



## РЕЦЕНЗИЯ

от

**ПРОФ. Д-Р ЛЮДМИЛА БОНЧЕВА АНГЕЛОВА, ДМ,  
РЪКОВОДИТЕЛ КАТЕДРА „МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА“**

**Специалност/научна степен**– Професор по медицинска генетика, доктор по медицина  
**Институция**– МУ „Параскев Стоянов“ Варна

**Адрес и контакт:** бул. „Христо Смирненски“ №1, УМБАЛ „Св.Марина“, Електронен  
адрес: liudmila.angelova@mu-varna.bg, тел. 0898684701, сл. Тел. 052/978225

### ОТНОСНО:

**Дисертационен труд** на тема *„ЦИТОГЕНЕТИЧНИ И МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С МНОЖЕСТВЕН МИЕЛОМ – ПРОГНОСТИЧНО ЗНАЧЕНИЕ“*

**Автор:** д-р Валентина Димитрова Митева, докторант

**Форма на обучение** - редовна форма, Катедра „Медицинска генетика“ МУ Варна, зачислена по докторантска програма „Генетика“ за придобиване на ОНС „Доктор“, Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление: 4.3. Биологически науки.

**Научни ръководители:** Проф. д-р Илина Димитрова Мичева, д.м.  
Доц. д-р Трифон Георгиев Червенков, д.б.

### Процедура по защита:

Съгласно Заповед № Р-109- 347/ 18.07.2023 г. на Ректора на МУ – Варна съм избрана за член на Научното жури, а на основание Протокол №1/27.07.2023 г.от първото (он-лайн) заседание съм определена за председател на Научното жури и рецензент на дисертационния труд на д-р **Валентина Димитрова Митева** за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ по научна специалност „Генетика“.

Д-р Митева е зачислена като редовен докторант по „Генетика“ със срок на обучение от 3 години (Заповед № Р-109-429 / 16.07.2018 на Ректора на МУ-Варна) при първоначална тема „Предиктивни генетични биомаркери при някои видове Неходжкинови лимфоми“, и научен ръководител проф.д-р Л.Ангелова. Съобразно решение на Катедрен съвет (Протокол №19/11.12.2020) по повод Доклад от Ръководител Катедра по Медицинска генетика (Проф.д-р Л.Ангелова, дм) темата се модифицира на „Цитогенетични и молекулярно-цитогенетични маркери при пациенти с множествен миелом –

прогностично значение“ с научни ръководители доц.д-р Трифон Георгиев Червенков, дб и доц.д-р Илина Димитрова Мичева, дм (Заповед №Р-109-23/15.01.2021 на Ректора на МУ Варна).

Етапите на докторантурата за допускане до защитата са спазени - решение на ФС (Доклад №103-3473 /13.07.2023 от Декан на Факултет Медицина разрешава възможност за удължаване на редовния срок с 6 месеца и прекъсване обучението за срок от 1 година по лични причини на докторанта. Докторантът е отчислен с право на защита (Заповед № Р-109- 347/ 18.07.2023 г.на Ректора на МУ – Варна).

Дисертационният труд на д-р Валентина Митева е изработен в Катедра по Медицинска генетика на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна; Лаборатория по медицинска генетика и Клиника по клинична хематология към УМБАЛ „Св.Марина“ЕАД Варна. По процедурата за защитата д-р Митева е представила всички необходими материали съгласно изискванията на ПРАС на МУ–Варна.

Настоящата рецензия е разработена и представена съобразно изискванията на Закона за развитие на академичния състав на Република България /ЗРАСРБ/, Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за развитие на академичния състав в Медицински университет /МУ/ - Варна. Декларирам, че нямам конфликт на интереси с автора на дисертационния труд.

### **Кратки биографични данни и професионална квалификация**

Д-р Валентина Димитрова Митева е родена на 23.04.1984г. в град Балчик. Завършва средното си образование в СОУ „Стефан Караджа“, природо-математически профил, в гр. Каварна (Диплома № 585-55/2003), а висшето си образование по медицина в Медицински университет „Проф.д-р Параскев Стоянов“ Варна, (Диплома № 001457/2011). През същата година започва работа като лекар (по заместване) в Лаборатория по медицинска и молекулярна генетика на УМБАЛ „Св.Марина“ за 4 месеца до март 2012; продължава като лекар-ординатор в Неврологично отделение на „МБАЛ-Каварна“ ЕООД за 9 месеца през 2016 г.

Академичното си развитие д-р Митева започва през октомври 2016, когато след конкурс е назначена за редовен асистент към Катедра „Медицинска генетика“ на МУ-Варна (до октомври 2021) и за лекар-специализант към Лаборатория по медицинска генетика при УМБАЛ“Св.Марина“ Варна (до юли 2022 г).

Придобива специалност по Медицинска генетика (Диплома №025289 /01.01.2022г). Изгражда професионални умения и компетенции адекватни за изпълнение на преподавателска дейност по медицинска генетика на студенти „Медицина“, българо- и англо-езиково обучение и на студенти от ФОЗ „Акушерка“. Прави впечатление широкият спектър от интереси на д-р Митева като участия в квалификационни курсове и специализации, както и в 3 научни проекта финансирани от Фонд „Наука“ МУ Варна по проблемите инфертилитета и неизяснени генетични болести при деца. Тя е съавтор на 19 пълнотекстови публикации ( 10 от които в списания, индексирани в Web of Science / Scopus) и на 29 публикации в резюме (15 от които в индексирани списания).

## **Структура на дисертационния труд**

Дисертационният труд е написан на 123 страници и е онагледен с 39 фигури и 12 таблици. Включено е и едно Приложение. Ползваните заемки от цветни фигури и фотоси са с цитирана принадлежност на съответен автор.

Дисертацията включва: съдържание (3 стр.), съкращения (4 стр!), въведение (2 стр.), литературен обзор (45стр.), работна хипотеза (липсва), цел и задачи (2 стр.), клиничен контингент и методи (16стр.), резултати от проучването (21 стр.), обсъждане (5 стр) изводи (1 стр.), приноси (1стр.), библиография (24 стр.), публикации свързани с дисертационния труд (1 стр.). Библиографията обхваща 206 литературни източника, от които 4 на кирилица, като повечето са от последните 10 години.

Авторефератът, 69 стандартни страници, е написан в съответствие с дисертационния труд.

*Забележка: Научният труд е структуриран в 8-те стандартни раздели, в приемливо съотношение при доминиращ обем на литературния обзор.*

## **Актуалност на тематиката на дисертационния труд**

Предоставеният за рецензия дисертационен труд засяга актуална тема свързана с необходимостта от подобро прогностично значение и осъвременяване подхода за лечение на Множествения миелом (ММ). Касае се за инвалидизиращо заболяване с висока честота в развитите страни и сложен геномен фенотип на миеломните клетки. Разбирането на поведението на тези клетки, на тяхната биология, са фактори с прогностично значение и са от изключителна важност за диференцирането на рискови групи и за оптимизиране на прилаганата терапия.

**Литературния обзор** впечатлява с обема си, онагледен с 20 фигури и 9 таблици. В него авторът правилно систематизира научната информация по разработваната тема, на места, с излишни пропедевтични детайли. Систематизирани са научните данни и се показва добра информираност по отношение на 1) Исторически и съвременен преглед върху биологията на Миеломна болест и 2) Клинични и лабораторни характеристики и стадий, класически и нови прогностични биомаркери.

Подкрепя се тезата, че в подпомагането на диагнозата и провеждането на терапия от основно значение са и генетичните изследвания, като най-често се използва конвенционалната цитогенетика (ЦГ) и флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH). Изяснява се, че в ранните етапи на ММ, кариотипът в повечето случаи е нормален, а поради ниската митотична активност на миеломните клетки криптични аберации остават „скрити“. В късните стадии на заболяването ЦГ може да идентифицира между 30-50% от хромозомните аномалии. Поради тази причина предлаганото отчитане на молекулярно-цитогенетичния профил чрез FISH (определящ протичането на заболяването) има за цел адаптиране към (Ревизираната) Международна стадираща система за разкриване на високо-рискови пациенти с ММ.

Представена е богата научна библиография, която показва доброто познание на докторанта за значими приноси от световно признати водещи хематолози в чужбина. Има дефицит на разработки от български автори в нучното и приложно поле на множествения миелом.

*Забележка Липсва Обобщение на обзора, от което да бъде логично изградена и Работна хипотеза даваща основателни аргументи за избора на разработваната тема.*

**Целта** на настоящия дисертационен труд е формулирана ясно - да се установи и анализира вида, честотата и прогностичното значение на хромозомните нарушения при новодиагностицирани пациенти с клинична диагноза множествен миелом. За постигането на тази цел са формулирани **7 задачи**, които са логически свързани и в синтезиран вид.

1. Да се *селектира обекта* на проучването, да се групира по стадии
2. Да се установи *честотата и структурата (вида)* на откритите хромозомните аберации
3. Да се анализират хромозомните аберации разкрити чрез *конвенционален цитогенетичен* метод и тяхното прогностично значение.
4. Да се анализират хромозомните аберации разкрити чрез *молекулярно-цитогенетичен* метод FISH и тяхното прогностично значение.
5. Да се направи анализ на *количеството плазматични клетки* в костен мозък спрямо цитогенетичните резултати.
6. Да се установи *преживяемостта* спрямо *цитогенетичните* резултати.
7. Да се направи сравнителен анализ на кривите на *преживяемост* в зависимост от стадиращата система.

Особен акцент отдавам на трета, четвърта и до шеста задача, свързани с възможността да се изведе корелация на клетъчно и субклетъчно ниво за генетични биомаркери с прогноза и преживяемостта на пациенти с ММ. От изясняваща редакция се нуждаят шеста и седма задача.

**Материал и методи** - разделът е представен в достатъчен обем. В проучването са включени събираните проспективно и ретроспективно данни за **110** новодиагностицирани пациенти с множествен миелом на възраст от 38 до 91 г. Пациентският контингент е насочван от университетската клиника по хематология на УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна за генетичен анализ в Лаборатория по Медицинска генетика на УМБАЛ „Св.Марина“ ЕАС Варна. Използвана е и информация от болничната електронна база данни.

Периодът на проучването е 5 години (2016-2020г), сравнително кратък срок за обхващане, като се има предвид рядкостта на заболяването. Пациентите са диагностицирани съгласно общоприети диагностични и риск стратифициращи критерии на Международната работна група по миелом; основен критерий за включване в проучването е пациентите да са с проведен конвенционален цитогенетичен и/ или молекулярно-цитогенетичен анализ чрез FISH.

Генетичните методи, усвоени и прилагани от докторанта са описани пропедевтично подробно и прецизно в лабораторни протоколи, така че биха могли да бъдат възпроизведени като основни техники за работа. Използван е статистически панел с богат набор от статистически методи с конкретно поставени групи въпроси и софтуерни продукти, лично дело на докторанта.

*Забележка Изключващите критерии търнят презициране - според изследователските методи пациентите са разпределени в 2 основни групи генетични изследвания, които не са обработени с едни и същи методи*

Резултатите са представени в отговор на поставените задачи и са онагледени с 3 таблици, 10 фигури и 1 Приложение, представлящо извадка от демонстративни кариограми и FISH сигнали при пациенти с патологични резултати. Приложените таблици и фигури са без дублиране на информацията. Според вида на поставените въпроси за разрешаване и проведените проучвания, резултатите са групирани в 3 групи и онагледени в Описание на пациентите по демографски показатели (възраст, пол) и стадираща система.

- Резултати от провеждане на конвенционален цитогенетичен анализ при 97 пациенти
- Резултати от прилагане на молекулярно-цитогенетично изследване (чрез флуорисцентна ин ситу хибридизация) при 30 пациенти
- Оценка на хромозомната находка и стадий към *средната* преживяемост на пациентит

Цитогенетичното изследване за прогностично значими хромозомни аберации за 5 годишен период е проведено при 97 пациенти, успешно при 83 (86%) от тях (*много добра методична успеваемост за добив и анализ на костно-мозъчни култури при пациенти с ММ*). Смятам таблица 11 тук за ненужна (нормална хромозомна находка на всички изследвани) и неточно озаглавена (колона с резултати от частично приложен FISH).

Интерфазен FISH анализ е проведен еднократно, със селектирани сонди при разнородна група от 30 пациенти, в т.ч. 17 обхванати от двата анализа. Така авторът, обяснимо е попаднал в капана на малките по брой пациентски групи, което ограничава възможностите за сравнимост на статистическите методи. Молекулярна цитогенетика с различни сонди за онкохематологични маркери е приложен практически при :

- 9 пациента – за търсене на del(17)(p13): открита в 6 лица (67%)
- 15 пациенти - търсене на del(17)(p13), транслокация t(4;14) и транслокация t(14;16): открита del(17)(p13) в 3 (20%); транслокации не са установени
- 6 пациента - търсене на преустройство в IGH гена (rear 14q32): неустановено.

Сред изследваните пациенти най-представена е del(17)(p13) наблюдавана в 67% (6/9)- хромозомният маркер, чието присъствие се асоциира с неблагоприятна прогноза. Намирам за удачно тези случаи да бъдат описани в таблица с разкрити хромозомни нарушения, съпоставяща двете генетични изследвания (по използвана сонда/и del (17)(p13); t(4;14), t(14;16); rear14q32). Така би се очертал паралелът мутационен статус - разкриваемост. Висока научна стойност би имала възможността за прилагане на по-разширен набор молекулярно-генетични маркери въвличащи IGH гена t(6;14), t(11;14), t(14;20) или набор, свързан с критериите за стратификация по Mayo за определяне на стандартен и висок риск при по-широк обхват на пациенти с ММ (посочени в таблица 7 на Литературен обзор). Вероятно това е въпрос и на финансиране за научни цели при бъдещи разработки. За цитогенетично неуловени преустройства в 14q32 региона (IGH гена), въведен и приложим е методично деликатен, но високо-чувствителен молекулярно-генетичен ДНК анализ чрез обратна транскриптаза на селектирани клетъчни популации - плазмоцити.

Внимание привлича оценката, която прави докторантът на *статистически значима разлика* при съпоставяне на *средната* преживяемост на пациентите с: а) резултата от цитогенетичното и молекулярно-цитогенетично изследване; б) ISS стадия на заболяването, където и смъртността по клиничен стадий е значима. Наблюдава се липса на статистически значима разлика между средната преживяемост и резвизираната международна стадираща система R-ISS. Извеждане на констатациите е от сравняване на кривите на Kaplan–Meier или регресионен анализ.

Приемам посочените резултати и тяхната статистическа обработка, като адекватни на поставените цел и задачи.

*Забележка - характеризирането на пациентите по пол и възраст е тяхна базисна характеристика и трябва да бъдат в раздела „Материал (пациенти) и методи“, а не в раздел Резултати.*

**Дискусията** е основен раздел за всеки дисертационен труд, в който докторантът анализира получените резултати в контекста на познанията си от литературния обзор и търси логичен анализ в оценка и съпоставимост.

В сходни по обем популационни проучвания се откриват сходни данни за средна пвъзраст на заболяемост (62г) и възраст за пик на заболяемост 65-69 години (25,45%).

Потърсена е обща честота на хромозомни нарушения при болни с ММ с множество проучвания с близък брой обхванати пациенти, където границите на патологията се движат в интервал 31,1% до 66%, на фона на разкритата в конкретното проучване от 20% което се нуждае от обсъждане на методичния подход за съпоставка.

Докторантът надгражда хромозомните маркери и умело се насочва към молекулярно-цитогенетично ниво, което има стойност на прогностичен и предиктивен маркер за по-прецизна оценка на риска от прогресия. Авторът се опитват да оцени находките спрямо клиничния стадий макар и в малка група от пациенти, като излиза извън рамките на генетичното лабораторно познание и търси интердисциплинарен подход към хематологично засегнати пациенти, неизползван в масовата клинична практика.

Удачно е да се коментират и получени находки като делеция в 8q24 както и 45,ХУ, –У. Най-честите монозомии са по хромозоми 13,14,16 и 22, но при някои от пациентите се установява загуба на Х или У хромозома<sup>189</sup>.

*Забележка Кратко застъпен раздел, с елементи на литературен обзор и непълнота в анализ.*

**Изводите** на научния труд са базирани на получените данни и отговарят на поставените цел и задачи.

1. Приложеният сравнителен анализ на честотата и структурата на хромозомните нарушения при новодиагностицирани пациенти с ММ показва голямо съответствие на данните от нашето проучване с тези описани в литературата.
2. Честотата на откритите хромозомни аберации установени чрез конвенционална ЦГ е 17% (n=14), като те са разделени на хипердиплоидни и нехипердиплоидни. Честотата за открита патология чрез FISH анализ е 30% (n=9).
3. Оценката на откритите хромозомни нарушения чрез ЦГ:
  - При пациентите с хипердиплоиден кариотип преобладават тризомите
  - При пациентите с нехипердиплоиден кариотип преобладават структурните нарушения
4. Оценката на откритите хромозомни нарушения чрез FISH анализЧрез FISH анализ при 9 пациента (30%) е открита делеция в 17 хромозома – del(17)(p13), при останалите резултата в бил нормален.

5. Установена е зависимост между количеството плазматични клетки в аспирационна биопсия на КМ и патологичните кариотипи:
  - При всички пациенти (n=14) с патологичен кариотип броя плазматични клетки е надхвърлял 30%.
  - При пациентите с нормален кариотип при 51% (n=35) процента плазматични клетки в КМ е надхвърлял 30%, при 32 (46%) е бил по-малко от 30%, а при двама (3%) стерналната пункция е била суха.
6. Установява се статистически значима разлика по отношение на средната преживяемост спрямо цитогенетичната находка, при пациентите с нормален кариотип тя е 34 месеца, а при тези с патологичен – 8 месеца (p=0, 0493).
  - Не се установява статистически значима разлика в средната преживяемост между пациентите с хипердиплоиден и нехипердиплоиден кариотип вероятно поради малкия брой пациенти (p=0, 63). Същото се отнася и за откритите хромозомни нарушения по ISS стадий (p=0,094).
7. Статистически значима разлика се установява в преживяемостта спрямо ISS стадия (p<0, 05) Данните от анализа показват средна преживяемост от 11 месеца при пациентите в трети стадий. При тези във втори стадий тя е средно 60 месеца, а в първи – 67 месеца.
  - Не се откри статистически значима разлика в преживяемостта спрямо R-ISS стадия (p=0, 14). Средната преживяемост на пациентите във втори стадий по R-ISS е 41 месеца, а в трети – 18 месеца.

*Забележка. Начинът за представяне на болшинството изводи е приемлив. Някои от изводите се нуждаят от пояснение за да не звучат като констатации (1) или обяснения (6), други от редактиране (3,4) за да отговорят на задачата за прогностичното им значение.*

Приемам авторската самооценка за **приносите** на дисертационния труд, оформени в 2 групи, без приноси с оригинален характер.

***Приноси с потвърдителен характер***

1. Потвърдено е значението на системите за класификация и рисковата стратификация като прогностични фактори
2. Потвърдено е значението от приложението на конвенционален цитогенетичен метод и FISH анализ като рутинни методи с цел разграничаване на ниско и високо рискови пациенти с ММ
3. Потвърдено е значението на хромозомните нарушения като прогностичен фактор за преживяемостта в българската популация

***Приноси с приложен характер***

1. При всички новодиагностицирани пациент с ММ се препоръчва провеждане на ЦГ и FISH, които са от изключително значение при избора на терапевтична схема, а също и за прогнозата.
2. Насочването за изследване на t(4;14) и del(17p), които са с неблагоприятна прогноза при новодиагностицирани пациенти с ММ, се препоръчва като задължителен елемент от диагностичния панел изследвания.
3. Препоръчително е анализа за t(4;14) и del(17p13) да се провежда чрез FISH.

По приносите с приложен характер намирам неточност (1) касаеща избора на терапевтична схема (необвързвана корелация) и немотивираност (3) за прилагане на FISH за търсене на t(4;14) в резултат от настоящия труд.

**Трудове във връзка с дисертацията**

По научната си разработка д-р Митева е представила: **5** публикации в *пълен текст* (в съавторство): **3** в реферирани списания *Archives of Hellenic medicine* (2023), *Cytology and Genetics* (2023), *Обща медицина* (2019) и **2** в сп. *Медицински преглед* (2022) (2021); както и **2** публикувани съобщения от участия в научни форуми: *Abstract Book HemaSphere* (2021) и *European Journal of Human Genetics* (2020). Прави добро впечатление, че

докторантът е първи или втори автор в тях; публикациите в *Archives of Hellenic medicine, Cytology and Genetic* и резюмето в *European Journal of Human Genetics* са реферирани списания с импакт фактор. Почти всички са от периода на последните три години (2021-2023) след обхванатия период, което обяснява до известна степен и процедурното забавяне по защитата на дисертационния труд.

### **Критични бележки, коментар и препоръки към дисертационния труд:**

Отделните бележки и коментари съм представила по раздели.

Обобщеното ми виждане върху научната разработка е, че по същество тя представя придобит лабораторен (лично умение и изработване) и анализаторски опит за молекулярно-цитогенетично изследване на пациенти с миеломна болест в помощ на клиничната онкохематологична практика. Съгласна съм напълно със становището на д-р Митева за ограничения в проучването, произтичащи от малкия брой пациенти с приложен FISH анализ за кратък период на обхващане (5 години). Известна ми е финансовата тежест на изследванията в областта на молекулното ниво в медицината (генетика) и разбирам рестрикциите, произтичащи от този фактор. Насърчавам докторанта да продължи придобития опит чрез разширени кохортни проучвания и с други генетични анализи при пациенти с ММ за по-дълъг период от време за да задълбочи научната дискусия за целите на клиничното приложение.

Някои структурни и технически препоръки, за съображение в бъдещи научни разработки (роля и на научните ръководители) са свързани с представяне на Научна хипотеза и Обобщение на литературния обзор; научно прецизиране на цитогенетични маркери и FISH сигнали съобразно приетата номенклатура.

В личен план - познавам докторантката д-р Митева от постъпването ѝ в Катедрата през 2016 до 2022. Като асистент и специалист, тя притежава много добри теоретични и практически познания в областта на медицинската генетика, които ежедневно прилагаше в практиката си като лекар и преподавател. Та е колаборативен и толерантен колега с умения за работа в екип и с технически умения (сертифицирани компетенции) за работа с компютърни програми и платформи.

### **Заклучение:**

Дисертационният труд демонстрира добри познания на докторанта в областта на биологичните, генетични науки (теоритични и лабораторни) и умения за ползване на статистическа методи и бази данни при обработка за тяхното клинично приложение на актуална тема. Докторантът покрива наукометричните критерии съобразно правилника за академично развитие на МУ-Варна за присъждане на научно-образователна степен „Доктор“. Препоръчам на научното жури да присъди научно-образователна степен „доктор“ по научна специалност „Генетика“ на д-р **Валентина Димитрова Митева**.

**25.08. 2023**    **Председател на НЖ (рецензент):**

**ПРОФ. Д-Р ЛЮДМИЛА АНГЕЛОВА, ДМ**