



## **РЕЦЕНЗИЯ**

**от доц. д-р Ваня Славчева Попова. дм**

Началник клиника по Клинична хематология,  
УМБАЛ „д-р Георги Странски“ – ЕАД Плевен

**Относно:** Дисертационен труд на тема „Клинично значение на имунологични, генетични и коморбидни фактори за определяне на тромбогенния риск при пациенти с миелопролиферативни неоплазии“ разработен от д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова МУ- Плевен, за получаване на ОНС „Доктор“ , област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина, докторска програма “Хематология и преливане на кръв“

**Научни ръководители:** Проф. д-р Лиана Тодорова Герчева д.м  
Проф. д-р Катя Стефанова Ковачева д.м

Председател на научното жури: **доц. д-р Ваня Славчева Попова дм**

На основание Правилника за условия и процедури по придобиване на ОНС и заемане на академични длъжности към МУ- Плевен, както и въз основа решение на Академичния съвет ( протокол № 35 от 27.05.2024г.) е издадена заповед 1429/28.05.2024г., съгласно която съм определена за вътрешен член на научното жури. На проведеното първо заседание на 03.06.2024г. съм предложена и избрана да изготвя рецензия. Всички етапи на Процедурата са спазени и съобразени с изискванията на ЗРАС в Р. България и Правилника за прилагането му в МУ- Плевен. Представени са следните документи:

- Дисертационен труд- електронен носител
- Автореферат- електронен носител
- Списък и копия на публикации свързани с дисертацията -електронен носител

***Представяне на докторанта:***

Д-р Доротея Тодориева - Тодорова е придобила магистърска степен по медицина през 2011г. към МУ- Плевен. От януари 2012г. започва работа към клиника по хематология на УМБАЛ „Д-р Г. Странски“. След проведен конкурс е назначена като асистент по хематология към Катедра Вътрешни болести на МУ- Плевен. Участва в обучението на студенти по медицина и медицински специалисти. През 2018г. придобива специалност Клинична хематология. През 06.2022г. е зачислена за докторска степен, отчислена с право на защита 06.2023г. През 2023г. завършва „Здравен мениджмънт“ към МУ- Плевен. Активно участва в провеждането на научни конференции, симпозиуми и конгреси в страната и чужбина. Съавтор е при написването на Учебник по клинична хематология за студенти и специализиращи лекари, както и на множество статии, доклади и постери. Член е на наши и международни научни организации, владее английски и немски език.

***Актуалност на тематиката на дисертационния труд:***

Мелопролиферативните неоплазми са клонални заболявания, условно разделени на две големи групи на базата на молекулярно- генетичните промени, съответно BCR-ABL индуцирана туморогенеза и Ph- негативни хронични миелопролиферативни заболявания (ХМПН). Факторите свързани със заболяемостта и смъртността на пациентите с ХМПН са обект на интензивни клинични проучвания за последните 20 години. Въвеждането на тирозинкиназните и JAK2 инхибиторите драматично промениха терапевтичният пейзаж и се превърнаха в стандарт за лечение на пациентите с хронична миелоидна левкемия (ХМЛ) и миелофиброза (МФ). Към днешни дни докладваната преживяемост на пациентите с ХМЛ се доближава до тази на общата популация. В тази връзка клиничните проучвания фокусирани върху многофакторната патогенеза на тромботичните усложнения, които съпътстват ХМПН и рисковата стратификация на пациентите прави темата на дисертационната разработка актуална.

***Структура на дисертацията:*** Дисертацията е написана на 170 печатни страници, разпределени както следва: литературен обзор ( 35 страници); цели, задачи, материали и методи (5 страници); резултати и дискусия ( 77 страници); изводи и приноси ( 2 страници). Библиографията включва общо 223 източника, 2 от които на кирилица, останалите заглавия

са на латиница, по-голяма част от тях са от последните 10 години. Дисертационният труд на докторанта е онагледен с 26 фигури, 47 таблици и 5 приложения.

**Литературен обзор:** В този раздел са разгледани обстойно съвременните концепции за патогенезата на ХМПН. Кратко, но изчерпателно е представена клиничната изява на отделните нозологични единици. Подробно е описана ролята на съществуващият прокоагулантен фон при пациентите с Филадельфия негативни хронични миелопролиферативни заболявания и честотата на тромботичните усложнения при всяка една от тях. Акцентуирано е вниманието върху рискови фактори свързани с тромбогенезата, каквито са комбинираното носителство на няколко тромбофилни дефекта, както и съчетанието им с висок туморен товар на мутацията JAK2V617F. Представена е съвременна библиографска справка на рисковата стратификация на пациентите с МФ, ПВ, ЕТ и ХМЛ

**Материалите и методите** са адекватно подбрани и съответстват на целта и поставените задачи. В проучването са включени общо 138 пациента. Използвани са две контролни групи както следва: една за генетична тромбофилия (108 пациента) и втора контролна група (46 пациента), която е оценена за експресия на флоуцитометричните маркери CD11b/CD18 върху гранулоцитите. Използваните изследователски методи включват подробен анкетен метод, конвенционални лабораторни изследвания, генотипизиране за FVL, PR20210 мутация и GPIIIa мутация, PCR- анализ за установяване на JAK2V617F мутация и флоуцитометрия на периферни мононуклеарни клетки за определяне експресията на CD11b/CD18. За обработка на данните са използвани параметрични и тестове за проверка на хипотези, регресионни модели, тест на Kaplan-Maier.

**Целта** на дисертационният труд е ясно формулирана: “ Да се проучи ролята на някои генетични (FVL, PR20210, PLA1/A2, JAK2V617F носителство), имунологични (CD11b/CD18 неутрофилна експресия) и коморбидни фактори в тромбогенезата при пациенти с ХМПН“. Поставените 7 задачи съответстват на темата на дисертационният труд.

1. Да се установи честотата на носителство на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с ХМПН и да се сравни с контролна група здрави лица.
2. Да се сравни честотата на носителство на тромбофиличните дефекти при пациенти с проявени ТС спрямо пациенти без регистрирани тромботични прояви.
3. Да се проучи асоциацията между носителство на генетична тромбофилия и тромбогенния риск при пациентите с различни видове ХМПН.
4. Да се установи честотата и клиничното значение за тромбогенния риск при пациенти, носители на JAK2V617F мутация и комбинирани носители на генетични отклонения.
5. Да се проучи значението на показателите в ПКК за тромбогенния риск при пациентите.

6. Да се установи нивото на експресия на CD11b/CD18 върху неутрофилите на пациентите, да се сравни с тази в контролната група и да се проучи връзката между експресия и носителство на генетични дефекти при пациенти с и без преживяно ТС в отделните пациентски подгрупи.
7. Да се проучи ролята на коморбидните фактори върху тромбогенния риск при пациентите.

*Разделите резултати и обсъждане* са обединени и заемат значителна част от научната разработка. Д-р Тодориева изчерпателно е представила получените собствени резултати, които са онагледени с 26 фигури и 47 таблици и следват поставените задачи.

Тромботични събития са установени при 28.26% от пациентите с ХМПН и получените данни са съпоставими с резултатите на други източници. Докладвана е по-висока честота на ТС при носителите на генетична тромбофилия за пациентите с МФ, ЕТ, ПВ и на последно място при пациентите с ХМЛ. За първи път, на базата на собствени резултати, са предоставени доказателства за по-висок тромбогенен риск при носителите на генетична тромбофилия и ХМЛ, като резултатите са обсъдени в контекста на известния тромбогенен риск който медикаментите от групата на ТКИ притежават. Аномалиите в кръвните клетки, в частност левкоцитозата и завишеният брой неутрофили, експресиращи Mac-1 комплекс увеличават риска за тромботично събитие при пациентите с ХМЛ.

Носителството на PLA1/A2 или комбинираното носителство на PLA1/A2 и JAK2V617F мутация значимо повишават риска от развитие на ТУ при пациенти с ХМПН. За пациентите с ПВ споменатите мутации и наличието на три и повече коморбидни фактора водят до повишен риск от тромбоза. В групата на ЕТ възрастта, носителство на PLA1/A2 и повишената неутрофилна експресия на CD11b/CD18 са значими фактори, които се асоциират с увеличен риск от ТУ. За пациентите с МФ, риска от развитието на тромбози нараства при носителство на PLA1/A2, носителство на JAK2V617F мутация и съпътстващи заболявания.

На базата на получените резултати, д-р Тодориева е разработила практически алгоритъм за оценка на риска за развитие на тромботични усложнения при пациентите с ХМПН. Оформени са 8 извода.

*Приносите* са представени в две групи, от които 5 с научен и оригинален характер и 5 със значима практическа насоченост:

1. Отчетен е конкретният тромбогенен риск при пациенти с различни видове ХМПН в зависимост от наличието на генетични отклонения с тромбофилен потенциал.
2. Доказва се връзката между промяната в броя неутрофили, експресиращи CD11b/CD18, при пациенти с ХМПН и покачването на тромбогенния риск.

3. При валидиране в големи пациентски популации получените стойности биха могли да се ползват като „прагови“ или предиктивни за преживяване на ТС в отделните пациентски подгрупи
4. Установени са конкретни коморбидни/рискови фактори, които имат отношение към тромбогенезата в пациентската група
5. Разработен е алгоритъм за оценка на рисковите фактори за ТС при ХМПН в рамките на комплексен подход за прецизиране и индивидуализиране на тромбогенния риск при пациенти с тази патология.

Представени са 4 публикации, 2 доклада и един постер свързани с темата на научната разработка. В три от публикациите д-р Тодориева е първи автор. Автореферата е изготвен съобразно изискванията и съответства на дисертационният труд.

**В заключение**, дисертационният труд на д-р Доротея Тодориева е актуален и е фокусиран върху важен от практическа и теоритична гледна точка проблем, свързан с анализ на факторите обуславящи повишеният риск от тромбоза при пациентите с ХМПН. В представената дисертационна разработка д-р Тодориева демонстрира задълбочени теоретични познания както и възможността да интерпретира и обобщава получените резултати. Дисертационният труд отговаря на **изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Р. България и Правилника за неговото приложение в МУ-Плевен и за присъждане на ОНС „Доктор“**. Давам своята положителна оценка на д-р Доротея Костадинова Тодориева -Тодорова и предлагам на членовете на уважаемото Научно жури да гласуват „за“ присъждането на образователната и научната степен „ Доктор“ на д-р Доротея Тодориева-Тодорова в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина, специалност „Хематология и преливане на кръв“.

гр. Плевен  
10 / Юни/ 24г.

Изготвил рецензията: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

доц. д-р Ваня Славчева Попова, дм



## **R E V I E W**

**By assoc. prof. Vanya Slavcheva Popova, MD, PhD**

Head of Hematology Clinic

UMHAT Georgi Stranski, Pleven

**About:** Dissertation work on the topic “**Clinical significance of genetic, immunological and comorbidity factors on thrombotic risk in patients with myeloproliferative neoplasms**”, developed by **Doroteya Kostadinova Todorieva-Todorova, MD** at Medical University – Pleven to acquire 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”.

**Scientific supervisors:** Prof. Liana Todorova Gercheva, MD, PhD

Prof. Katya Stefanova Kovacheva, MD, PhD

Chairman of the scientific jury: **assoc. prof. Vanya Slavcheva Popova, MD, PhD**

In accordance with the Law on Academic Staff Development and its regulations for acquiring the educational and science degree “Medical doctor” at Medical university – Pleven and based on the Academic council decision (protocol № 35/27.05.2024) an order 1429/28.05.2024 is issued and according to it I am chosen to be an internal member of the scientific jury. During the first jury’s meeting, held on 3th Jun, 2024, I was suggested and selected to write a review. All phases of the procedure are pursuant with the requirements by the Law on Academic Staff Development in Republic of Bulgaria and its regulations in Medical university – Pleven. Following documentation is presented:

- Dissertation work – electronic document

- Abstract – electronic document
- List and copies of publications, associated with dissertation – electronic documents

***Doctoral student presentation:*** Doroteya Todorieva-Todorova, MD graduated medicine in 2011 at Medical university – Pleven. Since Jan, 2012 she has been working in Hematology clinic of UMHAT “Georgi Stranski”. After a successful exam she becomes an assistant in Hematology section, Internal diseases department at Medical university – Pleven. She participates in the training of medical students and medical specialists. In 2018 Todorieva got Clinical hematology diploma. She was admitted for doctoral degree in Jun, 2022 and deducted in Jun, 2023. In 2023 she graduated Healthcare management in Medical university – Pleven. She actively participates in the organization of scientific conferences, symposia and congresses in Bulgaria and abroad. She is a co-author in Clinical hematology book for students and specializing doctors, as well as in many articles, reports and posters. Todorieva is a member of national and international scientific organizations and uses English and German language very well.

***Actuanlity of dissertation work topic:***

Myeloproliferative neoplasms are clonal diseases, that can be divided into two main groups, based on molecular and genetic abnormalities present – BCR-ABL-induced tumorigenesis and Ph-negative chronic myeloproliferative neoplasms (MPNs) respectively. The factors associated with morbidity and mortality in MPN patients are objects of intensive clinical investigation for the past 20 years. Therapy with tyrosine kinase (TKI) and JAK2 inhibitors dramatically changed therapeutic environment and became a standard treatment in patients with chronic myeloid leukemia (CML) and myelofibrosis (MF). Currently, reported survival of CML patients is approaching the general population survival. Following this statement, clinical investigations are focused on multifactorial pathogenesis of thrombotic complications in MPN and their risk stratification and this points out the actuality of this dissertation work topic.

***Structure of the dissertation work:*** the dissertation work is written in 170 pages, divided into: literature review (35 pages); aim, tasks, methods and materials (5 pages); results and discussion (77 pages); conclusion and contribution (2 pages). Bibliography consists of 223 sources, 2 of which in cyrilic, the rest in latin, most of them submitted in the last 10 years. The dissertation work includes 26 figures, 47 tables and 5 annexes.

***Literature review:*** A comprehensive review on current pathogenesis concepts in MNP is presented in this section. A summarized view on clinical presentation of separate MPN diseases is introduced. The role of confirmed procoagulant state in Philadelphia-negative chronic MPNs and frequency of thrombotic complication in each entity is described in details. Attention is payed on risk factors, associated with thrombogenesis – combined carriership of thrombophilia defects and their

association with high tumor burden of JAK2V617F mutation. Current bibliographic reference is presented on the risk stratification of MF, polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and CML patients.

**Methods and materials** are appropriately selected and match the aim and tasks. In this study 138 patients are included. Two control groups are used: one is for the comparison of genetic thrombophilia (108 healthy volunteers) and second one (46 healthy volunteers) – for the flowcytometry expression of CD11b/CD18 on neutrophils. The investigational methods consist of a comprehensive questionnaire, conventional laboratory tests, genotyping for FVL, G20210A and PLA1/A2 mutation, PCR analysis for the JAK2V617F mutation and flowcytometry of peripheral granulocytes for the CD11b/CD18 expression. For the statistical data parametric test for hypothesis, regression models and Kaplan-Maier tests are used.

**Aim of the dissertation work** is clearly formulated: “To define the role of some genetic (FVL, G20210A, PLA1/A2, JAK2V617F carriership), immunologic (CD11b/CD18 expression on neutrophils) and comorbidity factors in the thrombogenesis of MPN patients”. Seven tasks match the dissertation work topic.

1. To define frequency of genetic defects carriership for thrombophilia in MPN patients and compare it with a control group of healthy volunteers.
2. To compare the frequency of thrombophilia defects carriership between patients with and without thrombotic complications.
3. To study the association between genetic thrombophilia carriership and thrombotic risk in patients with difference MPN entities.
4. To define the frequency and clinical significance of thrombotic risk in patients with JAK2V617F mutation and combined carriership of differenc genetic mutation.
5. To study the significance of full blood count parameters for the thrombotic risk in the patient population.
6. To define the level of CD11b/CD18 expression on neutrophils of patients, compare it with control group level and study the role between the expression and genetic defects carriership in patients with and without thrombotic events in different disease groups.
7. To study the role of comorbidity factors on the thrombotic risk in patients.

**Results and discussion sections** are presented together and represent a substantial part of the scientific work. Todorieva describes results, that follow tasks, in details and illustrates them with 26 figures and 47 tables.

Thrombotic events are registered in 28.26% of MPN patients and the data is in accordance with other investigators conclusions. Higher thrombotic frequency is reported in MF, ET, PV and finally CML. For the first time a higher thrombotic risk in CML and genetic thrombophilia carriers is



reported, based on individual results and they are discussed in the context of TKI known thrombotic risk. Abnormalities in blood cell counts, expressing Mac-1 complex, leukocytosis and neutrophilia in particular, increase thrombotic risk in CML patients.

PLA1/A1 carriership or combined carriership of PLA1/A2 and JAK2V617F mutation significantly increase the risk for thrombotic complication in MPN patients. In PV subgroup these mutations and the presence of 3 and more comorbidity factors associate with higher thrombotic risk. In ET patients carriership of PLA1/A2 and increased neutrophil CD11b/CD18 expression are significant factors that raise the risk for thrombosis. For MF patients PLA1/A2, JAK2V617F carriership and comorbidities associate with higher thrombotic risk.

On the basis of these results Todorieva developed a practical algorithm to assess the thrombotic risk in MPN patients. Eight conclusions are reported.

*Contributions* are presented in two groups – 5 scientific and original, 5 practical:

1. Thrombotic risk in different MPN entities is precisely reported on the basis of genetic thrombophilia mutations.
2. An association between change in MPN patient neutrophils, expressing CD11b/CD18, and thrombotic risk increase is confirmed.
3. When validated in large patient populations these levels would serve as “cut-off” or predictive of thrombotic event in different MPN subgroups.
4. Precise comorbidity/risk factors are established, associated with thrombogenesis in patients.
5. An algorithm is developed to evaluate the risk factors for thrombotic events in MPN, based on the complex approach to precise and individualize thrombotic risk in these patient population.

Four publications, two reports and one poster, associated with scientific work topic are presented. In three of the publications Todorieva is the first author. The abstract is organized by the requirements and matches the dissertation work.

*In conclusion*, the dissertation work of Doroteya Todorieva, MD is actual and focused on important practical and theoretical problem, associated with analysis of factors, leading to thrombotic risk increase in MPN patients. In this scientific work Todorieva demonstrates deep theoretical knowledge and the ability to interpret and conclude results. The dissertation work fulfill **the requirements of the Law on Academic Staff Development and its regulations for acquiring the educational and science degree “Medical doctor” at Medical University – Pleven**. I give my positive evaluation to Doroteya Kostadinova Todorieva-Todorova, MD and suggest to the members of the respected scientific jury to vote “Yes” to award the educational and science degree “Medical doctor” to Doroteya Kostadinova Todorieva-Todorova, MD in the field of higher education 7.

Healthcare and sport, professional direction: 7.1. “Medicine”, doctoral program “Hematology and blood transfusion”.

Pleven, Bulgaria

10<sup>th</sup> Jun, 2024

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

assoc. prof. Vanya Slavcheva Popova, MD, PhD