

## СТАНОВИЩЕ

От проф. Румен Мирчев Балански, дмн, СБАЛО-ЕАД, включен в състава на Научно жури със заповед № 267 от 17.07.2013 г. на директора на Института по биофизика и биомедицинско инженерство към БАН.

**Относно** дисертационен труд на тема “Термодинамичен профил на плазмения протеом при злокачествени заболявания” представен от инж. Светла Желязкова Тодинова за придобиване на научната и образователна степен “Доктор” ” в област на висшето образование 4. ”Природни науки, математика и информатика” по професионално направление 4.3. “Биологически науки” и по научната специалност “Биофизика” . Научен ръководител на дисертанта е проф. Стефка Германова Танева, дбн.

Представеният за рецензиране дисертационен труд е написан на 131 стр. и съдържа 12 таблици и 29 фигури. Структуриран е по схема близка до общоприетата, а именно: съдържание и списък на съкращенията (3 стр.), увод (2 страница), цел и задачи (2 стр.), литературен обзор (30 стр.), методи и обекти на изследване (7 стр.), експериментални резултати и дискусия (33 стр.), обобщение (3 стр.), справка за научните приноси (2 стр.), списък на литературата, включваща 140 литературни източника, от които 2 на кирилица (12 стр.), списък на публикациите на автора и установени цитирания (3 стр.). Би било по-правилно целите и задачите да бъдат поставени след литературния обзор, доколкото се предполага, че са формулирани въз основа и след аналитичния преглед на наличната литература.

Дисертационният труд е посветен на **съществен, важен от биологична и чисто клинична гледна точка проблем**, а именно, възможностите за използване на количествените и качествени промени на протеините, съдържащи се в серума и плазмата на кръвта, съответно, за целите на клиничната диагностика и в частност, при ранната диагностика, прогнозата и проследяването на хода на неопластичните заболявания при човека. От десетилетия в клиничната практика се използват, с оглед диагностиката на редица заболявания, количествени и качествени анализи на някои специфични протеини, съдържащи се в кръвния серум или в други телесни течности. През последните години се засили стремежът да се търсят подходящи индикаторни протеини, някои от които секретирани в много малки количества, които могат да служат като биомаркери за оценка на патофизиологичното състояние на отделни тъкани и/или клетки. Последното от своя страна би подпомогнало ранната диагностика на редица патологични състояния, включително и на неопластичните заболявания. Успешното идентифициране на подобни биомаркери, което често зависи от прилагането на нови методи за анализ, може да разкрие нови хоризонти пред скрининга и ранната диагностика на туморите, и в резултат от това да доведе както до повишаване ефективността на провежданото лечение, така и до по-прецизно проследяване на развитието на болестта, прогнозата и оценка на резултатите от приложеното лечение. Следователно, областта на познанието, към което е насочила вниманието си дисертантката при разработване на дисертационната тема, е важна и изключително перспективна от клинична гледна точка. Научната и научно-практичната стойност на проучването нараства и от факта, че избраният от инж. Тодинова метод за изследване на концентрацията, конформацията и/или възможните взаимодействия между отделните протеини, а именно диференциалната сканираща калориметрия, се прилага при болни със злокачествени заболявания от 5-6 години, което дава възможност за получаване на оригинални резултати.

От казаното до тук става ясно защо приемам, че **темата на дисертационния труд е актуална и десартабилна.**

**Литературния обзор**, така както е написан от дисертанта, дава подробна информация за основните групи протеини, които се съдържат в серума и/или плазмата на кръвта, тяхната структура и основните функции, които те изпълняват в човешкия организъм. Анализирани са и въпроси свързани с термодинамичното поведение на тези протеини, както и възможното им приложение като биомаркери при диагностиката на някои заболявания, включително и при неопластичната патология. Достатъчно подробно с оглед целите на изследването са разгледани и въпроси свързани с патогенезата, диагностиката и прогнозата на Мултиплиения миелом и карциномите на стомаха и дебелото черво – неопластични заболявания, които са избрани от дисертантката като модел за изучаване на плазменния протеом въз основа на термодинамичните особености на плазмените компоненти. Ясно, макар и кратко, авторката на дисертационния труд е описала също така и характеристиките на диференциалната сканираща калориметрия (ДСК), както и принципите на които се базира този модерен метод. Тази информация е важна за правилното разбиране и съответно, за правилното тълкуване на получаваните в хода на изследването резултати. В края на литературния обзор дисертантката кратко е обсъдила някои резултати получени с помощта на ДСК при пациенти с различни заболявания и възможните трактовки на получените термограми сравнени с тези при здрави лица. Недостатък на иначе хубавия обзор е липсата на финален, обобщен, критичен анализ на наличната литература с конкретно очертаване на неясните и/или неизучени до сега аспекти на обсъжданите проблеми, от които логично да следва формулирането на целите и конкретните задачи на дисертационното изследване. Авторката на дисертационния труд би могла също да не навлиза в ненужни подробности относно етиопатогенезата на колоректалния карцином и карцинома на стомаха, и в частност в молекулярните механизми на злокачествената трансформация на епителиалните клетки, което би я предпазило от допускането на някои неточности както в отношение на описваните процеси, така и в използваната терминология.

Въпреки това, обзорът като цяло е ясен, достатъчно информативен и изпълнява предназначението си като дава представа за избория от авторката изследователски проблем и пътищата, по които тя ще търси решение на поставените задачи.

**Целта на изследването** е да се проучат с помощта на диференциална сканираща калориметрия особеностите и спецификата на термограмите характеризиращи серумните протеини при болни с хематологични (множествен миелом) и солидни (карциноми на стомаха и дебелото черво) неопластични заболявания и да се анализира възможното използване на споменатите термограми в качеството им на биомаркер(и) приложими при ранната диагностика на злокачествените заболявания и при проследяване на тяхното развитие, и ефектите от прилаганата терапия. Формулираните конкретни задачи позволяват целите на изследването да бъдат постигнати.

**В частта “Материали и методи”** дисертантката е дала подробна информация относно броя и характеристиките на пациентите с Мултиплен миелом (370 пациенти), колоректален карцином (74 пациента) и карцином на стомаха (8 пациента), както и на 53 здрави доброволци, които са били включени в дисертационното изследване. Прави впечатление големият брой пациенти, особено при първите две заболявания, при които са получени и съответно анализирани калориметрични профили на плазмените протеини, което е предпоставка за висока достоверност на получаваните резултати и

направените изводи. Липсва обаче информация за разпределението на пациентите по пол, както и за стадия на заболяване при пациентите с тумори на стомаха.

Освен ДСК, който е основен метод използван в дисертационното изследване, дисертантката е прилагала и електрофорезен анализ за изучаване на физичните свойства на серумни протеини, както и имуно-химични методи, когато това е било необходимо. Използваните методи са адекватни на целите на проучването.

**Резултатите от проучванията** на дисертантката носят оригинален характер. Например, за първи път са получени и анализирани термограми от кръвен серум при пациенти с различни форми на Мултиплен миелом (ММ). ДСК-профилите на тези болни се различават от съответните профили получени при здрави доброволци. Нещо повече, установени са съществени различия между термограмите на пациентите страдащи от трите форми на ММ, а именно, секретиралите моноклонални имуноглобулини, секретиралите т.нар. белтък на Бен-Джонсън и тези несекретиралци моноклонален белтък. По-големи отличия в ДСК-профилите се регистрират в серума на пациенти с по-високи нива на моноклоналните белтъци. Термограмите се характеризират с 2 или 3 температурни прехода. Установена е корелация между топлинния капацитет на основния температурен преход и концентрацията на моноклоналния белтък в серумните проби.

При пациенти с ММ секретиралци белтък на Бен-Джонсън се регистрират 2, 3 или 4 температурни прехода, като в първите две групи могат да бъдат различени по 2 подгрупи отличаващи се една от друга по температурата на основния преход.

При пациенти с несекреторен ММ се наблюдават термограми сходни с тези, които са характерни за пациентите с ММ секретиралци белтъка на Бен-Джонсън и, които могат да бъдат разпределени в 3 групи като отново първите две групи могат да бъдат разделени на 2 подгрупи.

Установените закономерности като цяло показват, че термопрофилите на серумните белтъци при болни с ММ са хетерогенна група, но имат специфични характеристики обусловени от наличието и типа на моноклоналните протеини, както и от възможните макромолекулни взаимодействия. Анализирайки получените оригинални резултати дисертантката е формулирала 3 основни термодинамични характеристики на Множествения миелом както следва: а) стабилизиране на серумния протеом спрямо температурно денатуриране; б) намаляване на съотношението на топлинните капацитети албумин/глобулин и в) липса на преход при 85<sup>0</sup>С в 88% от случаите с ММ.

Проучванията на дисертантката демонстрират също така, че и при пациенти с тумори на дебелото черво се регистрират ДСК-термограми на кръвна плазма различни от тези установени при здрави донори. И при тези термограми може да се разграничат въз основа на температурните преходи 3 основни групи, като всяка една от тези групи би могла да са раздели на 2 подгрупи. И при тези болни се наблюдава хетерогенност на ДСК-профилите на кръвната плазма, но и в този случай дисертантката е извела 2 общи характеристики, а именно: а) силно изменение на температурните преходи свързано със съотношението на плазмените албумини и глобулини и б) липса на изразени преходи във високотемпературната област на ДСК-термограмите в сравнение с тези установени при здрави контроли. Важно е също така да се отбележи, че не е била установена корелация между характера на съответната термограма и TNM-стадия на заболяването, както и това, че след хирургично лечение не са били регистрирани промени в съответните термограми приближаваща ги към тези характерни за здравите индивиди.

При съобщаване на резултатите от изследванията при тези болни не са представени конкретни данни за възможна зависимост между TNM-стадия на

заболяването и характера на съответните термограми, въз основа на които е направен горе-посочения важен извод, както и липсва съпоставка между характера на термограмите и данните за другите клинични биомаркери (СЕА, СА 19-9 и СА 125), характеризиращи отделните пациенти и предоставени от СБАЛО-ЕАД.

Казаното до тук показва, че в хода на изпълнението на дисертационното изследване са получени разнообразни, оригинални резултати, които, освен собствената си информационна стойност, разкриват перспективи за по-нататъшни изследвания и подсказват, че анализите на термодинамическите характеристики на неопластичните заболявания могат да дадат нова и полезна информация както за патогенезата на тези заболявания, така и за тяхната ранна диагностика, прогноза и за проследяване развитието на заболяването.

Приемам направените от дисертантката 4 “обобщени” **изводи** и формулираните **приноси**, които съответствуват на получените резултати. Ще отбележа, че приносите от 1 до 5, макар и частично да се припокриват, са оригинални, докато принос 6 е потвърдителен, но също стойностен доколкото този тип анализи сега “набират скорост”. Съдържанието на дисертационния труд е представено пълноценно в автореферата.

Във връзка с дисертационния труд в престижни международни списания с висок Импакт фактор (9.704) са публикувани 2 статии, като и в двата случая инж. Тодинова е 1-ви автор, което подсказва за нейния принос при изпълнение на дисертационното изследване. Освен това, резултатите от извършените проучвания са били докладвани по време на работата на 5 авторитетни научни форума, от които 2 международни. Вече са регистрирани 8 цитата на 2-те международни публикации на инж. Тодинова, което е доказателство за предизвикания интерес към резултатите на научните изследвания на авторския колектив.

**Заклучение:** Представеният за рецензиране дисертационен труд на инж. Светла Желязкова Тодинова е посветен на важен биологичен и клиничен проблем свързан с анализ на възможностите за използване на количествените и качествени промени на серумните и/или плазмени протеините при ранната диагностика, прогнозата и проследяването на неопластичните заболявания при човека. Дисертационното проучване е планирано добре, използвани са подходящи методи и в резултат от проведените изследвания са получени разнообразни, достоверни резултати, повечето от които оригинални и разкриващи перспективи за нови изследвания в спомената област. Считам, че дисертационният труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и представя дисертанта като учен способен да организира и провежда задълбочени по своя характер научни изследвания.

Въз основа на казаното до тук препоръчвам на членовете на уважаемото Научно жури да гласуваме положително на официалната защита и да удостоим инж. Светла Желязкова Тодинова с научната и образователна степен “доктор” по научната специалност “Биологически науки” с шифър 4.3.

София, 26.08.2013 г.

/проф. д-р Румен Мирчев Балански, дмн/