна дейност по биохимия в Кат. „Химия и биохимия“.



Д-р Михайлова владее на много високо ниво немски език и успешно използва писмено и говоримо английски и руски език.

## 2. АНАЛИЗ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### 2.1. Актуалност на дисертационния труд

Дисертационният труд на д-р Милка Михайлова има за цел да изследва и изясни клиничната значимост на един от маркерите на неензимното гликиране на белтъците, фруктозамин (ФА), при хипергликемични състояния, съпровождащи редица социално значими заболявания като захарен диабет при възрастни и деца и при меболитен дисбаланс при пациенти с хирургични интервенции. Съществени последици от продължителните хипергликемични състояния са диабетните микроангиопатии, ретинопатия, нефропатия, полиневропатия и сърдечно-съдови усложнения, като съществен патогенетичен механизъм за тяхното развитие е спонтанното неензимно гликозилиране (НЕГ) на плазмени, мембранни, екстрацелуларни матриксни и вътреклетъчни белтъци.

Утвърден лабораторен показател за спонтанното неензимно гликозилиране на белтъците при дълготрайна хипергликемия е гликираният хемоглобин (HbA1c), който е с висока информативност за по-продължителен ретроспективен период на хипергликемия от 2-3 месеца. През последните години в изследванията на хипергликемичните състояния навлизат и други биомаркери на НЕГ като 1,5-анхидроглуцитола (1,5 АГ), гликирания серумен албумин (ГСА) и фруктозамина (ФА). Тези показатели се проучват като динамични биомаркери отразяващи хипергликемия в по-кратки ретроспективни периоди от 1 до 3 дни (1,5 АГ) или 2-3 седмици (ФА и ГСА), но тяхното клинично значение и приложение са все още ограничени. Ето защо, смятам, че дисертационният труд на д-р Михайлова е актуален и решаването на задачите, поставени в него ще допренесе за доказване на информативната стойност на показателя за степента на гликиране на серумените белтъци, фруктозамина, като подходящ допълнителен маркер за гликемичен контрол при деца с диабет тип 1, при пациенти с хирургични интервенции и при възрастни пациенти с диабетна ретинопатия във връзка с промени в баланса на серинови протеази/антипротеази (серпини). В допълнение д-р Михайлова и нейният научен ръководител се ангажират с амбициозната задача да докажат приложимостта на някои медикаменти и хранителни добавки в превенцията на късните усложнения при захарен диабет, инхибирайки спонтанното неензимно гликиране на белтъците.

### 2. 2. Описание на дисертацията:

#### **Структура на дисертационния труд**

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд обхваща общо 159 страници, илюстриран е с 44 фигури и 21 таблици. Структурирането на дисертационния труд **се различава от приетия стандарт**. Включва следните части: Въведение и Литературен обзор с Резюме на литературния обзор – общо 53 стр., Цел и задачи-1 стр., В рубриката «Собствени изследвания» се включват «Използвани методи» - 10 стр., и «Резултати от собствените изследвания» -64 стр., «Изводи»– 1 стр. «Приноси»- 1 стр. и «Научни публикации и съобщения по дисертационния труд» – 5 стр. В дисертацията са цитирани 297 литературни източници, от които 9 са на кирилица, а останалите 288 са на латиница. Библиографските източници са като цяло съвременни -



около 1/3 (27%) от цитираните статии са публикувани през последните 10 години (от 2007), като има и определен брой от 2017 г. Но има и значителен брой (над 50%), издадени преди 2000 години.

#### **Оценка на литературния обзор**

Литературният обзор с въведението и резюмето в неговия край, е информативен, но относително дълъг (близо 40% от текста на дисертационния труд). В него се представя анализ на научната информация относно биохимичните механизми, патогенетичното значение и показателите на неензимното гликиране на протеините. Обърнато е специално внимание на ролята на гликирането на протеините в развитието на късните усложнения при захарен диабет и по-специално при развитието на микроангиопатии и диабетна ретинопатия. Представени са публикуваните изследвания и са обсъдени възможностите и механизмите за инхибиране на неензимното гликиране на белтъците с медикаменти (аспирин и др. нестероидни противовъзпалителни лекарства), хранителни добавки (витамин В6, убихинон, микроелемента хром) и екзогенни химикали (аминогуанидин). Направен е анализ и на ролята и възможностите на фруктозамина, като универсален показател за неензимно гликиране на серумните белтъци да бъде използван като биомаркер за метаболитния контрол и метаболитните разстройства в периперативните периоди при пациенти с хирургични интервенции.

Литературният обзор показва **задълбочените знания и богатата информираност** на докторантката по проблемите, обект на разглеждане и изясняване в дисертационния труд. Написан е на висок научен стил като е използвана много научна терминология. Смятам, че литературният обзор трябва да бъде по-ясно структуриран и номериран, с повече подглави и подзаглавия, които да насочват и облекчават читателя за по-бързо ориентиране в съдържанието на текст. Това се отнася за раздели I.B. „Неензимно гликиране на белтъците – патогенетично значение при усложнения на захарен диабет“ – 9 страници чист текст; и раздел III. „Изследване на фруктозамин като иновативен биохимичен показател на периперативния метаболитен контрол“ - 8 страници чист текст.

Литературният обзор е богато илюстриран с 18 фигури (от цитираните източници) и 4 таблици. Част от фигурите са твърде **малки и неясни**, което губи тяхната информативност (фиг. 6б, фиг. 7, фиг. 8, фиг. 11, фиг. 16, фиг. 9 – отсъства в електронния вариант на дисертацията).

**Оценявам положително направеното „Резюме** на литературния обзор“, в което д-р Михайлова успешно обобщава анализираната научна информация относно значението на неензимното гликиране на белтъците (НЕГ) в патогенезата на късните усложнения на захарния диабет, приложението на гликирания хемоглобин HbA1c като утвърден маркер на НЕГ в клинично-лабораторната практика, и информационната стойност и методични различия при определянето и използването на фруктозамина като допълнителен, с определени предимства и недостатъци, биомаркер за хипергликемични състояния в ретроспективен период от 2-3 седмици.

На основата на изводите от литературния обзор, д-р Михайлова извежда целта и задачите на нейната дисертационна работа. Удовлетворена съм, от направените корекции на формулировката на целта на работата, която добре и пълно определя същността на разработения труд. Задачите са формулирани добре, конкретно и точно и са адекватни за постигане на поставената цел.



## **Материали и методи**

Представените методи на проведените експерименти и изследвания са описани добре и подробно, с протоколна точност. Използваните методи са подходящи за решаване на поставените задачи. Те са основно от арсенала на класическата биохимия: **спектрофотометрични методи** (за определяне на ФА, HbA<sub>1c</sub>, Hb, общ белтък, глюкоза, холестерол, ТАГ), **електрофоретични** (ракетна имуноелектрофореза за  $\alpha$ 1-антитрипсин), **хроматографски методи** (*афинитетна* хроматография за гликиран серумен албумин; *йонообменна афинитетна* хроматография за гликирани хемоглобинови фракции, HbA<sub>1</sub> и HbA<sub>1c</sub>; *високоэффективна течна хроматография, HPLC* за Вит 6). Използваните статистически анализи са описани подробно и задълбочено и са проведени със специализирани софтуерни продукти.

В този раздел отсъства описание на групите пациенти и контролни индивиди (деца и възрастни), при които са проведени отделните изследвания. Отсъства и описание на експеримента с опитните животни. Тази информация е дадена в раздела Резултати, но при стандартно структуриране на дисертационните трудове е възприето тази информация да бъде отразявана в раздел «Материали и методи».

За изследванията за определяне на референтни граници на фруктозамин в детска възраст е формирана значителна по обем група от здрави деца, (85 деца) от двата пола на възраст от няколко месеца до 15 години, разделени в две възрастови подгрупи.

По отношение на изследваните групи пациенти (21 деца с диабет тип 1, 18 пациенти с диабетна ретинопатия, 19 възрастни пациенти с диабет тип 2 и още 28 пациента с коремно-хирургични интервенции) и на съответните контролни групи (20 индивиди без диабет, и 8 здрави доброволци при Вит В6 интервенция), смятам, че като цяло те са относително малки и поради тази причина, резултатите от изследванията и заключенията от тях трябва да бъдат интерпретирани и представяни с по-голяма предпазливост, повече като допускание, предположения, отколкото като твърди заключения.

## **Резултатите и обсъждане**

Този раздел озаглавен «Резултати от собствените изследвания» логично е най-обемен -64 стр. Този раздел има нетрадиционна за дисертации структура. В него като отделни самостоятелни подглави се представят изследванията по всяка отделна задача на дисертационния труд. Тези относително самостоятелни подраздели **имат структура на публикация** с въведение, пациентските групи (експериментални животни и схеми на третирания), материали и методи, резултати и обсъжданията. Така в дисертацията се получават повторения. В този раздел е достатъчно да бъдат представени в съответните подглави резултатите и дискусиата към тях, което би допринесло за по-голяма яснота, краткост и по-лесно възприемане на получените резултати.

Тези бележки, относно структурата, **не омаловажават трудът и значимостта** на проведените от д-р Михайлова изследвания и получените от нея резултати и изведените изводи.

Изследванията в дисертационния труд на д-р Михайлова са многостранни и включват *in vitro*, и *in vivo* експерименти, изследвания на серумни показатели на болни (деца и възрастни) и контролни индивиди (деца и възрастни), и интервенции с медикаменти и хранителни добавки на доброволци



и пациенти. За тази многостранна по характер работа са необходими умения и опит в биохимичните и аналитични методи, в работата с експериментални животни, и не на последно място умения за контактуване и работа с хора, които д-р Михайлова е придобила и успешно е приложила при реализиране на задачите, заложи в дисертационния и труд.

Като най-съществени изводи, подкрепени от експерименталните резултати бих отбелязала:

1. Извеждането на референтни граници на серумните нива на фруктозамина при деца, които след това са използвани при анализиране на потенциалното клинично значение на ФА като критерий на метаболитния контрол при диабет тип 1 в детска възраст. На основата на тези референтни стойности, д-р Михайлова установява, че всички пациенти със Д1Т, които са в декомпенсация на заболяването, имат повишени серумни концентрации на ФА, с което се предлага използването на този показател като маркер на метаболитния дисбаланс при захарния диабет в детска възраст.

2. Доказаният инхибиращ ефект на ацетилсалициловата киселина (аспирин) в *in vitro* и *in vivo* условия (остра и хронична фаза на експеримент при животински модел на диабет) върху неензимното гликиране на серумни белтъци и хемоглобин. Установено е, че ефектът е по-значим за ФА отколкото върху гликирания хемоглобин, като ФА се доказва, че е по-добър показател за хипергликемия в по-краткосрочен ретроспективен период от 2-3 седмици.

3. Доказаният инхибиращ ефект на аминогуанидин и Вит В6 в *in vitro* условия върху неензимното гликиране на серумни белтъци и хемоглобин и определяне на оптималните концентрации и съотношения с глюкозата.

4. Доказаният инхибиращ ефект на Вит. В6 и на Коензим Q10-Cг върху неензимното гликиране на белтъците при пациенти с Д2Т след 3-седмичен прием на тези медикаменти/добавки.

5. Повишаване на серумните стойности на ФА на 3ти постоперативен ден при пациенти с коремнохирургични интервенции без данни за нарушен глюкозен толеранс, което обосновава клиничното значение на този маркер за проследяване на метаболитния статус и гликемичния контрол в периперативния период не само при пациенти със захарен диабет.

Резултатите от проведените изследвания са богато илюстрирани с фигури и таблици и са интерпретирани задълбочено в светлината на многобройните литературни данни.

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

Въз основа на направения анализ са формулирани 5 извода и 5 приноси, които са адекватни на получените резултати. Приемам тези приноси, които са основно с приложен характер, но смятам, че трябва да бъдат подразделени на оригинални и потвърдителни.

#### **Критични бележки**

Въпреки високата научна стойност на рецензирания дисертационен труд и направените от докторанта корекции при оформяне на окончателния вариант на дисертационния труд, имам някои забележки и препоръки, които обаче не омаловажават стойността на дисертацията и не променят моето положително мнение.

1. Бележките относно структурирането на литературния обзор, съдържанието на разделите „Материали и методи“ и „Резултати“ и



относно недоброто качество на някои от фигурите в литературния обзор, бяха казани по-горе.

2. При представяне на резултатите от статистическите анализи, не са упоменати степента на достоверност (*p*-стойност) и анализите, които са ползвани (*Student t*-тест, или *Mann-Whitney* тест, *Spearman* корелационен тест, или *Student* корелационен тест,  $\chi^2$ -тест и т.н.). Освен таблиците с индивидуалните резултати за всеки пациент, контрола или експериментално животно (както е представено в дисертацията), е важно да има резултати от статистически анализи за сравняване на показателите между независимите (пациенти към контроли) или зависимите групи (на 1-ви към 3-ти към 21ви ден, например).
3. Наблюдава се разминавания между номерацията на някои фигури в текста и в легендите – в текста фиг. 22; 23; 25; 26; 27 - съответства на фиг. 21, 22; 24; 2; 26 в легендите на фигурите.
4. Наблюдават се някои пропуски и несъответствия в описанията и стойностите в таблици и фигури (фиг. 27, 28, 30, 376 и таблици 10 и 15).

#### **Публикационна активност**

Д-р Михайлова представя списък с 7 научни публикации и 11 съобщения, включващи резултати от дисертационния труд. Две от публикациите са доклади представени на международна конференция и публикувани в списание (*International Journal of Clinical pharmacology therapy and toxicology*) с ИФ (**общ ИФ=1.854**). Забелязани са **12 цитирания** на тези трудове. Останалите публикации са в научни списания, публикувани в България, като 4 се реферират във вторични бази данни.

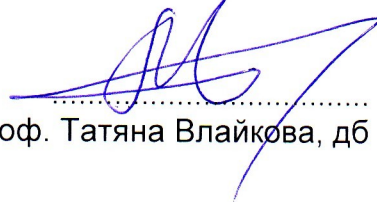
Безспорно е личното участие и принос на д-р Михайлова в планирането, организацията, провеждането, анализирането и представянето на изследванията, което се доказва от факта, че д-р Михайлова е първи автор на 6 от публикациите и на 7 от научните съобщения, и втори във всички останали.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Представеният дисертационен труд на ас. д-р Милка Пенчева Михайлова, на тема: „**Биохимични изследвания на фруктозамин – маркер на неензимно гликирани белтъци при хипергликемични състояния**“ е актуален, с добре формулирани и изпълнени задачи. Получени са резултати, водещи до оригинални и потвърдителни сновно научно-приложни приноси.

Представената дисертационна работа убедително показва, че д-р Милка Михайлова е придобила значителен обем от знания и набор от умения да провежда научни експерименти и способност да анализира получените резултати.

Качествата на дисертационния труд и изпълнените изисквания за необходимите количествени и качествени критерии съгласно ЗРАСРБ, ППЗРАСРБ и Правилника за развитие на академичния състав в МУ-Плевен, ми дават основание да гласувам **положително** и да предложа на уважаемите членове на научното жури да присъди на **ас. д-р Милка Пенчева Михайлова** образователната и научна степен „ДОКТОР“.

  
Проф. Татяна Влайкова, дб