

РЕЦЕНЗИЯ

от

Професор д-р Адриана Иванова Бочева, дм

Медицински Университет- Плевен, Медицински Факултет,

Катедра Физиология и Патофизиология

Относно: дисертационен труд на д-р Армине Вардани Григорян на тема „ИЗСЛЕДВАНЕ РЕГЕНЕРАЦИЯТА НА КОСТНА ТЪКАН В МОДЕЛ НА ОСТЕОПОРОЗА С ЕСТРОГЕНЕН ДЕФИЦИТ ПРИ ЖЕНСКИ ПЛЪХОВЕ ВИСТАР СЛЕД ИНТРАОСАЛНО ПРИЛОЖЕНИЕ НА НОВИ БИОАКТИВНИ ХИБРИДНИ НАНОМАТЕРИАЛИ“ за придобиване на образователната и научна степен “Доктор” в област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт, по професионално направление: 7.1. Медицина и докторска програма „Патофизиология”.

Научни ръководители: Доц. д-р Анелия Димитрова, дм

Проф. Маргарита Апостолова, дб

Рецензията е изготвена на основа на изискванията на Закона за развитието на Академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение, както и Правилника за развитие на академичния състав на Медицински Университет-Плевен, и със Заповед № 937/24.04.2018 г. на Ректора на МУ- Плевен.

Д-р Армине Вардани Григорян е представила комплект документи на хартиен и електронен носител в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в РБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и звания в МУ- Плевен.

Декларирам, че нямам конфликт на интереси, вкл. съавторство в публикациите на дисертанката, с които тя участва в процедурата.

Общи данни за кариерното и тематичното развитие на дисертанката

Д-р Армине Вардани Григорян е родена през 1977 г. в Ереван, Р. Армения. През 2000г. завършва Ереванския Институт по традиционна медицина с отличен успех, диплома АД № 023262.

През 2010г. с удостоверение № 29-80/01.07.2010г. от МОН е признато висшето й образование степен магистър по „Медицина“ с професионална квалификация „Лечебно дело“ на основание чл 10, ал. 2, т.4 от Закона за висшето образование.

Д-р Армине Григорян от 2011г. и до настоящия момент е асистент в сектор Патопфизиология към Катедрата по физиология и патопфизиология МУ- Плевен.

Тя провежда практически упражнения по патопфизиология на студенти от МУ- Плевен.

Придобива специалност по патопфизиология през 2017г., свидетелство рег. № 021091 от 03.07.2017г. Зачислена е за докторант по патопфизиология със Заповед на Ректора № 2329 от 03.11.2014г. на тема:” *Изследване регенерацията на костна тъкан в модел на остеопороза с естрогенен дефицит при женски плъхове Вистар след интраосално приложение на нови биоактивни хибридни наноматериали*”.

Научните интереси на дисертантката са носочени към изучаване на вазоактивни пептиди, матриксни металопроотеинази и тяхната роля при съдовото ремоделиране и регулация, оксидативения стрес на съдовата стена, костното ремоделиране и остеопорозата.

Д-р Армине Григорян членува в Българско дружество по физиологични науки и Българския лекарски съюз.

Дисертантката владее арменски, руски и английски езици.

Актуалност на проблема

Дисертантката д-р Армине Григорян е посветила дисертационния си труд на един актуален, интересен и интердисциплинарен проблем, а именно повлияване на костната плътност при остеопороза с естрогенен дефицит.

Известно е, че остеопорозата е едно от социално значимите заболявания на 21-я век, което се съпътства с повишена честота на фрактури на бедрената шийка, прешлените, предмишницата, „*благодарение*” на намалената минерална плътност на костта, разрушената микроархитектура и променения експресионен профил на протеините.

Болестта засяга над 200 милиона жени по света, като в Европа е значително разпространена, а в България са регистрирани годишно над 90000 фрактури, чийто брой ще нарастне, поради удължаване продължителността на живота, което ще рефлектира върху разходите за лечение на пациентите, както и от необходимостта от

непрекъснати грижи. Следователно, е необходимо да се акцентира върху този здравословен проблем.

Патогенезата на постменопаузалната остеопороза е сложна. Ендокринният дисбаланс отключва различни системни и локални патологични процеси, индуциращи остеоκластната активност. В патогенезата на остеопорозата важна роля играят матриксните металопроτεинази, които модулират матриксното ремоделиране на костта.

Медикаментите подобряващи костното ремоделиране, протектират възникването на нови фрактури, но при някои от болните се наблюдават съпътстващи заболявания от страна на сърдечно-съдовата система, ЦНС, стомашно-чревния тракт, които затрудняват избора на медикамент за лечение.

Този факт „*стимулира*” ортопедите за оперативна интервенция на фрактурите. Но за съжаление при болните с остеопороза прогнозите не са оптимистични, тъй като усложненията се дължат на недостатъчна стабилност на фиксацията и лошото състояние на остеопоротичната кост.

Усилване на регенераторните способности на костта може *да има?* при използване на различни нанопокрития върху имплантите, които ускоряват регенераторните способности на костна тъкан.

В настоящата дисертация е изследвана регенерацията на костната тъкан при остеопороза с естрогенен дефицит след интраосално приложение на нанокompозити, съдържащи нанодиамант.

Структура на дисертацията:

Дисертационният труд е написан на **131** страници, **42** фигури и **11** таблици. Структурата на дисертацията е съобразена със съвременните изисквания: въведение, литературен обзор, цел и задачи, материал и методи, резултати, обсъждане, изводи, приноси, списък на публикации и научни съобщения, библиография.

Относно литературата – трябва да се отбележи, че са използвани **214** източника, от които **204** са на латиница и респективно **10** на кирилица.

Литературният обзор е написан ясно и интелегентно. Дадено е определение на остеопорозата, а именно, че става дума за „скелетно заболяване, характеризиращо се с нарушена костна здравина, предразполагаща към повишен риск от фрактури”. Подчертано е, че тя се нарежда на трето място по разпространение след сърдечно-съдовите и онкологични заболявания. В началните етапи протича безсимптомно и затова е наречена „*тихата епидемия на века*”.

Дисертанката описва анатомията и физиологията на костната система на съвременен ниво, акцентирайки върху етиологията и рисковите фактори в патогенезата на остеопорозата. Ключ за разбиране патогенезата е анализът на процеса на костното ремоделиране и механизма на промените, предизвикващи загуба на костна маса и сила. Както отбелязва дисертанката, информацията за процесите на костното ремоделиране на клетъчно и молекулярно ниво е достатъчна, но липсва цялостна информация за **факторите**, които регулират този процес.

Известно е, че естрогените влияят на различни видове клетки: костно-мозъчни стволови клетки, остеобласти, остецити, остеокласти и хондроцити. Естрогенният дефицит е един от основните фактори за развитие на остеопорозата. Естрогените контролират костната резорбция чрез повлияване на цитокините, които имат роля в остеокластната костна резорбция. Известно е, че почти всички цитокини участващи в костната резорбция (IL-1, IL-6, IL-11) и кост-резорбиращите хормони (PTH, 1,25-дихидрокс витамин D3 и PGE2) упражняват своето действие в присъствието на стромални/остеобластни клетки. На клетъчно ниво, естрогените действат върху различни видове клетки, включително и Т-клетките. Естрогенният дефицит променя регулаторното взаимодействие между Т-клетките и стромални клетки, което води до по-голяма продукция на редица цитокини. В последните години се говори за остеопорозата като за автоимунно и възпалително заболяване. В тази връзка Т-клетките са признати като ключови регулатори в дейността на остеокластите и остеобластите в патогенезата на остеопорозата.

Подчертана е ролята на семейството на матриксните металопроотеинази в патогенезата на костната резорбция, които модулират матриксното ремоделиране на костта чрез повлияване на остеобластната и остеокластната функции.

Направен е анализ на съвременните тенденции за лечение на остеопорозата. Дисертанката подчертава, че това е комплексен и сложен процес, включващ клетъчни събития повлияни от локални и системни фактори. Въпреки, че традиционно прилаганите до момента биоактивни матрици или неорганични молекули се характеризират с добра разградимост, ангиогенезните им свойства са слаби.

За съжаление до момента не съществува успешна стратегия за подобряване на ангиогенезните свойства на макропорестите подложки за костно възстановяване.

Ето защо се използва нова, ефективна техника за получаване на „**интелигентни**” гелове, съдържащи нанодиаменти. Изключителният интерес, към тях се дължи на факта, че имат подобрени биологични характеристики в сравнение с макроразмерните и могат да бъдат прилагани локално (**чрез инжектиране**).

Дисертанката демонстрира задълбочена литературна осведоменост и прави преглед на всички актуални постижения по темата.

На базата на анализа на литературния обзор **д-р Армине Григорян** е формулира **целта и задачите** на проведените изследвания.

Целта е ясно и точно формулирана, а именно да се изследва регенерацията на костната тъкан при животински модел на остеопорозата у женски плъхове порода Вистар в репродуктивна възраст след приложение на биоактивни хибридни наноматериали.

Поставените задачи са шест и са коректно формулирани. Използвани са съвременни методи, които позволяват решаването на поставената цел.

Материал и методи

Експерименталните проучвания са проведени върху 70 женски плъхове порода Вистар с тегло 150-170 гр., отгледани при стандартни условия. Всички процедури са проведени съобразно принципите и етичните изисквания за работа с експериментални животни. Експерименталните групи са правилно формирани, съобразно задачите на дисертацията.

- В ИМБ-БАН са синтезирани и предоставени за предклинично проучване 3D наноструктурирани „**интелигентни**“ полимерни хибридни материали с различни свойства и състав.
- Проведени са предклинични изследвания на тъканната съвместимост на новите наноструктурирани материали
- Използвани са съвременни методи за проследяване на развитието на остеопорозата.
- Взет е биологичен материал за клинично-лабораторно и имунологично изследване

Статистическата обработка на резултатите е извършвана чрез адекватни статистически методи. Използван е статистическият пакет SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, USA). Данните от проучването са описани чрез таблици, графики и числови величини за относителен дял - средни стойности (\bar{X})/медиана \pm стандартно отклонение (SD). За изводи и заключения при сравняване на две средни „несвързани“ проби са използвани параметрични тестове, изискващи нормално или близко до нормалното разпределение - T-test. При сравняване на повече от две средни за изучаване влиянието на различни фактори – ANOVA с последващ тест на Бонферони. При различно от нормалното

разпределение е използван непараметричен тест - Mann Whitney (W) при сравняване на медианни стойности. За установяване на взаимовръзки е използван корелационен коефициент (rS) на Спирман за отчитане на рангова корелация.

Резултатите са представени логично и са добре онагледени.

Дисертантката д-р Армине Григорян е представила **5 публикации – 3 на български и 2 на английски език, и 13** участия в научни форуми - международни и национални у нас и в чужбина. Д-р Армине Григорян е участник **в 3 научни проекта.**

На базата на поставените задачи са представени резултати от:

1. Определяне теглото на експерименталните животни.
2. Получаване и тестване на 3D биоактивни инжекционни хибридни наноматериали.
3. Тъканната съвместимост на нови наноструктурирани материали.
4. Данни за остеопороза при експерименталните животни.
 - *In vivo* сканиране на животни
 - Потвърждаване на остеопорозара, чрез нанонатиск
 - Хистологични изследвания
 - *In vivo* сканиране на животни след прилагането на композитните материали, съдържащи нанодиаменти
5. Определяне на серумните концентрации на калций, фосфор, магнезий и алкална фосфатаза в експерименталните групи.
6. Определяне на серумните концентрации на MMP-9, MMP-13 И TIMP-1 чрез ELISA при групи ГIII И ГIV (OVX И SHAM).
7. Хистологично и хистохимично изследване на костната тъкан при четирите групи.
8. Имунохистохимичното изследване на експресията на MMP-9, MMP-13, SPARC и COL-1 върху препарати от проксималния фрагмент на бедрената кост.
9. Получени корелации от имунохистохимичното изследване на ИХХ експресията на MMP-9, MMP-13, SPARC и COL-1

Получените собствени експериментални резултати след съответната статистическа обработка са изложени ясно и прегледно.

В обсъждането са анализирани и обобщени собствените резултати на базата на литературните данни. Обсъждането потвърждава отличната литературна осведоменост

на д-р Армине Григорян и обективната ѝ оценка на собствените резултати, което и позволява формулирането на изводите.

Дисертанката подчертава, че съвременното фармакологично лечение на остеопорозата включва комбинация от антирезорбтивни и кост-изграждащи медикаменти, намаляващи костната резорбция с постепенно възстановяване на костната структура, но за съжаление те са малко ефективни при лечение на фрактури в резултат на остеопороза. Оперативната интервенция често е безрезултатна. Докато използването на наноматериалите при оперативна интервенция могат да минимизират усложненията и да усилят костната регенерация.

Д-р Армине Григорян подчертава, че след оваректомия, плъховете развиват сходни признаци на костни промени, както при човешката постменопаузална остеопороза т.е. използваният експериментален модел е „**златен стандарт**“ за оценка на ефекта от лечение с медикаменти при остеопорозата.

На базата на литературните данни и получените резултати в промяната на теглото и хистологичната картина на костта при всички експериментални групи, може да се предположи, че полимерите PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ натоварени с нанодиаманти локално блокират адипоцитната диференциация и увеличават остеобластната, което стимулира костното формиране. Наред с това те са и локални инхибитори на MMP-9 и -13, което е от значение, тъй като възпалителният процес е в основата на усложненията, след прилагане на импланти при болни с остеопороза. Предлаганите полимери стимулират експресия на COL-1 и SPARC, което спира развитието на остеопорозата.

Използването на MMPs и TIMP-1, като серумни маркери при остеопорозата не е навлязло широко в клиничната практика. Световна научна общност акцентира върху използването на тези ензими като потенциални маркери за развитие на остеопорозата.

Днес основната терапия при остеопороза е насочена към инхибиране на остеокластната активност, например бисфосфонатите, които инхибират остеокластната активност и по този начин се спира костната дегенерация. Стимулирането на костния растеж чрез потенцирането на остеобластната функция е **основния фокус** при разработването на следващото поколение терапии за остеопорозата.

Бъдещето на лечението на костната тъкан и лечението на остеопорозата вероятно ще се основава на нови технологии, разчитайки на синергичен подход на комбиниране на елементи в сложно проектирано, имплантируемо скеле, което ще стимулира диференциацията на остеобластите и клетъчна инфилтрация, осигурявайки

механична стабилност на увредената или остеопоротичната кост, докато не се формира нов костен растеж способен да замени увредената тъкан.

Предлаганите полимери от дисертанката и нейните ръководители PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀+ND, могат да бъдат използвани като потенциални матрици в костното тъканно инженерство. Способността на тези биохибридни полимерни материали да преминават в структура на гел при телесна температура е от изключително значение за запълването на костния дефект. Те стимулират костната регенерация и увеличават трабекуларната маса чрез увеличена остеобластна и ослабена остеокластна активност.

Изводите представени от д-р Армине Григорян се базират на собствените резултати, като най-съществените от тях са:

1. Прилагане на двустранна овариектомия при женски плъхове порода Вистар предизвиква остеопороза, изразена със засилената костна резорбция, доказана с помощта на *in vivo* сканиране на животните и хистологични изследвания.
2. Установени са повишени серумни концентрации на MMP-9, MMP-13 и TIMP-1 в групата OVX спрямо SHAM .
3. Интраосалното приложение на полимерни материали, съдържащи нанодиаменти води до възстановяване на костната структура при плъховете с модел на остеопороза.
4. Доказано е достоверно понижаване на серумната концентрация на ALP в групата животни третирани с полимери, натоварени с нанодиаменти спрямо групата третирана само с полимери.
5. Имунохистохимично изследване на матриксните металопротеинази MMP-9 и MMP-13 показва следното:
 - Имунохистохимичната локализация на MMP-9 е в остеокластите по резорбционата повърхност на трабекулите и в моноклеарните клетки в костномозъчното пространство, и е повишена в ГIII спрямо останалите групи.
 - Имунохистохимичната локализация на MMP-13 е в остеобластите и остеоцитите, и е повишена в ГIII спрямо останалите групи.
 - Налице е положителна корелациона зависимост между MMP-9 и MMP-13 при групите GI, GII, и GIV.

6. Компонентите на костния матрикс остеоонектин (SPARC) и колаген тип I (COL-1) определени чрез имунохистохимично изследване в групите показват, че:
- Имунохистохимичната локализация на SPARC е в остеоцитите и остеобластите, и е достоверно понижена при ГIII спрямо ГIV, ГII и GI.
 - Имунохистохимичната локализация на COL1 е в остеоцитите, остеобластите и в костния матрикс, и е достоверно понижена при ГIII спрямо ГIV, ГII и GI.
 - Установявена е положителна корелациона зависимост между SPARC и COL1 при групите GI, GII, GIII и GIV.

Приемам изцяло така предложените **приносите** на дисертационния труд. Те имат не само теоретично значение, но представляват интерес за медицинската практика.

Интерес представляват следните приноси:

1. При женски плъхове порода Вистар с остеопороза полимерните матрици, натоварени с нанодиаменти значително понижават MMP-9 в остеокласти и MMP-13 в остеобласти и остеоцити, и повишават SPARC и COL-1 в сравнение с групата третирана само с полимерни матрици.
2. Серумната концентрация на ALP се повишава при плъхове с остеопороза, а добавянето на полимерните матрици, натоварени с нанодиаменти я понижават.
3. Интраосалното приложение на полимерни матрици (PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀), натоварени с нанодиаменти при плъхове с остеопороза води до регенерация на костната тъкан.
4. Установено е, че серумните концентрации на MMP-9 и MMP-13 се повишават при остеопорозата като маркери за остеокластна активност.
5. Няма достоверни разлики в серумните концентрации на калций, магнезий и фосфор при различните групи експериментални животни.

Авторефератът отразява напълно адекватно съдържанието на дисертационния труд.

Базирайки се на всичко взето заедно считам, че представеният ми за рецензиране дисертационния труд на д-р Армине Вардани Григорян отговаря на изискванията и наукометричните критерии за присъждане на образователната и научната степен "ДОКТОР".

Лични впечатления

Познавам д-р Армине Вардани Григорян от представянията ѝ в редица научни мероприятия, от апробацията на дисертационния ѝ труд и от проведените изпит за специалност. Смя да отбележа, че дисертантката се отличава със скромност и отлично владение на материята.

Заклучение

Оценявам дисертационния труд на д-р Армине Вардани Григорян на тема **„ИЗСЛЕДВАНЕ РЕГЕНЕРАЦИЯТА НА КОСТНА ТЪКАН В МОДЕЛ НА ОСТЕОПОРОЗА С ЕСТРОГЕНЕН ДЕФИЦИТ ПРИ ЖЕНСКИ ПЛЪХОВЕ ВИСТАР СЛЕД ИНТРАОСАЛНО ПРИЛОЖЕНИЕ НА НОВИ БИОАКТИВНИ ХИБРИДНИ НАНОМАТЕРИАЛИ“** изцяло положително и с настоящата рецензия изразявам дълбокото си убеждение, че дисертацията отговаря на изискванията за присъждане на образователната и научна степен **„Доктор“** на ЗВО, Закона за развитие на академичния състав в Република България и на Пралиника за развитие на академичния състав на МУ - Плевен.

Убедено предлагам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят на **д-р Армине Вардани Григорян** образователна и научната степен **„Доктор“**.

02. 06.2018г.


проф. д-р Адриана Бочева, дм