



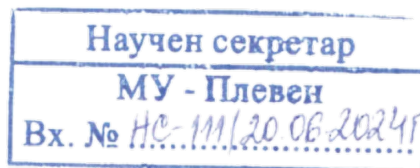
ДО

ДОЦ. Д-Р ВАНЯ СЛАВЧЕВА ПОПОВА, ДМ

ПРЕДСЕДАТЕЛ НА НАУЧНО ЖУРИ

ОПРЕДЕЛЕНО СЪС ЗАПОВЕД № 1429/28.05.2024г

НА РЕКТОРА НА МУ-ПЛЕВЕН



## РЕЦЕНЗИЯ

От: Проф. Д-р Веселина Горанова-Маринова, дм

Ръководител секция „Хематология“, Първа катедра по вътрешни болести, МФ

Заместник – ректор по учебна дейност на МУ-Пловдив

Външен член на научно жури според заповед №1429/28.05.2024г

на Ректора на МУ-Плевен

**Относно:** процедура за придобиване на научна и образователна степен „Доктор“

**Област на висшето образование:** 7. „Здравеопазване и спорт“

**Професионално направление:** 7.1. „Медицина“

**Докторска програма:** „Хематология и преливане на кръв“

**Автор:** Д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова, асистент към сектор „Хематология“, Катедра „Нефрология, хематология и гастроентерология“, МУ-Плевен

**Форма на докторантурата:** Самостоятелна подготовка

**Тема:** "Клинично значение на генетични, имунологични и коморбидни фактори за определяне тромбогенния риск при пациенти с миелопролиферативни неоплазии"

**Научен ръководител:** Проф. д-р Лиана Тодорова Герчева-Кючукова, д.м. и Проф. д-р Катя Стефанова Ковачева-Коцева, д.м.

**1.Общо представяне на процедурата.** Представеният комплект материали на хартиен и електронен носител по процедура за придобиване на ОНС „Доктор“ в МУ-Плевен е в съответствие с Правилника за устройството и дейността на МУ-Плевен, чл. 68 ал. 1 от ЗВО; чл. 7, ал. 1от ЗРАСРБ; чл.5, ал.1 и чл.6, ал.1 от Правилника за неговото приложение, Правилника за развитие на академичния състав на МУ-Плевен.

Представени са всички необходими документи, а именно заповедите за зачисляване и отчисляване на докторанта, протоколите от разширени катедрени съвети и изпит докторантски минимум, които отразяват всички етапи от развитието на докторанта включително самата дисертация. Към комплекта материали са приложени списък и копия на публикациите, свързани с дисертационния труд, както и таблица, представяща съответствието на докторанта на минималните национални критерии за придобиване на ОНС „Доктор“. Общо представените публикации са 3, в които дисертантът е водещ автор. Две са в официалното списание на МУ-Плевен JCBR, индексирани и реферирани в Web of Science и една от публикациите е в сп. „Хематология“ - официалното списание на БМСХ, реферирани и индексирани в международна база данни “Скопус”. Докторантът представя 4 участия в национални и международни форуми, едно от които е премирано. Предоставена е заповед на ректора на МУ-Плевен за НЖ No 1429/28.05.2024г и протоколът от неговото първо заседание, проведено на 03.06.2024г, в което дисертантът бе допуснат до защита и съм определена за рецензент. ***Процедурата по докторантурата е спазена.***

**2.Представяне на докторанта.** Д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова завършва медицина в МУ - Плевен през 2011г. Има придобита специалност по клинична хематология през 2018г и магистратура по здравен мениджмънт (2023г). От 2012г работи в клиниката по хематология на УМБАЛ „д-р Георги Странски“ гр. Плевен и е асистент към сектор „Хематология“, Катедра „Нефрология, хематология и гастроентерология“, МУ-Плевен. Притежава диплома от Майсторски клас на Европейската асоциация по хематология и завършва Vite-size Masterclass на тема „Хемофилия“. Д-р Тодориева е положила успешно изпита по хематология на европейската асоциация по хематология, което е атестат за виско ниво на знания и умения. Тя е част от екипите на големи международни клинични проучвания, включително в областта на хроничните миелопролиферативни неоплазии, острите левкемии, неходжкиновите лимфоми, и мултиплени миелом. Владее отлично английски език и много добре немски език. Има повече от 10г стаж в областта на клиничната хематология. ***Докторантът има теоритични познания, практически опит, допълнителни квалификации и насочени научно-практически интереси в областта на докторантурата.***

**3.Актуалност на тематиката и познаване на проблема.** В своята дисертация д-р Доротея Тодориева разработва важен, актуален и значим проблем на съвременната клинична хематология. Генетичната основа на ХМПН налага прецизна молекулярно-генетична диагностика, която позволява правилен избор на терапевтично поведение. Прогностичната оценка на тези пациенти се позовава на риска от тромботични събития

(ТС). Уточняването на патогенетичните механизми за възникване на ТС и ролята на наследствената тромбофилия при тази популация остава дискутабилна. Малко са актуалните проучвания върху тромбогенезата при комбинирано носителство на няколко тромбофилни дефекта или комбиниране с мутацията JAK2V617F. Гранулоцитната активация е един от най-съществените фактори, които отключват тромбогенеза при ХМПН. Придружаващите заболявания, които сами по себе си протичат с тромбоемболизъм и представляват значими тромбогенни фактори в тази пациентска група, влизат в риск-стратификационната система само при пациенти с ЕТ. Липсват проучвания върху цялата група ХМПН, както в България, така и в по света. Предвид противоречивите литературни данни, свързани с различни аспекти на тромбогенния риск при ХМПН, настоящият дисертационен труд прави опит за уточняване на ролята на някои генетични дефекти, имунологични отклонения и степен на коморбидитет в тромбогенезата. *Темата на дисертационния труд е актуална, с важно клинично значение.*

**4. Познание на научния проблем.** Представената научна хипотеза предполага, че повишената честота на тромбогенни събития (ТС) при 28,26% от проучения контингент и между 20-40% в световната литература има комплексна патогенеза, както за цялата група заболявания, така и конкретно при различните ХМПН (хронична миелоидна левкемия (ХМЛ), полицитемия вера (ПВ), есенциална тромбоцитемия (ЕТ) или остеомиелофиброза (ОМФ)) и се обуславя от носителството на генетичните аберации за наследствена тромбофилия FVL, G20210A, полиморфизъм на PLA1/2 в гена за гликопротеин Пб/Ша (PLA1/A2);, носителството на JAK2V617F мутацията и алелния товар, показателите на ПКК – еритроцити, хемоглобин, левкоцити и тромбоцити и промената реология на кръвта, експресията на CD11b/CD18 по повърхността на неутрофилите и на броя и вида придружаващите заболявания. *Авторът познава научния проблема в дълбочина, може да формулира научна хипотеза и да проведе анализ, резултатите от който биха довели до подобряване на диагностиката и проследяването на пациентите с ХМПН като предпоставка за намляване на тромбогенния риск, удължаване на тяхната преживяемост и повишаване на качеството им на живот.*

**5. Методика на изследването.** Проведено е проспективно проучване от типа случай-контрола с подбор на участниците спрямо вида на заболяването, възраст и пол. Данните от анамнеза за коморбидни/рискови фактори, преживяни ТС, стойности на кръвните показатели и JAK2V617F носителство са събрани ретроспективно, по документален метод. Проучването обхваща периода от 2013 до 2019 год. Изследвани са 138 пациенти с доказана ХМПН, лекувани в Клиника по Хематология, УМБАЛ „Д-р Георги

Странски“ ЕАД, гр. Плевен или проследени амбулаторно. Контролните групи са две - една с цел сравнителен анализ за наследствена тромбофилия и втора за сравнителен анализ за експресия на CD11b/CD18. Проученият контингент пациенти, набран за период от шест години и здравите доброволци в двете контролни групи са достатъчни на брой и позволяват статистически анализ. Рутинните клинично - лабораторни показатели са изследвани по общоприетите методи, а специфичните генетични мутации за тромбофилия - посредством ДНК анализ, имунофенотипизация за експресията на CD11b/CD18 по повърхността на неутрофилите и RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) за носителство на JAK2V617F. Методите са валидирани, което позволява възпроизводимост на резултатите. Дизайнът има ясна клинична обосновка дисертацията закономерно завършва с конкретно извеждане на рисковите фактори за ТС общо за групата ХМПН и за всяка нозологична единица поотделно като е предложен алгоритъм за оценка на тромбогенния риск при тези болни.

**6. Характеристика и оценка на дисертационния труд.** Дисертационният труд е разработен върху 170 страници, съдържа 26 фигури, 47 таблици и 5 приложения. Библиографията включва 223 източника, подбрани целенасочено. Задължителните раздели на научния труд са професионално разработени като е спазено приемливо съотношение между тях. Използван е ясен и точен, граматически верен български език.

**6.1 Литературен обзор.** Литературният обзор е изложен на 36 стандартни страници, задълбочено и насочено по научния проблем. ХМПН са обект на все по-прецизни молекулярно-генетични изследвания, позволяващи постоянно усъвършенстване на класификацията им и въвеждане на нови терапевтични възможности. Едни от най-честите усложнения на заболяванията в тази група са тромботичните усложнения, потенциално животозастрашаващи и представляващи сериозно диагностично и терапевтично предизвикателство. Дисертантът подробно представя различните аспекти в комплексната генеза на артериалните и венозни тромбози при ХМПН, излага множеството рискови фактори, които макар и с вариабилна фенотипна изява имат роля в тромбогенезата. Дисертантът задълбочено разглежда литературните данни за ролята на наследствената тромбофилия в тромбогенезата при отделните ХМПН и малкото актуални проучвания върху тромбогенезата при комбинирано носителство на няколко тромбофилни дефекта. Посочва все по-актуалната роля на JAK2V617F за повишения тромбогенен риск. Представя дискутабилните литературни данни за клиничната значимост на гранулоцитната активация, и значението на

придружаваща е сърдечно съдови заболявания, както в света, така и в родната литература.

Уточняването на величината на най-честите генетични дефекти за тромбофилия (FVL, G20210A, PLA1/A2), на имунологичните отклонения (експресия на CD11b/CD18 по гранулоцитната повърхност) и коморбидните фактори (включително от сърдечно-съдов статус) биха допринесли за изясняване на ролята им в тромбогенезата при тази пациентска група *Литературният обзор завършва с мотивирано основание за необходимостта от допълнителни изследвания за изясняване ролята на най-честите генетични дефекти за тромбофилия (FVL, G20210A, PLA1/A2), на имунологичните отклонения (експресия на CD11b/CD18 по гранулоцитната повърхност) и коморбидните фактори (включително от сърдечно-съдов статус), което би допринесло за изясняване на ролята им в тромбогенезата при тази пациентска група.*

**6.2 Цел и задачи.** Целта на дисертацията е да се проучи ролята на генетичните фактори FVL, PR20210, PLA1/A2, JAK2V617F носителство, имунологичните фактори (CD11b/CD18 неутрофилна експресия) и коморбидни фактори в тромбогенезата при пациенти с ХМПН. *Тя е е точно и ясно формулирана и с логично поставени 7 основни задачи.*

**6.3. Раздел „Материал и методи“.** Проведено е проспективно проучване от типа случай-контрола с подбор на участниците спрямо вида на заболяването, възраст и пол. Данните от анамнезата за коморбидни/рискови фактори, преживяни ТС, стойности на кръвните показатели и JAK2V617F носителство са събрани ретроспективно, по документален метод. Проучването обхваща периода от 2013 до 2019 год. Изследвани са 138 пациенти с доказана ХМПН на възраст между 23 и 90 год., преминали през Клиника по Хематология, УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ ЕАД, гр. Плевен или проследени амбулаторно. Разделени са в 4 подгрупи спрямо вида на заболяването - ХМЛ, ПВ, ЕТ и ОМФ. Контролните групи са две.. Първата е формирана за сравнителен анализ на наследствена тромбофилия и обхваща 108 здрави доброволци (53 жени и 55 мъже) на средна възраст 31.57 год. $\pm$ 0.95, при които няма данни за ХМПН и няма регистрирани ТС. Втора контролна група (КГ2) – за експресия на CD11b/CD18 върху неутрофили включва 46 здрави доброволци (13 жени и 33 мъже) на средна възраст 62.63 год. $\pm$ 12.90 без анамнестични данни за поставена диагноза ХМПН и преживяно ТС. Анализираният контингент пациенти, набран за период от шест години и здравите доброволци в двете контролни групи са достатъчни на брой и позволяват статистически анализ. Рутинните клиничко - лабораторни показатели са изследвани по общоприетите методи, а специфичните генетични мутации за тромбофилия

посредством ДНК анализ, имунофенотипизация за експресията на CD11b/CD18 по повърхността на неутрофилите и RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) за носителство на JAK2V617F. Включващите и изключващи критерии са точно формулирани. Методите на изследване са детайлно описани и са подходящо подбрани в съответствие с методичните указания за диагностициране, лечение и проследяване на пациенти със заболявания на кръвта и кръвотворните органи и специфичните такива, необходими за разработването на дисертационния труд. Статистическата обработка на получените резултати е направена компетентно с правилно подбрани анализи и данните са нагледно представени. За статистически анализ са използвани софтуерните статистически пакети STATGRAPHICS; SPSS и EXCEL for Windows. При анализа на резултатите са параметрични тестове (t – test, ANOVA с post hoc tests Tukey, Scheffe, Bonferroni, Newman-Keuls, Duncan) и непараметричните тестове (Pearson  $\chi^2$  - test, Mann-Whitney, Kruscal-Wallis H-test). За моделиране и прогнозиране на корелационни зависимости са използвани регресионни модели. За моделиране и сравняване на данни от типа време-събитие е приложен теста Kaplan-Maier. Значимостта на резултатите, изводите и заключенията е определяна при  $p < 0.05$  **Приемам напълно и без забелжки**

**раздел „Материал и методи“**

**6.4. Раздел „Резултати“ и раздел „Обсъждане“** са представени заедно, като след изложението на получените резултати, дисертантът логично и полседователно обсъжда тяхното значение и ги сравнява с тези на други авторски колективи. Установените различия с данните от други научни разработки, авторът обяснява аргументирано и с конкретни факти. Изложението на раздела е обемно, но е представено прегледно на таблици, фигури, графики и диаграми. Логично е следвана последователността на поставените задачи. Дисертантът представя демографската характеристика на изследвания контингент и контролните групи, разпределението на пациентите по отделни нозологии в групата на ХМПН и данните за тромботични събития в изследваните субпопулации. Честотата на генетичните мутации за наследствена тромбофилия FVL, G20210A и полиморфизъм на PLA1/2 в гена за гликопротеин Пб/Ша (PLA1/A2) докторантът анализира във всяка една от подгрупите, спрямо контролната група и корелира с данните за тромботични инциденти. Д-р Тодориева установява при 48 пациенти (34.78%) носителство на проучваните генетични фактори за тромбофилия ( $p=0.02$ ) и статистически значима разлика в честотата на PLA1/A2 носителство между ПГ и КГ1 ( $OR=1.93$ ,  $p=0.009$ ). Тя намира достоверна разлика в честотата на тромботичните инциденти между пациенти и здрави доброволци, носители на същата мутация ( $OR=10.33$ ,  $p=0.04$ ). и докава многократно по-висок риск за тромбоза при пациенти с ПВ. Резултатите на Д-р Тодориева са в съответствие с

даниите от световната литература вкл и български автори. Анализирани са честотата на тромботичните събития в зависимост от подлежащата генетична мутация/комбинация от генетични мутации в четирите основни нозологии. Авторът доказва, че комбинираното носителство на генетични отклонения (генетична тромбофилия и JAK2V617F) повишава значимо тромбогенния риск – особено при наличие на PLA1/A2 и JAK2V617F (OR=4.43, p=0.02). При анализа на хематологичните показатели, отговорни за поддържането на реологията на кръвта докторантът потвърждава, че левкоцитозата е рисков тромбогенен фактор при пациенти с диагноза ХМЛ и ПВ, но доказва статистическа значимост само за ХМЛ. Според националните и международни препоръки все още левкоцитозата при пациентите с ХМПН не е утвърден рисков фактор, спрямо който се вземат терапевтични решения, но Д-р Тодориева посочва, че големи проучвания я определят като независим прогностичен фактор за развитие на тромбоза, а при ПВ предопределя повишаване честотата на артериалните събития, особено в контекста на JAK2V617F носителство. Установените данни от докторанта за активиране на неутрофилите и данните за повишен тромбогенен риск при експресия на CD11b/CD18 на неутрофилните левкоцити са резултати с много важно клинично значение и без аналог в литературата. Тези данни заслужават целенасочено допълнително изследване при бъдещи научни разработки. В комплексната оценка на многофакторната патогенеза на тромботичните усложнения при пациенти с ХМПН придружаващите заболявания като рискови фактори за тромбоза (тютюнопушене, АХ ИБС и МСБ) се потвърждават от д-р Тодориева и правилно са включени в алгоритъма за прогнозиране на тромботичния риск, предложен от докторантката. На базата на получените резултати дисертантът извежда общата етиопатогенеза на ХМПН, както разглежда подробно и с научна достоверност съчетанието от рискови фактори за всяка една отделна нозология. ***Приемам без забележки получените резултати и тяхното обсъждане. Като резултат с важно клинично значение отбелязвам данните, че носителството на PLA1/A2 полиморфизъм е значим рисков тромбогенен фактор в контекста на доказана ХМПН като рискът при тези пациенти е 8 пъти по-висок спрямо здравите контроли. Като резултат без аналог в литературата откроявам данните за повишен тромбогенен риск при експресия на CD11b/CD18 на неутрофилните левкоцити и препоръчвам целенасочно проучване в бъдещи научни разработки.***

**6.5.Изводите са 8** на брой и ясно следват поставените цел и задачи като са ясно формулирани според получените резултати. Най-важен от клиничен аспект е изводът, че двойните носители на генетична тромбофилия и JAK2V617F мутация имат сигнификантно 2 пъти по-висок риск за развитие на тромботични инциденти спрямо

носителите единствено на генетична тромбофилия , като сред тях най-честа е мутацията на фактор PLA1/A2 *Съгласна съм с така формулираните изводи.*

**6.6. Книгопис.** Библиографията включва 223 източника, от които 2 на кирилица, останалите на латиница, в голямата си част от последните 10 години, а 49 – от последните 5 години. Тези данни свидетелстват за актуалността на проблема и големия продължаващ изследователски интерес по темата. *Нямам забележки.*

**7.Оценка на приносите на дисертационния труд.** Дисертационният труд завършва с представянето на приноси, които имат научен, както и подчертано научно-приложен характер. Пет от тях имат оригинален научен характер и 5 приноси са с потвърдителен характер. *Приемам изложените приноси .*

**8.Лично участие на докторанта.** Докотрантът има лично участие във формулирането на научната идея, събирането на материала и дизайна на проучването. Лично е участието му в статистическата обработка на данните и анализа на получените резултати. Изводите и приносите са също изведени с участието на Д-р Тодориева. Дисертантът е първи автор във всички представени публикации, свързани с дисертацията, както и в повечето научни съобщения, което потвърждава неговото лично участие в разработването на научния труд. Участва в авторските колективи, представили научните съобщения, свързани с дисертационния труд. Дисертацията и част от представените данни са резултат от разработването на проекти, финансирани от МУ – Плевен: проект N 13/2013, проект N 2/2015, проект N 9/ 2017 и N 9/ 2019 с главен изследовател Д-р Тодориева. *Докторантът има основно лично участие в разработването на дисертацията.*

**9.Автореферат.** Авторефератът съдържа 68 страници, дава цялостна представа за дисертационния труд като отразява пълноценно отделните раздели. Включени са основните фигури и таблици, които представят в достатъчен обем необходимите данни.

**10.Заклучение.** Дисертационният труд на Д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и Правилника на МУ-Плевен за присъждане на научна и образователна степен „Доктор“. Въпреки, че темата на дисертационния труд се разработва от немалко авторски колективи, включително в България, избраните генетични мутации за наследствена тромбофилия, имунологичните показатели за неутрофилна активация и класическите хематологични показатели, носителство на JAK-2 мутация и придружаващите заболявания са все още обект на дискусия в международен мащаб. Приносите на дисертацията имат научен и подчертано научно-приложен характер, което е добра основа за използването на предложения алгоритъм за оценка на



тромбогенния риск при ХМПН в рутинната клинична практика. В дисертационния труд на Д-р Доротея Тодориева проличават изградени качества за анализ и синтез на научна информация, способност за формулиране на изводи и изграждане на научни хипотези. Проличават задълбочени научни познания и практически умения по специалността „Хематология и преливане на кръв“. Давам своята положителна оценка за дисертационния труд на тема „Клинично значение на генетични имунологични и коморбидни фактори за определяне тромбогенния риск при пациенти с миелопролиферативни неоплазии " и предлагам на уважаемото научно жури да гласува „ЗА“ присъждане на научна и образователна степен „Доктор“ на Д-р Доротея Костадинова Тодориева-Годорова.

**ИЗГОТВИЛ РЕЦЕНЗИЯ: На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

*/Проф. Д-р Веселина Горанова-Маринова, дм/*

19.06.2024г /Пловдив



**TO ASSOC. PROF. VANYA SLAVCHEVA POPOVA, MD  
CHAIRMAN OF A SCIENTIFIC JURY  
SELECTED WITH ORDER N 1429/28.05.2024  
BY THE RECTOR OF MEDICAL UNIVERSITY – PLEVEN**

## **REVIEW**

By Prof. Veselina Goranova-Marinova, MD, PhD

Head of Hematology Sector, First Internal diseases Department, Faculty of Medicine

Vice Rector of Educational activities at Medical university – Plovdiv

External member of a scientific jury, selected with order №1429/28.05.2024г

By the Rector of Medical university - Pleven

**Regarding:** procedure for acquiring the educational and science degree “Medical doctor”

**Field of education:** 7. “Healthcare and sport”

**Professional direction:** 7.1. “Medicine”

**Doctoral program:** “Hematology and blood transfusion”

**Author:** Doroteya Kostadinova Todorieva-Todorova, MD, assistant Hematology sector, Nephrology, Hematology and Gastroenterology Department, Medical university – Pleven

**Form:** self-preparatory

**Topic:** “Clinical significance of genetic, immunological and comorbidity factors on thrombotic risk in patients with myeloproliferative neoplasms”

**Scientific supervisors:** Prof. Liana Todorova Gercheva-Kyuchukova, MD, PhD and Prof. Katya Stefanova Kovacheva-Kotseva, MD, PhD

**1. General presentation of the procedure.** The set of materials, presented on paper and electronically, regarding the procedure for acquiring educational and science degree “Medical doctor” at Medical university – Pleven, is in accordance with the Regulations for the organization and operation of Medical university – Pleven; art. 68 para. 1 of Higher Education Act; art. 7, para. 1 of the Law on Academic Staff Development; art. 5, para. 1 and art. 6, para. 1 of the Regulations for its implementation, Regulations on Academic Staff Development at Medical university – Pleven. All necessary documentation is available – orders on admission and deduction of the doctoral student, protocols of extended department councils and doctoral minimum exam, that demonstrate the development stages of the doctoral student - dissertation work itself inclusive. A list and copies of publications, associated with this work, as well as a table, illustrating appropriateness with the minimum national criteria for acquiring the educational and science degree “Medical doctor”, are also attached. The dissertation student is a leading author in all the 3 publications presented. Two of them can be found in the official journal of Medical university – Pleven - JBCR, indexed and referred in Web of Science, and one – in Hematology – official journal of Bulgarian society of Hematology, referred and indexed in the international database Scopus. Doctoral student presents 4 active participations in national and international forums, one of them – awarded. An order is placed by the Rector of Medical university – Pleven for selecting a scientific jury 1429/28.05.2024, in which I was chosen as a reviewer. A protocol is available by jury’s first meeting, held on 3<sup>rd</sup> Jun, 2024, admitting the doctoral student is ready to defend their thesis.

*The procedure on doctoral program is strictly observed.*

**2. Candidate's professional biography.** Doroteya Kostadinova Todorieva-Todorova, MD graduated medicine in Medical university – Pleven in 2011. She got her Hematology practice license in 2018 and finished a master degree in Healthcare management in 2023. Since 2012 she is working in Hematology Clinic at UMHAT “Georgi Stranski”, Pleven, where she is also an assistant in Hematology sector at Nephrology, hematology and gastroenterology department, Medical university – Pleven. She has a masterclass diploma by the European hematology association (EHA) and also hold a Bite-size masterclass on Hemophilia topic. Todorieva also took successfully the European hematology exam by the EHA. She is a member of some international clinical trials teams in the field of chronic myeloproliferative neoplasms, acute leukemias, non-Hodgkin lymphomas and multiple myeloma. She is fluent in

English and has very good knowledge in German as well. She has been working Clinical hematology for more than 10 years. The doctoral student has the theoretical knowledge, the practical experience, additional qualifications and focused scientific/practical interests in the field of the doctoral thesis.

- 3. Actuality and knowledge on the topic.** In the dissertation Doroteya Todorieva, MD develops an important, actual and significant problem in modern clinical hematology. The genetic basis in myeloproliferative neoplasms (MPNs) imposes precise molecular-genetic diagnostics, that guides the right therapeutic choice. Prognostic assessment of these patients is based on the thrombotic risk. Defining pathogenetic mechanisms of thrombosis and the role of genetic thrombophilia in this patient population remains debatable. Little data is present on the thrombogenesis in combined carriership of some thrombophilic defects or in combination with JAK2V617F mutation. Granulocytic activation is one of the essential factors, that trigger thrombogenesis in MPNs. Comorbidities, on their own, are associated with thromboembolism and are known thrombogenic factors in this patient group. They are included in the risk stratification scales only in patients with Essential thrombocythemia. No studies are available on the whole MPN group – in Bulgaria as well as in the foreign literature. Given these controversial literature data, available on the different aspects of thrombotic risk in MPN, this dissertation is attempting to define the role of some genetic defects, immunological changes and comorbidity index in the thrombogenesis.

*The topic of this dissertation is actual and has a clinical significance.*

- 4. Knowledge on the scientific problem.** The scientific thesis suggests that increased thrombotic frequency (28.26% in patient population and 20-40% in literature data) has a complex pathogenesis for the whole patient group, but also for the different MPNs, on their own [chronic myeloid leukemia (CML), polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), myelofibrosis (MF)] and is determined by genetic abnormalities for hereditary thrombophilia [factor V Leiden (FVL), prothrombin mutation G20210A (G20210A) and PLA1/2 platelet polymorphism (PLA1/A2) in glycoprotein IIb/IIIa]; JAK2V617F carriership and its allelic burden; full blood count abnormalities, CD11b/CD18 expression on neutrophils' surface and number/type of comorbidities. *The author is well-informed about the scientific problem in details, may formulate a scientific hypothesis and manage the results, that would improve diagnostics and follow-up of MPN patients as a step forward to thrombotic risk decrease, better overall survival and higher quality of life.*

- 5. Investigation methods.** A prospective case-control study was performed, including patients with different types of MPNs, age and gender. Data about comorbidity/risk factors, thrombotic events, full blood count results and JAK2V617F carriership was retrospectively gathered, using a documentary method. Patients were investigated from the year 2013 to 2019 – total of 138 with a diagnosed MPN, treated in Hematology clinic, UMHAT Georgi Stranski, Pleven or followed-up in ambulatory setting. There are two control groups – first one is to compare data with genetic thrombophilia and the other one – with CD11b/CD18 expression. Number of patients and healthy controls from the control groups, included for the 6-year period, is enough for statistical analysis. Routine clinico-laboratory parameters are tested, using conventional methods; specific genetic mutations for thrombophilia – through DNA analysis, CD11/CD18 neutrophilic expression – through immunophenotyping and JAK2V617F mutation – through RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction). Methods are validated that allows interpretation of the results. The design has clear clinical basis, as expected, the dissertation ends with specific risk factors summary – for the whole group and each disease entity as well. An algorithm is suggested to evaluate thrombotic risk for these patients.
- 6. Characteristics and evaluation of the dissertation.** The dissertation consists of 170 pages, includes 26 figures, 47 tables and 5 annexes. Bibliography comprises of 223 articles, selected purposefully. Obligatory sections of a scientific work are professionally written with a reasonable proportion between them. A clear and punctual Bulgarian is used, grammatically true.
- 6.1. Literature review.** Literature review consists of 36 standard pages, presented in an exhausted and directed manner. MPNs present an object of more precise molecular and genetic investigations, leading to a constant refinement of their classification and novel therapeutic options. Some of their most common complications are thrombotic ones, potentially life-threatening and presenting as serious diagnostic and therapeutic challenges. The dissertation student presents different aspects of the complex arterial and venous thrombosis in MPNs in details and includes many risk factors with a variable phenotypic burden for thrombogenesis. The dissertation student discusses in depth literature data about the role of genetic thrombophilia in MPN entities and the little actual studies available on thrombogenesis in combined carriership of some thrombophilic defects. Todorieva points out current role of JAK2V617F for the increased

thrombotic risk. Debatable literature data on clinical significance of granulocytic activation are presented, as well as cardiovascular comorbidities significance – in Bulgarian and foreign literature.

Defining the burden of most common genetic defects for thrombophilia (FVL, G20210A, PLA1/A2), immunological abnormalities (CD11/CD18 neutrophilic expression) and comorbidity factors (cardiovascular inclusive) would elucidate their role in thrombogenesis of this patient group. *Literature review ends with a motivated basis on the necessity for additional investigations to clear the role of the most common genetic defects for thrombophilia (FVL, G20210A, PLA1/A2), of immunological abnormalities (CD11b/CD18 granulocytic expression) and comorbidity factors (cardiovascular inclusive), that would clarify their role in thrombogenesis of these patient group.*

**6.2. Aim and tasks.** The aim of the dissertation is to investigate the role of genetic factors (FVL, G20210A, PLA1/A2, JAK2V617F carriership), immunological factors (CD11b/CD18 neutrophilic expression) and comorbidity factors in the thrombogenesis of MPN patients. *The aim is correctly and clearly formulated with 7 logically set main tasks.*

**6.3. Methods and materials.** A prospective case-control study was performed, including participants with different diseases, age and gender. Data about comorbidity/risk factors, thrombotic events, full blood count results and JAK2V617F carriership was retrospectively gathered, using a documentary method. Patients were included from year 2013 to 2019 – total of 138 with a diagnosed MPN, aged between 23 and 90 years, treated in Hematology clinic, UMHAT Georgi Stranski, Pleven or followed-up in ambulatory setting. They are divided into 4 subgroups according to type of disease – CML, PV, ET and MF. There are two control groups. One is formed as a comparator to genetic thrombophilia results and consists of 108 healthy volunteers (53 women and 55 men), average age  $31.57 \pm 0.95$  – there are no thrombotic events registered for them and no known MPN diagnosis. The second control group is a comparator to CD11b/CD18 neutrophilic expression and consists of 46 healthy volunteers (13 women and 33 men), average age  $62.63 \pm 12.90$  with no MPN diagnosis or thrombotic events history. Number of patients and healthy controls from the control groups, included for the 6-year period, is enough for statistical analysis. Routine clinico-laboratory parameters are tested, using conventional methods;

specific genetic mutations for thrombophilia – through DNA analysis, CD11/CD18 neutrophilic expression – through immunophenotyping and JAK2V617F mutation – through RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction). Inclusion and exclusion criteria are clearly formulated. Investigational methods used are described in details and chosen appropriately in accordance with methodological guidelines for diagnostics, treatment and follow-up of patients with blood disorders, as well as the specific ones, needed for this scientific work development. Statistical analysis of the obtained results is competently performed, using selected analysis. Data is clearly presented. For the statistical analysis STATGRAPHICS; SPSS and EXCEL for Windows are used. When analyzing results parametric (t – test, ANOVA c post hoc tests Tukey, Scheffe, Bonferroni, Newman-Keuls, Duncan) and non-parametric (Pearson  $\chi^2$  - test, Mann-Whitney, Kruscal-Wallis H-test) are used. Regression models are used to model and prognose correlation. To model and compare data (time-event) Kaplan-Maier was used. Statistical significance of results and conclusions is defined by  $p < 0.05$ . ***I completely accept section “Methods and materials” without any further notices.***

**6.4. Results and discussion.** They are together presented – dissertation student successively discusses each result obtained, its meaning and compares them with other authors' conclusions. There are some differences between author's and other scientific work results, that are explained in a reasoned and objective manner. The section is large but data is well-presented in tables, figures, graphics and diagrams. The sequence of tasks is logically followed. The dissertation student presents demographic characteristics of patient population and control groups, patient subgrouping by type of MPN and thrombotic events data. Frequency of genetic thrombophilia for FVL, G20210A and PLA1/A2 is analyzed in every subgroup as compared to the control group and correlates with thrombotic events data. Todorieva finds genetic thrombophilia carriership ( $p=0.02$ ) for the studied factors in 48 patients (34.78%) and a statistically significant difference in PLA1/A2 frequency between patient group and control group 1 (OR=1.93,  $p=0.009$ ). She finds straight difference in thrombotic incidence between patients and healthy volunteers, carriers of the above-mentioned mutation (OR=10.33,  $p=0.04$ ) and confirms significantly higher thrombotic risk in PV patients. Todorieva's results are in accordance with international and Bulgarian literature. Thrombotic events frequency is analyzed, depending on the type of underlying genetic mutation

(single or in combination) in the studied diseases. Author confirms that combined carriership of genetic abnormalities (genetic thrombophilia and JAK2V617F) increases significantly thrombotic risk – especially when PLA1/A1 combines with JAK2V617F (OR=4.43, p=0.02). Dissertation student confirms that of all hematological parameters leukocytosis is a risk thrombotic factor in CML and PV patients, but statistical significance is only present for CML. According to national and international guidelines leukocytosis in MPN patients is not a confirmed risk factor yet, that is used to guide therapeutic decisions, but the author points out that clinical studies with many patients define the increase number of white blood cells as an independent prognostic factor for thrombosis. In PV it predetermines increased frequency of arterial events, especially when JAK2V617F is also present. Obtained results from neutrophilic activity and increased thrombotic risk in CD11b/CD18 neutrophilic expression have an important clinical significance, without any analogue in literature and deserve purposeful additional investigation in a future scientific work. In the complex evaluation of multifactor pathogenesis of thrombotic complications in MPN patients Todorieva confirms also the role of comorbidities (smoking, arterial hypertension, ischemic heart disease and cerebrovascular disease) and includes them in an algorithm, proposed by the dissertation student, to prognose thrombotic risk. On the basis of these results Todorieva develops the common etiopathogenesis of MPNs and expands the knowledge on risk factors in every MPN entity. *I accept without any remarks the presented results and their discussion. As a clinically important result I point out that PLA1/A2 polymorphism is a significant risk thrombotic factor in the context of MPN confirmed and the risk is 8 times higher than in healthy controls. As a result without any analogue in international literature I highlight the data on increased thrombotic risk in CD11b/CD18 neutrophilic expression and recommend purposeful study in future scientific work.*

**6.5. There are 8 conclusions** and they clearly follow the aim and tasks. They are logically formulated according to the results. From clinical point of view the most important conclusion is: Double carriers of genetic thrombophilia and JAK2V617F mutation have a significantly 2 times higher thrombotic risk than only genetic thrombophilia carriers, most commonly PLA1/A2. *I agree with these conclusions.*

**6.6. Bibliography.** It consists of 223 articles, 2 of which in Cyrillic and the rest – in Latin, most of them are issued during the last 10 years, 49 of them – in the last 5



years. These data confirm the actuality of the problem and continuing scientific interest on the topic. *I have no remarks.*

- 7. Evaluation of dissertation contribution.** The dissertation ends with different contributions, confirming the scientific as well as markedly applied nature. Five of them have original aspects and 5 – confirmatory. *I accept the contributions.*
- 8. Dissertation student personal activity.** The dissertation student has a personal participation in formulating the scientific idea, collecting materials and study design preparation. Todorieva personally took part in the statistical process and analysis of the obtained results. She also participated in formulating the conclusions and contribution. The dissertation student is the first author in all articles presented, associated with the scientific topic, as well as in most of the scientific communications which confirms her personal participation in this scientific work. She is a part of the authors, presenting the scientific works. The dissertation results are obtained by projects, financed by Medical university – Pleven: N 13/2013, N 2/2015, N 9/ 2017 and N 9/ 2019 with principal investigator Todorieva, MD. *The dissertation student has mainly personal participation in developing the dissertation.*
- 9. Abstract.** The abstract contains 68 pages, gives a comprehensive view on the dissertation and completely associates with separate sections. All main figures and tables are included and present the data needed.
- 10. Conclusion.** Dissertation work of Doroteya Kostadinova Todorieva-Todorova, MD meets the requirements of Law on Academic Staff Development in Republic of Bulgaria, the Regulations for its implementation and the Regulations on Academic Staff Development at Medical university – Pleven for acquiring the educational and science degree “Medical doctor”. Although the dissertation topic is being studied by many authors, Bulgarian inclusive, the genetic mutation for hereditary hemophilia selected to be studied, immunological parameters of neutrophilic activation and classical hematological parameters, JAK2V617F carriership and comorbidities are still an international discussion object. The contributions are of scientific and markedly applied nature, which is a good basis to use suggested algorithm as a thrombotic risk evaluation in MPN in routine practice. In the dissertation of Doroteya Todorieva, MD analytic qualities and scientific information synthesis can be seen, an ability to form conclusions and develop scientific hypothesis. Deep scientific knowledge and practical skills in “Hematology and blood transfusions” are present. I give my positive evaluation on the dissertation with topic “Clinical significance of genetic,

immunological and comorbidity factors on thrombotic risk in patients with myeloproliferative neoplasms” and I suggest that the respected jury should vote “YES” to award the educational and science degree “Medical doctor” to Doroteya Kostadinova Todorieva-Todorva, MD.

**Reviewer: На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

*/Prof. Veselina Goranova-Marinova, MD, PhD/*

19.06.2024г/ Plovdiv