



ДО  
ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО ЖУРИ  
ОПРЕДЕЛЕНО СЪС ЗАПОВЕД № 1439/ 28.05.2024  
НА РЕКТОРА НА МЕДИЦИНСКИ  
УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН  
ПРОФ. Д-Р ДОБРОМИР ДИМИТРОВ, Д.М.

**Приложено представям:** Становище по дисертационен труд за придобиване на научна и образователна степен „Доктор“ на тема **„КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА ГЕНЕТИЧНИ, ИМУНОЛОГИЧНИ И КОМОРБИДНИ ФАКТОРИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ ТРОМБОГЕННИЯ РИСК ПРИ ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗИИ“**, разработен от д-р **ДОРОТЕЯ КОСТАДИНОВА ТОДОРИЕВА - ТОДОРОВА**, докторант в самостоятелна форма на обучение в професионално направление 7.1. „Медицина“, по докторска програма „Хематология и преливане на кръв“ към Медицински университет - Плевен, Факултет Медицина, Катедра: „Нефрология, хематология и гастроентерология“, отчислена със заповед на Ректора на МУ - Плевен №1387/15.05.2023 г, въз основа на Решение на Факултетен съвет на Факултет „Медицина“ от 15.05.2023 г., Протокол №25

Рецензент: проф. Д-р Георги Николаевич Балаценко, дм

Научна специалност: 03.01.39 – Хематология и преливане на кръв

Институция: Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания – София

Адрес и контакти:

Пощенски адрес: Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София, п.к. 1797, бул. Климент Охридски 1а.

Електронен адрес: [g.balatzenko@hematology.bg](mailto:g.balatzenko@hematology.bg)

Тел. 02 4552132

## СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Георги Николаевич Балаценко, дм  
Началник Диагностично-консултативен блок,  
Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания – ЕАД, София

**Относно:** Дисертационен труд за придобиване на научна и образователна степен „Доктор“ на тема „**КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА ГЕНЕТИЧНИ, ИМУНОЛОГИЧНИ, И КОМОРБИДНИ ФАКТОРИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТРОМБОГЕННИЯ РИСК ПРИ ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗИИ**“, разработен от д-р **ДОРОТЕЯ КОСТАДИНОВА ТОДОРИЕВА-ТОДОРОВА**, докторант в самостоятелна форма на обучение в професионално направление 7.1. „Медицина“, по докторска програма „Хематология и преливане на кръв“ към Медицински университет - Плевен, Факултет Медицина, Катедра: „Нефрология, хематология и гастроентерология“, отчислена със заповед на Ректора на МУ - Плевен №1387/15.05.2023 г, въз основа на Решение на Факултетен съвет на Факултет „Медицина“ от 15.05.2023 г., Протокол №25

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:** Проф. д-р Лиана Тодорова Герчева-Кючукова, д.м. и Проф. д-р Катя Стефанова Ковачева-Коцева, Д.М.

### АКТУАЛНОСТ НА ПРОБЛЕМА

Дисертационният труд е посветен на актуален проблем на съвременната хематология - проучване на клиничното значение различни генетични, имунологични и коморбидни фактори за определяне на тромбогенния риск при пациенти с миелопролиферативни неоплазии (МПН). МПН включват хетерогенна група заболявания, характеризиращи се с клонална експанзия на абнормална хемопоетична стволова клетка в костния мозък, съпроводена със свръхпродукция на кръвни клетки и отчетливо изразен повишен риск от поява на тромботични събития (ТС). Най-честите, “класически” ХМЛН включват: хронична миелоидна левкемия (ХМЛ), полицитемия вера (ПВ), есенциална тромбоцитемия (ЕТ) и първична миелофиброза (МФ), като рискът от тромботични усложнения при всяка една от нозологиите може да варира. Патофизиологията на ТС при МПН е комплексна и много-факторна, като настъпването им може да доведе до сериозни усложнения, вкл. и до фатален изход. Често ТС са началните прояви, водещи до диагностициране на съответното заболяване, като рискът от тромботични събития варира в широки граници между 1% до 10% годишно след поставяне на диагнозата. Патогенезата и честотата на ТС се свързва с участието разнообразни фактори, между които: възраст, анамнеза за предхождащи тромботични събития, сърдечно-съдови съпътстващи заболявания, повишен брой на кръвните клетки, носителство на генетична фактори на тромбофилия, носителство на мутацията JAK2 V617F мутация, наличие на прокоагулантни микрочастици, активирани на съдовия ендотел и др. В тази насока, проучването на клиничното значение на различни генетични, имунологични, и коморбидни фактори за определяне на тромбогенния риск при пациенти с МПН безспорно е актуално и с изразена теоретична и практическа значимост.

### СТРУКТУРА И ОФОРМЛЕНИЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Дисертационният труд е оформен в съответствие с нормативните изисквания и е разработен на 171 стандартни страници, онагледен е с 26 фигури и 47 таблици. Дисертационният труд включва общоприетите раздели, разпределени както следва: Титулна страница (стр.) [1 стр.]; **Съдържание** [4 стр.]; **Използвани съкращения** [3 стр.]; **I. Увод** [1 стр.]; **II. Литературен обзор** [36 стр.]; **III. Цел и IV. Задачи** [1 стр.]; **V. Материали и методи** [3 стр.]; **VI. Собствени резултати и обсъждане** [66 стр.]; **VII. Общи изводи** [1.5 стр.]; **VIII. Приноси** [1 стр.]; **IX. Публикации и участия в научни прояви във връзка с дисертационния труд** [1.5 стр.]; **X. Библиография** (28 стр.). **Приложения** [10 стр.].

Библиографията обхваща 223 литературни източника, вкл. и 4 от български колективи, от които 1 - на английски език. От всички цитирани трудове, 10.8% (n=24) са от последните 3 години, вкл. и 1 труд от настоящата година, а 25.6% (n=57) – през последните 5 год.

Авторефератът е написан на 68 стандартни страници, и съответства на дисертационния труд.

**ЛИТЕРАТУРНИЯТ ОБЗОР** е обстоен и предоставя задълбочена информация за класификацията и епидемиологията на МПН, патогенезата и ролята на генетични нарушения, участващи в появата им, общите характеристики и диагностичните критерии. Подробно са разгледани честота на ТС при МПН и рисковата стратификация на болните, патогенезата на тромботичните усложнения и значението на промените в клетъчните популации, наличието и вида на генетичните нарушения, възрастта, коморбидитета и др. Въз основа на представените данни са очертани нерешените проблеми по отношение на разпространението, механизмите и факторите, които са от значение за появата, тежестта и протичането на ТС при МПН.

**ЦЕЛТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД** е конкретна и ясно формулирана: “Да се проучи ролята на някои генетични [Factor V Leiden (FVL); Prothrombin (Factor II) (PT) G20210A мутацията; P1A1/A2 полиморфизъм на Glycoprotein IIIa (GPIIIa); JAK2 V617F носителство], имунологични (CD11b/CD18 експресия) и коморбидни фактори (придружаващи заболявания) в тромбогенезата при пациенти с МПН”.

За постигането ѝ са формулирани 7 задачи: (i) Да се установи честотата на носителство на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с МПН и да се сравни с контролна група здрави лица; (ii) Да се сравни честотата на носителство на тромбофиличните дефекти при пациенти с проявени ТС спрямо пациенти без регистрирани тромботични прояви; (iii) Да се проучи асоциацията между носителство на генетична тромбофилия и тромбогенния риск при пациентите с различни видове МПН; (iv) Да се установи честотата и клиничното значение за тромбогенния риск при пациенти, носители на JAK2 V617F мутация и комбинирани носители на генетични отклонения; (v) Да се проучи значението на показателите в пълната кръвна картина (ПКК) за тромбогенния риск при пациенти с МПН; (vi) 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 със и без преживяно ТС в отделните пациентски подгрупи; (vii) Да се проучи ролята на коморбидните фактори върху тромбогенния риск при пациенти с МПН.

**МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:** В проучването са включени 138 възрастни пациенти с МПН (63 жени/75 мъже), на средна възраст  $63.18 \pm 14.03$  год., преминали през Клиниката по

Хематология, УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ ЕАД, гр. Плевен от които: 49 (35.51%) с ПВ, 20 (14.49%) с ЕТ, 39 (28.26%) с МФ и 30 (21.74%) с ХМЛ. Изследването за носителство на генетична тромбофилия е проведено при всички пациенти, докато гранулоцитната експресията на CD11b/CD18 е проучена при 113 от тях. В проучването са включени и 2 контролни групи от здрави лица, отговарящи на заложените критерии за включване, без анамнестични данни за поставена диагноза МПН и без преживяно ТС: (1) Контролна група при изследване за генетична тромбофилия – включва 108 здрави лица (53 жени и 55 мъже) на средна възраст 31.57 год. $\pm$ 0.95; и (2) Контролна група при изследване за експресия на CD11b/CD18 върху неутрофили – включва 46 здрави лица (13 жени и 33 мъже) на средна възраст 62.63  $\pm$ 12.90 год. При практическата реализация на проучването за събиране на необходимата информация, имаща отношение към изпълнението на поставените задачи е използвана специално изготвена за целта анкетна бланка, включваща освен основната паспортна информация, кратка история на заболяването и актуалното му лечение, минали и придружаващи заболявания, като особено внимание е обърнато за наличие на заболявания и състояния, свързани с предразположение и/или повишен риск от поява тромботични усложнения, както и данни за спонтанни аборти и усложнения по време на бременност при жените. Използваните лабораторни методи включват освен изследване на рутинните хематологични показатели и някои високо-специализирани изследвания, между които: (1) молекулярно-генетични, базирани на изследване на нуклеинова киселини чрез полимераз-но-верижна реакция [Polymerase Chain Reaction (PCR)] за търсене на FVL, носителство на Protrombine G20210A и полиморфизма PL1A1/A2 в Glycoprotein IIb/IIIa, както и за определяне на носителство на мутацията JAK2 V617F; (2) Експресията на CD11b/CD18 по повърхността на неутрофилите е определена чрез имунофенотипизиране на периферна кръв.

Получените резултати от проучването са обработени с утвърдени софтуерни статистически пакети STATGRAPHICS; SPSS и EXCEL for Windows. Приложени са параметрични тестове за проверка на хипотези при нормално и близко до нормалното разпределение на случаите [t-test, ANOVA с post hoc tests Tukey, Scheffe, Bonferroni, Newman-Keuls, Duncan] и непара-метричните тестове при различно от нормалното разпределение на случаите [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.

Представените данни са получени в рамките на разработването на 4 научни проекта, финансирани от МУ-Плевен: проект N13/2013, проект N2/2015, проект N9/2017 и проект N9/2019.

**РЕЗУЛТАТИТЕ** са коректно представени и са онагледени с многобройни фигури, графики и таблици, като са представени в групи, съобразна поставените задачи.

*По 1-ва задача е проучена честотата на носителство на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с МПН. Намерено е наличие на проучваните фактори (FVL, G20210A, PL1A1/A2) при 34.78% от пациентите, като това разпространение е значимо по-високо, от наблюдаваното в контролната група (23.15%). При пациентите с МПН, е установено: носителство на FVL в 2.90% [2 ПВ; 2 ХМЛ], спрямо близо 2 пъти по-високо (6.48%) в контролната група; носителство на полиморфизма G20210A в гена за протромбин при*

7.25% от пациентите [5 МФ, 3 ХМЛ, 1 ПВ; 1 ЕТ], докато в контролната група, носителите на G20210A са около 3 пъти по-малко (2.78%), без тази разлика да е значима; носителството на GP IIb/IIIa (PLA1/A2) при 26.81% от пациентите с МПН [9 ПВ; 9 ХМЛ; 7 ЕТ; 8 МФ] - честота, значимо по-висока от тази, в контролната група (13.89%).

*По 2-ра задача е сравнена честотата на носителство на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с проявени тромботични събития (ТС) спрямо пациенти без регистрирани такива. Не са регистрирани ТС сред пациенти, носители на FVL. При 4 (2.90%) пациенти с носителство на G20210A е регистрирано ТС, като не е намерена значима разлика в тромботичната честота свързана с мутационния статус както между пациенти и здрави лица, така и при пациенти носители и неносители на G20210A, което предполага, че носителството на G20210A е рисков тромбогенен фактор, но рискът при МПН не е по-висок от този, при здрави лица. При 9 от пациентите, носители на полиморфизма pPLA1/A2 са регистрирани ТС, като е намерена е значимо по-висока тромботичната честота при пациен-ти спрямо здрави лица, носители на мутацията, както и нарастване на тромбогенния риск, докато подобна значима разлика липсва при пациентите, носители и неносители на аномалията. Тези данни подкрепят извода, че носителството на PLA1/A2 е значим рисков тромбогенен фактор в контекста на доказана МПН, като рискът при тези пациенти е 8 пъти по-висок спрямо здравите носители.*

*По 3-та задача е проучена асоциацията между носителство на генетична тромбофилия и тромбогенния риск при пациентите с различни видове МПН. При ПВ, 15 ТС са докумен-тирани при 14/49 (28.57%) пациента, като тази честота на ТС е сходна със съобщаваната от други автори (30.0-41.0%). Намерена е значимо по-висока честота на ТС при пациенти с ПВ, носители на генетична тромбофилия (30.61%) спрямо контролната група здравите, носители, като носителството покачва 17 пъти тромбогенния риск при пациенти с диагноза ПВ. Съобщава се значимо по-висока честота на ТС при пациенти с ПВ, носители на поли-морфизма PLA1/A2 спрямо здравите лица, както и покачване на тромбогенния риск. Тези данни, подкрепят извода за 14 пъти по-високият риск от поява на тромбози при носители на PLA1/A2 с поставена диагноза ПВ. Наблюдавана е и значимо по-висока честотата на ТС при пациенти с ПВ, носещи JAK2 V617F мутацията спрямо тази, при неносители, като значимо се покачва и тромбогенния риск. Носителството на JAK2 V617F се асоциира с 7кратно нарастване на риска от ТС при ПВ. При ЕТ, ТС са регистрирани при 30% от пациен-тите, като тази честота на тромбози съответства на данните в литературата (19-32%). Не е установена значима разлика в честотата на ТС при пациенти с ЕТ, асоциирана със статуса на носителството на генетична тромбофилия, както и в тромботичната честота при ЕТ спрямо тази, при здрави лица. При пациентите не се отчита нарастване на тромбогенния риск при носителство на G20210A, възможно поради малкия брой на носителите. При нито един пациент с носителство на FVL, не е регистрирано ТС. Липсват значими различия и в честотата на ТС при пациенти с ЕТ носители на PLA1/A2, спрямо тази, при здрави носители. Носителството на PLA1/A2 се счита за рисков (макар и статистически незначим) фактор при поставена диагноза ЕТ. Съществуват редица доказателства, че JAK2 V617F при ЕТ се асоциира с повишен тромбогенен риск. Същевременно, в анализирания в дисертационния труд пациентска група не е намерена значима разлика в честотата на ТС при пациенти с ЕТ, асоциирана с JAK2 V617F статуса, поради което факторът се приема като слабо рисков, но следва се има в предвид, че анализирания група пациенти е малка. При МФ, ТС са регистрирани*

при 30.77% от пациентите, като тромботичната честота е по-висока от тази, в литературата ( $\approx 10\%$ ) и е най-висока от всички анализирани МПН. Тромботични усложнения са наблюдавани при 23.08% от пациентите с вторична МФ, и при 34.62% - с първична МФ. Не са намерени значими различия в честотата и риска от ТС при пациенти с МФ, носители на генетична тромбофилия (15.48%), спрямо неносители (38.46%). В контролната група здрави лица, при нито един от носителите на генетична тромбофилия няма документирано ТС, което предполага, че носителството на генетична тромбофилия покачва 9 пъти тромбо-генния риск при пациентите с МФ спрямо здравите носители. Не е установена значима разлика в тромботичната честота както между пациентите с МФ, носители и неносители на полиморфизма G20210A, така и между пациенти и здрави-носители. Липсва значима разлика и в честотата на ТС при пациенти с МФ, носители и неносители на PLA1/A2 полиморфизъм, като и рискът не се променя. Липсва значима разлика и при сравняване на честотата на носителство на PLA1/A2 между пациенти и здрави лица. Същевременно, намерена и значимо по-висока честотата на ТС при пациенти с МФ, носители JAK2 V617F мутация (ТС при 52.94%) спрямо и неносители (ТС при 16.67%), което представлява значимо 3-кратно покачване на тромбогенния риск при носителите с диагноза МФ. Известно, че, значим рисков фактор, освен JAK2 V617F, е и възрастта  $>60$  год., като комбинацията от двата фактора, особено често води до ТС. В проучването се съобщава значимо по-висока честота на JAK2 V617F(+) възрастни ( $>60$  год) пациенти с МФ и с ТС (75%) спрямо тези, които също покриват двата фактора, но са без регистрирана тромбоза (27.93%). Така, доказването на JAK2 V617F при пациентите с МФ на възраст  $>60$  год. значимо покачва 8 пъти риска за ТС. **При ХМЛ**, са регистрирани 8 ТС при 7/30 (23.33%) пациенти, като тази честота на ТС е по-висока от средната, съобщавана в литературата (1.0-36.0%). Установена е значимо по-висока честота на ТС при пациенти с ХМЛ, носители на генетична тромбофилия спрямо здравите носители, като тромбогенния риск при тези пациенти нараства значимо 18 пъти. Известен е рискът от ТС при таргетното лечение с тирозин-киназни инхибитори (ТКИ), като в анализиранията група ХМЛ има само 3 ново-диагностицирани болни, поради което би могло да се предположи, че ТС могат да са свързани с проведеното таргетно лечение. Не е установена значима разлика в честотата на ТС при пациентите, асоциирана със статуса на генетичната тромбофилия [ТС 4/12 при носители vs ТС 3/18 при неносители], като се отбелязва статистически незначимо покачване на риска. При ХМЛ е намерена значимо по-висока честотата на ТС и значимо покачване на тромбогенния риск при пациенти, носители на полиморфизма G20210A спрямо пациенти-неносители. Същевременно, липсва значима разлика при в честотата на ТС при пациенти с ХМЛ и здрави-носители на полиморфизма G20210A. Не е доказана значима разлика и в тромботичната честота на пациенти с ХМЛ спрямо здрави лица от контролната група, носители на PLA1/A2, като макар и без статистическа значимост се отчита известно покачване на риска при пациентите.

*По 4-та задача е проучена честотата и значението за тромбогенния риск при пациенти, носители на JAK2 V617F мутация и комбинирани носители на генетични отклонения. Носителство на мутацията JAK2 V617F е установено при 35/97 пациента с МПН, с налични данни за мутационния статус. Намерена е значимо по-висока честота на ТС при носителството на мутацията [48.57% vs 11.29% при неносители]. Определено е, че JAK2 V617F значимо 4-кратно покачва тромбогенния риск при пациенти с МПН, като липсва значима разлика в честота на ТС в зависимост от мутационния товар. Анализирани са рискът от ТС при комбинирано носителство на JAK2 V617F и генетична тромбофилия, като е*

намерено, че честотата на ТС при пациенти с комбинирано носителство е значимо по-висока спрямо тази, при носители само на генетична тромбофилия. Същевременно, при сравнение на тромботичната честота и тромбогенния риск при пациенти с комбинирано носителство на генетични нарушения, спрямо тази при неносители не е намерена значима разлика. Сравнена е и честотата на тромбозите при пациенти с комбинирано носителство спрямо пациенти, носители само на JAK2 V617F, като също не е доказана значима разлика в честотата на ТС и промяна в риска. Тези данни показват, че рискът от ТС тромботични усложнения се покачва от добавянето на JAK2 V617F носителство към съществуващата генетичната тромбофилия. С най-голяма честота е доказано комбинираното носителство на полиморфизма PLA1/A2 с JAK2 V617F, като при половината от тях е диагностицирана тромбоза. При съпоставяне на тази пациентска група с пациенти, носещи единично генетична тромбофилия е установена значима разлика в тромботичните усложнения, което показва, че пациентите с МПН и комбинираното носителство на PLA1/A2 и JAK2 V617F са със значимо по-висок тромбогенен риск спрямо носители на единично генетично отклонение. Най-висока честота на комбинирано носителство е наблюдавана при ПВ, като липсва значима разлика в тромботичната честота спрямо останалите пациенти с други заболявания (ЕТ, МФ, ХМЛ). Тези наблюдения подкрепят извода, че тромбогенния риск при диагноза ПВ и комбинирано носителство е по-висок, макар и без статистическа значимост, най-вероятно поради малкият брой пациенти в някои подгрупови анализи.

*По 5-та задача е проучено значението на показателите в пълната кръвна картина (ПКК) - левкоцити, хемоглобин и тромбоцити, за тромбогенния риск при пациенти с МПН. За целта пациентите са разделени в групи, съответно с ниски/нормални и завишени стойности на левкоцити, хемоглобин и тромбоцити. При съпоставка на пациентите със завишен левкоцитен брой спрямо тези, с нисък/нормален брой е установено, че левкоцитозата е рисков тромбогенен фактор при пациенти с ХМЛ и ПВ, като значимост е доказана само при ХМЛ. Понастоящем левкоцитозата при МПН не е утвърден рисков фактор, спрямо който се вземат терапевтични решения, независимо, че някои проучвания я определят като прогностичен белег за поява на ТС, а при ПВ предопределя повишен риск от артериалните събития, особено при носителство на JAK2 V617F. Аналогичен подход е използван при анализа на значението на повишените нива на хемоглобина за появата на ТС - пациентите от всяка нозология от МПН са разделени на групи - с повишено и с ниско/нормално ниво на хемоглобина, като не са установени значими различия в ТС при пациентите от двете групи при отделните заболявания. При сравняване на пациентите с тромбоцитоза спрямо тези, с нисък/нормален тромбоцитен брой е установено, че при ХМЛ, повишеният брой тромбоцити е прогностичен фактор значимо покачващ тромбогенния риск.*

*По 6-та задача е изследвана експресията на CD11b/CD18 върху неутрофилите при 113 пациенти и е сравнена с тази, в контролната група, като е проучена връзката между тази експресия и носителство на генетични дефекти при пациенти с (n=32) и без преживяно ТС в отделните групи. Намерено е, че средният брой неутрофили, експресиращи CD11b/ CD18 [CD11b/CD18(+) неутрофили] при пациенти с МПН е значимо по-висок от този, в контролната група здрави лица, като най-нисък среден брой е намерен при ХМЛ, а най-висок – при ПВ, без обаче разликите при отделните нозологии да са значими. За да се оцени значението на различията в броя CD11b/CD18(+) неутрофили за появата на ТС са съпоставени средните стойности при пациенти с и без ТС. Общо, при*

пациентите с МПН е намерен значимо по-висок брой CD11b/CD18(+) неутрофили при настъпили ТС, в сравнение с тези, без тромбоза, като при отделните заболявания тази асоциация се запазва само при ПВ и ЕТ. Данните са анализирани и посредством логистична регресия, като получените резултати демонстрират, че независимата променлива „CD11b/CD18(+) неутрофили” влияе съществено върху вероятността за поява на ТС, възможно поради „лепливост“ на неутрофилите и формиране на левкоцитно-тромбоцитни агрегати. Тези данни очертават потенциалната възможност при валидиране на тези начални резултати, посочените стойности да се използват като предиктивни маркери за ТС. Проучено е и значението на CD11b/CD18(+) неутрофили при пациенти с МПН в зависимост от броя на левкоцитите, като значимо по-висок среден брой на неутрофилите е намерен при пациентите: с левкоцитоза и с регистрирани ТС спрямо останалите пациенти с левкоцитоза, но без ТС; с регистрирано ТС с левкоцитоза спрямо тези, с ТС, но без левкоцитоза; при пациенти с левкоцитоза, спрямо тези без, левкоцитоза. Тези резултати очертават извода, че левкоцитозата е важен фактор за развитие на ТС, и че, при отсъствие на левкоцитоза, ТС вероятно не са свързани с CD11b/CD18(+) неутрофили. Анализирана е и асоциацията между средния брой на CD11b/CD18(+) неутрофили и наличието на тромбозата, и значението ѝ за появата на ТС, като не е намерена значима разлика в средния брой CD11b/CD18(+) неутрофили при пациентите с и без ТС, което показва че тромбозата не е значим фактор. Същевременно, значимо по-висок брой CD11b/CD18(+) неутрофили е намерен при пациенти, при които няма тромбозата с ТС спрямо този, при пациенти без ТС. Тези данни показват, че липсва асоциация между наличието на тромбозата, свръхактивността на неутрофилите и наличието на ТС. Проучено е и значението на асоциацията на броя на CD11b/CD18(+) неутрофили при пациенти с МПН и наличието на генетични нарушения за риска от поява на ТС. Значими разлики в броя на CD11b/CD18(+) неутрофили са намерени при сравняване на пациенти с и без регистрирано ТС единствено при носители на G20210A и носители на PLA1/A2, докато липсва значима асоциация, сравнявайки носителите с или без ТС на FVL, G20210A, PLA1/A2 и JAK2 V617F. Същевременно, значими различия са намерени при сравняване на броя на CD11b/CD18(+) неутрофили при пациенти с МФ с ТС, като стойностите при тези, които носят JAK2 V617F мутация, са значимо по-високи от намерените при пациенти, които са негативни за мутацията.

*По 7-ма задача е проучена ролята на коморбидни/рискови (К/Р) фактори върху тромбогенния риск при пациенти с МПН. Въз основа на събраните данни, пациентите са разделени в 6 групи в зависимост от наличния брой К/Р фактори, които имат [без К/Р фактори и с наличие на 1-5 такива фактора], и в 2 подгрупи, съответно – с/без ТС. Установено е, значимо нарастване като абсолютен брой и дял на пациентите с ТС при наличие на  $\geq 2$  К/Р фактори спрямо тези  $\leq 1$  фактор, което подкрепя извода, че отсъствието или наличието на само един фактор намалява риска за тромбоза. Отбелязва се значимо по-високата честота на сърдечно-съдови заболявания при пациентите с преживяно ТС. Същевременно, значението на броя на К/Р фактори не е еднозначно при отделните заболявания. Значимо по-ниска честотата на ТС при пациенти с  $\leq 1$  К/Р фактор, спрямо останалите е намерена при ХМЛ и МФ, като при повече фактори рискът се покачва и при двете заболявания. Отбелязва се, че при ХМЛ тромбозите възникват рано, преди приема на ТКИ. При ХМЛ доказано като значим рисков тромбогенен фактор и наличието тютюнопушенето, докато при МФ значимо покачване на тромбогенния риск се съобщава при наличие на сърдечно-съдови заболявания, както и при някои други фактори. При ПВ и*



ЕТ не е установена значима разлика в честотата на ТС при пациенти с  $\leq 1$  К/Р спрямо тези с  $>1$  К/Р фактори. Същевременно, по-висока честота на ТС се съобщава при пациенти с ПВ с  $>2$  фактора спрямо тези с  $\leq 2$ . За разлика от редица други сходни проучвания, в дисертационния труд не е намерено статистически значимо покачване на тромбогенния риск при пациенти ПВ с артериална хипертония, захарен диабет, дислипидемия, и тютюнопушане.

**ИЗВОДИТЕ** в дисертационния труд са изчерпателни, произлизат от получените резултати и съответстват на поставените задачи: (1) Носителството на генетични дефекти за тромбофилия е значимо по-често при пациенти с МПН спрямо здравите контроли, като най-значима разлика в честотата между двете групи е установена за фактор PLA1/A2, особено при пациенти с ПВ; (2) Независимо, че при МПН тромбофиличните дефекти като цяло не показват асоциация с риска за ТС, пациентите, които ги носят имат значимо 13 пъти по-висок риск за ТС в сравнение със здравите носители; (3) От всички проучени дефекти за тромбофилия носителството на PLA1/A2 се среща с най-голяма честота при ПВ, но показва значимост и при по-малко проучваните до момента групи, като МФ и ХМЛ. При ХМЛ носителството като цяло на генетични дефекти за тромбофилия покачва 2 пъти тромбогенния риск, а в частност за G20210A – 5.6 пъти; (4) Носителството на JAK2 V617F мутация се асоциира с повишен тромбогенен риск при пациентите с ПВ и МФ (съответно 7 пъти и 3 пъти), като комбинираното носителство на генетични нарушения, асоциирани с тромбофилия и JAK2V617F е 6 пъти по-често при ПВ в сравнение с останалите МПН. Двойните носители на генетична тромбофилия и JAK2 V617F мутация са с значимо 2 пъти по-висок риск за развитие на ТС спрямо носителите единствено на генетична тромбофилия; (5) Левкоцитозата се потвърждава като значим рисков тромбогенен фактор при пациенти с ХМЛ и ПВ, а тромбоцитозата – само при ХМЛ; (6) Неутрофилната експресия на CD11b/ CD18 е значимо повишена при всички пациенти с МПН, така и при отделните заболявания в сравнение със здравите контроли, както и при пациентите с ТС спрямо такива, без ТС, особено при ПВ и ЕТ. В общата група с МПН и носителство на генетични отклонения (тромбофилия и JAK2 V617F) не се доказва значима разлика в стойностите на неутрофилната експресия на CD11b/CD18 при сравняване на пациентите с анамнеза за ТС, спрямо тези - без реализирано съдово събитие; (7) Наличието на  $\geq 2$  коморбидни/рискови фактора значимо покачва тромбогенния риск при пациенти с МПН. Артериалната хипертония, исхемична болест на сърцето и сърдечна недостатъчност са значимо по-чести при пациенти с регистрирано ТС спрямо тези, без анамнеза за тромбози; (8) Разработеният алгоритъм за оценка на рисковите фактори за ТС при МПН може да се използва като елемент на комплексен подход за прецизиране и индивидуализиране на тромбогенния риск при пациенти с тази патология.

## ПРИНОСИ

Научните приноси на д-р ДОРОТЕЯ ТОДОРИЕВА-ТОДОРОВА са формулирани в следните основни направления:

### **I. Приноси с научен и оригинален характер:**

1. Проведеното проучване е първото комплексно изследване на някои от рисковите фактори за тромбогенеза при пациенти с ХМЛ и отрицателните за Филадельфийска хромозома МПН – *приемам без забележки.*

2. Добавят се научни данни за честотата и промяната в риска при доказване на някои генетични фактори за тромбофилия при пациенти с ХМЛ и МФ, които не са проучвани в този контекст, най-вече за носителство на PLA1/A2 – *приемам без забележки.*
3. Изследвана е неутрофилната експресия на CD11b/CD18, като маркер за левкоцитна активност при класическите МПН (и в отделните диагностични подгрупи) и е оценено значението ѝ за развитие на тромбоза, както и отношението ѝ спрямо броя кръвни клетки – *приемам без забележки.*
4. Събрана е подробна информация и е отчетена значимостта на различни коморбидни/рискови фактори, които допринасят за тромбогенезата при всички пациенти – *приемам без забележки..*
5. Направен е опит за комплексен поглед върху сложната и многофакторна етиопатогенеза на ТС и отчитане участието на различни фактори при оценка на риска за тромботични усложнения при всички пациенти с МПН – *приемам без забележки.*

### **II. Приноси с приложен характер**

1. Отчетен е конкретният тромбогенен риск при пациенти с различни видове МПН в зависимост от наличието на генетични отклонения с тромбофилен потенциал – *приемам без забележки..*
2. Доказва се връзката между промяната в броя неутрофили, експресиращи CD11b/ CD18, при пациенти с МПН и покачването на тромбогенния риск – *приемам без забележки.*
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 – *приемам със забележка - Изказана е хипотеза – към момента получените прагови стойности все още не могат да се използват в практиката*
4. Установени са конкретни коморбидни/рискови фактори, които имат отношение към тромбогенезата в пациентската група – *приемам без забележки.*
5. Разработен е алгоритъм за оценка на рисковите фактори за ТС при МПН в рамките на комплексен подход за прецизиране и индивидуализиране на тромбогенния риск при пациенти с тази патология – *приемам без забележки.*

### **ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

Във връзка с дисертационния труд са представени 3 оригинални статии в пълен текст, на които д-р Д. Тодориева-Тодорова е първи автор, и 4 научни съобщение, представени на национални и международни форуми от които на 1 е първи автор, а на останалите – трети и последващ.

### **ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ**

1. Todorieva-Todorova DK, Kovacheva KS, Tzvetkov NT, Trifonov SV, Stavreva GTs, Rashev TR, Todorov AA, Ivanov PD. A study on the role of thrombophilic genetic disorders as a risk factor for thrombotic complications in patients with myeloproliferative disorders. journal of biomedical and clinical research (jbcr), Vol.12 Number 1, 2019, p 19-26. **[реферира се в Web of Science (2014-) (CABI) - 60 т./8 = 7.5 т.]**
2. Todorieva-Todorova DK, Kovacheva KS, Tzvetkov NT, Blazheva SO, Lukanov TH. Granulocytic expression of CD11B/CD18 and thrombotic risk in patients with myeloproliferative neoplasms. Journal of Biomedical and Clinical Research (JBCR) Vol. 14, No. 1, 2021, p. 47-53. **[реферира се в Web of Science (2014-) (CABI); 60 т./5 = 12 т.]**

3. Todorieva-Todorova D, Gercheva L, Kovacheva K, Mineva-Dimitrova E. Role of neutrophil CD11B/CD18 expression in thrombogenesis of patients with myeloproliferative neoplasms, p. 47-53 "HEMATOLOGY" issue 1-2/2023, Vol. LX, ISSN 2367-7864 [реферира се в Scopus (2015-); 60 т./4 = 15 т.]

Статиите са публикувани в списания, които се реферират и индексират в световно известни бази данни с научна информация. Наличният брой точки общо по показатели (Г7) е: 7.5 т. + 12 т. + 15 т. = **34.5 т.** което надхвърля необходимите за придобиване на образователната и научна степен "Доктор" – 30 т. съгласно Минималните национални изисквания към научната и преподавателската дейност на кандидатите за придобиване на научна степен и за заемане на академичните длъжности „Главен асистент“, „Доцент“ и „Професор“.

### **НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ**

1. Dineva D, Paskaleva I, Todorieva-Todorova D. (2019). Evaluation of platelet reactivity on dual antiplatelet therapy in patient with essential thrombocythemia and acute coronary syndrome. Clinica Chimica Acta. 493. S405. 10.1016/j.cca. 2019.03.863.
2. Velkova A, Tzvetkov N, Kovacheva K, Todorieva D, Ivanov P, Todorov A, Penkova R, Golemanov G, Panayotova S, Popova VA. Study on the role of genetic thrombophilic disorders as a risk factor for thrombotic complications in patients with myeloproliferative disorders. Oral presentation at XII Anniversary International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors, Pleven, Bulgaria. 8-11 Oct, 2013
3. Тодориева Д, Ковачева К, Цветков Н, Тодоров А, Иванов П, Пенкова Р, Големанов Г, Панайотова Ст, Попова В, Велкова А. Генетични дефекти за тромбофилия като рискови фактори за тромботични усложнения при пациенти с миелопролиферативни заболявания. Орална презентация, Втори национален симпозиум „Млад хематолог“, Сливен, България. 9-10 Ноември, 2013
4. Цветков Н, Ковачева К, Тодориева Д, Тодоров А, Панайотова Ст, Попова В, Иванов П, Комса-Пенкова Р, Велкова А. Проучване върху ролята на генетичните дефекти за тромбофилия като рискови фактори за тромботични усложнения при пациенти с миелопролиферативни заболявания. Постер, X Национален конгрес по хематология, Плевен, България, 22-25.10.2015 г.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Въз основа на описаното по-горе считам, че представеният дисертационен труд, както и научните и научно-приложни приноси на д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова са лично дело на докторанта и отразяват задълбочени теоретични познания по проблемати-ката, възможност за творческо интерпретиране на данните, както от рутинните лабораторни, така и от високо-специализирани изследвания, включващи разнообразни генетични, имунологични и коморбидни фактори, имащи значение за появата и протичането на тромботичните усложнения при МПН. д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова проявява способност да изгражда научни хипотези и творчески да обсъжда получените резултати.

Представеният дисертационен труд от д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова е завършен и съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват

оригинален принос и отговарят на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагането му, както и на Правилника за развитието на академичния състав в МУ–Плевен.

Изложеното по-горе ми дава основание да дам положителна оценка на дисертационния труд и да предложа на почитаемото Научното жури да присъди образователната и научна степен “ДОКТОР” на д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова

София

20.06.2024

**На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

Проф. д-р Г. Балаценко, дм

TO THE CHAIRMAN  
OF THE SCIENTIFIC JURY  
DETERMINED BY ORDER 1439/28<sup>TH</sup> MAY 2024  
BY THE RECTOR OF  
MEDICAL UNIVERSITY – PLEVEN  
PROF. DOBROMIR DIMITROV, MD, PHD

*I present:* A standpoint on a dissertation work for acquiring the educational and science degree “Medical doctor” on the topic “**CLINICAL SIGNIFICANCE OF GENETIC, IMMUNOLOGICAL AND COMORBIDITY FACTORS ON THROMBOTIC RISK IN PATIENTS WITH MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS**” by **Doroteya Kostadinova Todorieva-Todorova**, a dissertation student in self-preparatory form, professional direction: 7.1. “Medicine”, Doctoral program “Hematology and blood transfusion” at the Medical University – Pleven, Faculty Medicine, Department of Nephrology, hematology and gastroenterology, deducted by the order of the Rector of Medical university – Pleven 1387/15<sup>th</sup> May, 2023, based on the decision of Faculty Medicine council in 15<sup>th</sup> May, 2023, protocol N25.

Reviewer: prof. Gueorgui Nikolaevitch Balatzenko, MD, PhD

Scientific specialty: 03.01.39 – Hematology and blood transfusion

Institution: Specialized hospital for active treatment of hematological diseases - Sofia

Address and contacts:

Post address: Specialized hospital for active treatment of hematological diseases, Sofia, 1797, Kliment Ohridski 1a Str.

e-mail: [g.balatzenko@hematology.bg](mailto:g.balatzenko@hematology.bg)

Phone: 02 4552132

## STANDPOINT

By prof. Gueorgui Nikolaevitch Balatzenko, MD, PhD  
Head of diagnostics and consultative block,  
Specialized hospital for active treatment of hematological diseases, Sofia

**About:** A dissertation work for acquiring the educational and science degree “Medical doctor” on the topic “**CLINICAL SIGNIFICANCE OF GENETIC, IMMUNOLOGICAL AND COMORBIDITY FACTORS ON THROMBOTIC RISK IN PATIENTS WITH MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS**” by **Doroteya Kostadinova Todorieva-Todorova**, a dissertation student in self-preparatory form, professional direction: 7.1. “Medicine”, Doctoral program “Hematology and blood transfusion” at the Medical university – Pleven, Faculty Medicine, Department of Nephrology, hematology and gastroenterology, deducted by the order of the Rector of Medical university – Pleven 1387/15<sup>th</sup> May, 2023, based on the decision of Faculty Medicine council in 15<sup>th</sup> May, 2023, protocol N25.

**SCIENTIFIC SUPERVISORS:** prof. Liana Todorova Gercheva-Kyuchukova, MD, PhD and prof. Katya Stefanova Kovacheva-Kotseva, MD, PhD

### ACTUALITY OF THE TOPIC

The dissertation work is dedicated to a current problem in modern hematology – a study on the clinical significance of genetic, immunological and comorbidity factors in defining the thrombotic risk in patients with myeloproliferative neoplasms (MPNs). MPNs represent a heterogenous group of diseases, characterized by a clonal expansion of an abnormal hematopoietic stem cell in the bone marrow, accompanied by blood cells overproduction and markedly increased risk for thrombotic events (TEs). Most common, “classical” MPNs consist of chronic myeloid leukemia (CML), polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (MF) – each of them with a varying risk for thrombotic complications. The pathophysiology of TEs in MPNs is complex and multifactorial, their presence may lead to serious complications, fatal ones inclusive. Often these TEs present an initial manifestation, leading to the diagnosis of the underlying disease and the thrombotic risk varies in wide ranges – between 1 and 10% annually after diagnosis. The pathogenesis and frequency of TEs is associated with different factors, such as: age, anamnesis for TE, cardio-vascular comorbidities, increased blood cell counts, carriership of genetic thrombophilia, JAK2 V617F mutation carriership, procoagulant microparticles presence, vessel endothelium activity, etc. In this context, the study on clinical significance of different genetic, immunological and comorbidity factors to define thrombotic risk in MPN patients is indisputably actual and emphasized theoretical and practical significance.

### STRUCTURE AND DESIGN OF THE DISSERTATION WORK

The dissertation work is designed in accordance with the regulations and consists of 171 pages, illustrated with 26 figures and 47 tables. The dissertation work includes the generally accepted sections, distributed as follows:

Title page (pg) [1 pg]; **Content** [4 pgs]; **Abbreviations** [3 pgs]; **I. Introduction** [1 pgs]; **II. Literature review** [36 pgs]; **III. Aim** and **IV. Tasks** [1 pgs]; **V. Methods and materials** [3 pgs]; **VI. Own results and discussion** [66 pgs]; **VII. Common conclusions** [1.5 pgs]; **VIII. Contributions** [1 pg]; **IX. Publications and participation in scientific forums in association with the dissertation work** [1.5 pg]; **X. Bibliography** [28 pgs]; **Annexes** [10 pgs]. The

bibliography consists of 223 literature articles, 4 of which by Bulgarian teams – 1 in English. Of all cited articles 10.8% (n=24) are published in the past 3 years, 1 of them is published this year, 25.6% (n=57) – in the past 5 years.

The abstract is written on 68 pages and matches the dissertation work.

**THE LITERATURE REVIEW** is comprehensive and gives exhaustive information on classification and epidemiology of MPNs, pathogenesis and role of genetic disorders, taking part in MPN presentation, common characteristics and diagnostic criteria. A detailed review is presented on TEs frequency in MPNs and patients' risk stratification, pathogenesis of thrombotic complications and the significance of blood cell count changes, presence and type of genetic disorders, age, comorbidity, etc. Based on data presented, the unsolved problems in distribution, mechanisms and factors are emphasized and they are pointed to be significant for the occurrence, severity and manifestation of TEs in MPNs.

**THE AIM OF THE DISSERTATION WORK** is concrete and clearly formulated: "To investigate the role of some genetic [factor V Leiden (FVL); Prothrombin (factor II) (PT) G20210A mutation; PLA1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa (GPIIIa); JAK2 V617F carriership], immunological (CD11b/CD18 expression) and comorbidity factors (medical history) in the thrombogenesis of MPN patients".

To achieve the aim 7 tasks have been formulated: (i) to define frequency of genetic defects carriership for thrombophilia in MPN patients and compare it with a control group of healthy volunteers; (ii) to compare the frequency of thrombophilia defects carriership between patients with and without thrombotic complications; (iii) to study the association between genetic thrombophilia carriership and thrombotic risk in patients with different MPN entities; (iv) to define the frequency and clinical significance of thrombotic risk in patients with JAK2 V617F mutation and combined carriership of different genetic mutation; (v) to study the significance of full blood count parameters for the thrombotic risk in the patient population; (vi) 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 diseases subgroups; (vii) to study the role of comorbidity factors on the thrombotic risk in patients.

**MATERIALS AND METHODS:** this study includes 138 MPN patients (63 women/75 men), average age  $63.18 \pm 14.03$  years, treated in Hematology clinic, UMHAT "Georgi Stranski", Pleven - of them 49 (35.51%) with PV, 20 (14.49%) with ET, 39 (28.26%) with MF and 30 (21.74%) with CML. The investigation for genetic thrombophilia is performed in all patients, while CD11b/CD18 granulocytic expression is studied for 113 of them. There are 2 control groups in the study – healthy volunteers, accordant with all inclusion criteria, no history for MPN or TEs: (1) control group for genetic thrombophilia – 108 healthy volunteers are included (53 women and 55 men) with average age  $31.57 \pm 0.95$  years; and (2) control group for CD11b/CD18 expression on neutrophils – consisting of 46 healthy volunteers (13 women and 33 men) with average age  $62.63 \pm 12.90$  years. When organizing this study, a questionnaire with necessary information about the tasks was prepared – main passport information, disease history and current therapy, past medical history with special focus on diseases and conditions, associated with increased risk/predisposition to thrombotic complications, as well as spontaneous miscarriages and pregnancy complications in women. Laboratory methods include routine hematological parameters and some highly specialized investigations, such as: (1) molecular and genetic, based on nucleic acids tests via PCR (Polymerase Chain Reaction) to determine the presence of FVL, carriership of prothrombin G20210A and PLA1/A2 polymorphism in glycoprotein IIb/IIIa and carriership of JAK2 V617F; (2) expression of CD11b/CD18 on neutrophils' surface, determined by immunophenotyping of peripheral blood.

Results are processed with established software statistical packages STATGRAPHICS; SPSS and EXCEL for Windows. Parametric tests to check hypothesis in normal and close to normal distribution of cases [t-test, ANOVA c post hoc tests Tukey, Scheffe, Bonferroni, Newman-Keuls, Duncan] and non-parametric ones in different than normal distribution of cases [Pearson  $\chi^2$  - test, Mann-Whitney, Kruscal-Wallis H-test] are used. To model and prognose the correlations, regression models are used. To compare time-event data, a Kaplan-Maier test is applied.

Presented data are results of 4 scientific projects, financed by Medical University – Pleven: project N13/2013, project N2/2015, project N9/2017 and project N9/2019.

**RESULTS** are correctly presented and illustrated with many figures, graphics and tables, subdivided into groups, depending on the tasks.

*On the 1<sup>st</sup> task the frequency of genetic defects for thrombophilia carriership in MPN patients has been studied.* The presence of the investigated factors (FVL, G20210A, PLA1/A2) has been found in 34.78% of patients and this prevalence is significantly higher than in control group (23.15%). In MPN patients FVL carriership of 2.90% is found [2 PV; 2 CML], but almost 2 times higher is confirmed for the control group (6.48%); the carriership of G20210A polymorphism of prothrombin gene is found in 7.25% of patients [5 MF, 3 CML, 1 PV, 1 ET] and the carriers in the control group were 3 times less (2.78%), although the difference is not statistically significant; the carriership of GP IIb/IIIa (PLA1/A2) is in 26.81% of MPN patients [9 PV; 9 CML; 7 ET; 8 MF] – frequency is significantly higher than in control group (13.89%).

*On the 2<sup>nd</sup> task the frequency of genetic thrombophilia defects is compared between patients with and without TEs.* No TEs are registered in FVL patient carriers. In 4 (2.90%) patients, who carry G20210A, TEs are registered but no significant difference is found, associated with mutation burden between patients and healthy volunteers, as well as between patient carriers and non-carriers of G20210A, which suggests that *G20210A carriership is a risk thrombotic factor but the risk in MPN patients is not higher than in healthy volunteers.* In 9 of the patients who carry PLA1/A2 polymorphism, TEs are registered, and a significantly higher thrombotic frequency is found in patients as compared to healthy volunteers, who also carry the mutation. The thrombotic risk increases, but when comparing patient carriers and non-carriers such differences are absent. These data suggest the conclusion that PLA1/A2 carriership is a significant risk thrombotic factor in the context of confirmed MPN and the risk is 8 times higher in these patient populations than in healthy control carriers.

*On the 3<sup>rd</sup> task an association between genetic thrombophilia carriership and thrombotic risk in different MPN subgroups is studied.* **In PV** subgroup 15 TEs are documented in 14/49 (28.57%) patients and the frequency of TEs is comparable to the frequency reported by other authors (30.0-41.0%). A significantly higher frequency of TEs is found in PV patients, who carry genetic thrombophilia (30.61%) as compared to control group carriers and carriership increases 17 times the thrombotic risk in PV patients. Significantly higher frequency of TEs in PV patients, who carry PLA1/A2 polymorphism, is observed as compared to healthy volunteers, thrombotic risk is also increased. These data confirm the conclusion that 14 times higher risk for thrombosis is present in PLA1/A2 carriers among PV patients. Significantly higher TEs frequency is also found in PV patients, who carry JAK2 V617F, in comparison to non-carriers and the thrombotic risk is significantly increased. Carriership of JAK2 V617F is associated with a 7-times increase of TEs in PV patients. **In ET** patients TEs are registered in 30% of them and this frequency matches literature data (19-32%). No significant difference in TEs frequency in ET patients is found, associated with genetic thrombophilia and also in TEs frequency in ET patients as compared to healthy volunteers. In this patient population no increase in thrombotic risk is found for G20210A carriers, possibly because of a small carrier number. No FVL patient carrier is confirmed to have TEs. No significant difference in TEs



frequency is found between ET patients, who carry PLA1/A2 as compared to healthy volunteer carriers. The carriership of PLA1/A2 is considered a risk factor (although statistically insignificant) when ET diagnosis is present. A lot of evidence exists on the increased thrombotic risk in ET patients and JAK2 V617F mutation. But in the studied patient population such significant difference in TEs frequency in ET patients, associated with JAK2 V617F mutation status, is not found and this is the reason this factor slightly increases the thrombotic risk - the investigated patient subgroup is small. **In MF** subgroup TEs are registered in 30.77% of patients and *thrombotic frequency* is higher than reported in literature ( $\approx 10\%$ ) and highest of all MPN patients tested. Thrombotic complications are found in 23.08% of secondary MF patients and in 34.62% of primary MF. No significant differences in frequency and thrombotic risk in MF patients, who carry genetic thrombophilia (15.48%) were found as compared to non-carriers (38.46%). In healthy volunteers' control group, no carrier of genetic thrombophilia has a TE, which suggests a *9-times increase in thrombotic risk for MF patients who carry genetic thrombophilia than in healthy volunteers*. No difference in thrombotic frequency is found between MF patient carriers and non-carriers of G20210A polymorphism, as well as between MF patients and healthy volunteers. There is no significant difference in TEs frequency of MF patients, carriers and non-carriers of PLA1/A2 polymorphism, the risk is also not changed. No significant difference is observed when comparing PLA1/A2 carriership frequency between patients and healthy volunteers. But significantly *higher TEs frequency is found in MF patients, who carry JAK2 V617F mutation (TEs in 52.94%) as compared to non-carriers (TEs in 16.67%)*, which is a significant 3-times increase in thrombotic risk in MF carriers. It is a well-known fact that age  $>60$  years is a significant risk factor, besides JAK2 V617F mutation, and the combination of these two factors usually leads to a TE. In this study significantly higher frequency of JAK2 V617F (+) mutation in older people ( $>60$  years) with MF diagnosis and TE (75%) is found as compared to patients with both factors but without a registered thrombosis (27.93%). Thus, confirmation of *JAK2 V617F in MF patients aged  $>60$  years significantly 8 times increases the risk for TEs*. **In CML** 8 TEs are registered in 7/30 patients (23.33%) and this frequency is higher than the average reported in literature (1.0-36.0%). Significantly higher frequency of TEs is found in CML patients, carriers of genetic thrombophilia as compared to healthy volunteers and the thrombotic risk in these patients increases 18 times. The risk of TEs with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) target therapy is well-known but in the studied group only 3 newly diagnosed patients are included, which may suggest that TEs are therapy related. No significant difference in TEs frequency in patients is found, associated with genetic thrombophilia status [TEs 4/12 in carriers versus TEs 3/18 in non-carriers] and no significant increase in the risk is registered. In CML significantly higher frequency of TEs is found and the thrombotic risk increases for patients, who are G20210A carriers, as compared to non-carriers. No significant difference in thrombotic frequency is found in CML patients when compared to healthy volunteers, who carry PLA1/A2, although not statistically significant, a certain increase in the risk for patients is present.

*On the 4<sup>th</sup> task frequency and significance for thrombotic risk in patients, who carry JAK2 V617F mutation and combined carriership of genetic defects, are studied.* The carriership of JAK2 V617F mutation was found in 35/97 of tested MPN patients. A significantly higher frequency of TEs in carriers is confirmed [48.57% versus 11.29% in non-carriers]. It is defined that JAK2 V617F significantly 4 times increases thrombotic risk in MPN patients but statistically significant difference in TEs frequency, based on mutation burden, is absent. The risk for TEs is analyzed in combined carriership of JAK2 V617F and genetic thrombophilia and is significantly higher than in genetic thrombophilia carriers only. *At the same time*, when comparing thrombotic frequency and thrombotic risk in patients with combined carriership to non-carrier patients, the difference is not significant. The frequency of thrombosis in patients

with combined carriership is compared to patients who only carry JAK2 V617F and the difference is also not significant. These data suggest that *TEs risk increases when JAK2 V617F mutation is added to already existing genetic thrombophilia*. The highest frequency for combined carriership is confirmed for PLA1/A2 and JAK2 V617F – half of these combined carriers have anamnesis for TEs. When comparing these patient population to patients, who carry genetic thrombophilia only, a significant difference in TEs is seen, which confirms that *MPN patients with combined carriership of PLA1/A2 and JAK2 V617F have significantly higher thrombotic risk* than single carriers only. Highest frequency of combined carriership is seen in PV subgroup but no significant difference is found in thrombotic frequency, when compared to other MPN patient subgroups (ET, MF, CML). These observations confirm the conclusion that *thrombotic risk in PV patients with combined carriership is higher*, although not statistically significant, probably because of small subgroup analysis.

*On the 5<sup>th</sup> task the significance of full blood count (FBC) parameters is studied – leukocytes, hemoglobin, platelets, for the thrombotic risk in MPN patients.* Patients were separated into groups with low/normal and high cell counts of leukocytes, hemoglobin and platelets. When comparing patients with increased leukocytes to those with low/normal ones, leukocytosis appears to be a risk thrombotic factor in CML and PV but significance is only confirmed for CML. Currently, leukocytosis in MPN is not a confirmed risk factor, used for therapeutic decisions, regardless of the fact that some studies define it as a prognostic marker for TEs and that in PV it is associated with higher arterial TEs frequency, especially in JAK2 V617F carriership. The same approach is used when analyzing the significance of increased hemoglobin levels for TEs – patients of each MPN entity are separated into subgroups – with high and low/normal hemoglobin level but *no significant differences in TEs are found between the two groups* in all disease entities. When comparing patients with thrombocytosis to those with low/normal platelet count, it is found that *in CML an increase platelet count is a prognostic factor, significantly increasing the thrombotic risk*.

*On the 6<sup>th</sup> task the expression of CD11b/CD18 on neutrophils of 113 patients is investigated and compared with a control group.* An association between this expression and genetic defects carriership in patients (n=32) was studied, also for patients with TEs in separate subgroups. It is found that the average number of neutrophils that express CD11b/CD18 [CD11b/CD18(+) neutrophils] in MPN patients is significantly higher than in control groups of healthy volunteers. The lowest average count is found in CML and highest – in PV, but the differences in separate MPN diseases are not significant. To estimate the significance of CD11b/CD18 (+) neutrophils for TEs, the average counts of patients with and without TEs are compared. Overall, in MPN patients significantly higher number of CD11b/CD18(+) neutrophils is found when TEs are present, as compared to patients without TEs, but in separate MPN entities this association is confirmed for PV and ET. Data is analyzed through logistic regression and results show that the independent variable “CD11b/CD18(+) neutrophils” influences significantly the probability for TEs, probably because of neutrophil “stickiness” and leukocyte-platelet aggregates formation. These data outline the possibility to confirm initial results and the specified values to be used as predictive markers for TEs. The significance of CD11b/CD18(+) neutrophils in MPN patients, depending on the white blood cells count, is also studied and significantly higher average number of neutrophils is found in patients with: leukocytosis and registered TEs as compared to other patients with leukocytosis; in patients with leukocytosis as compared to those without leukocytosis. These results lead to the conclusion that leukocytosis is a key factor for TEs development and that TEs are probably associated with CD11b/CD18(+) neutrophils in the absence of leukocytosis. An association is also analyzed between average CD11b/CD18 neutrophils’ count and thrombocytosis and its significance for TEs, but no significant difference is found in the average CD11b/CD18 neutrophils’ count between patients with or without TEs, which

confirms that thrombocytosis is not a significant factor. At the same time, a significantly higher CD11b/CD18(+) neutrophil count is found in patients without thrombocytosis but with TEs, as compared to those without TEs. These data show the absence of association between thrombocytosis, neutrophils' hyperactivity and TEs presence. The association between CD11b/CD18(+) neutrophils' count in MPN patients and presence of genetic abnormalities for the thrombotic risk is also studied. Significant differences in the CD11b/CD18(+) neutrophils' count are found when comparing patients with and without TEs only in G20210A non-carriers and PLA1/A2 non-carriers, while an association is not present when comparing carriers of FVL, G20210A, PLA1/A2 and JAK2 V617F mutation with and without TEs. At the same time, significant differences are found when comparing CD11b/CD18(+) neutrophils' count in MF patients with TEs, who carry JAK2 V617F, to those, who are negative for the mutations.

*On the 7<sup>th</sup> task the role of comorbidity/risk factors (C/R) on thrombotic risk in MPN patients has been studied.* Based on collected data patients are divided into 6 groups, depending on the number of C/R factors they have [no C/R factors and 1-5 of them] and also depending on the presence/absence of TEs. A significant increase in the absolute count and percentage of patients with TEs has been found when  $\geq 2$  C/R factors are present as compared to those with  $\leq 1$  factor and this supports the conclusion that the absence or presence of only 1 factor decreases thrombotic risk. *A significantly higher thrombotic frequency of cardio-vascular diseases is seen in patients with TEs. At the same time, the significance of C/R number is not similar for all MPN entities. A significantly lower frequency of TEs is present in patients with  $\leq 1$  C/R factor in CML and MF subgroups as compared to other patients and thus, when more factors are present the risk increases in both diseases.* In CML it has been pointed out that thrombosis appeared early in the course of the disease, before TKIs intake. In this patient subgroup *smoking is a confirmed risk thrombotic factor*; while in MF *cardio-vascular diseases increase the risk*. In PV and ET subgroups no significant difference in TEs frequency is found when comparing patients with  $\leq 1$  C/R factor and  $> 1$  C/R factors. At the same time, higher TEs frequency is reported in PV patients with  $> 2$  factors as compared to those with  $\leq 2$ . Unlike other similar studies, in this dissertation work a statistically significant increase in thrombotic risk for PV patients with arterial hypertension, diabetes mellitus, dyslipidemia and smoking are not confirmed.

**CONCLUSIONS** in the dissertation work are comprehensive, follow the results and match tasks: **(1)** The carriership of genetic thrombophilia defects is significantly more frequent in MPN patients as compared to healthy volunteers and the most significant difference between the two groups is found for factor PLA1/A2, especially in PV patients; **(2)** Although the thrombophilia defects in the whole MPN group do not demonstrate an association with the risk for TEs, patients that carry them have significantly 13 times higher thrombotic risk as compared to healthy volunteers; **(3)** The carriership of PLA1/A2, among all thrombophilia defects studied, is more commonly found in PV patients but also indicates significance in MF and CML subgroups, that have not been so extensively studied by now. In CML the carriership of all genetic thrombophilia defects increases 2 times the thrombotic risk and G20210A on its own – 5.6 times; **(4)** The carriership of JAK2 V617F mutation is associated with an increased thrombotic risk in PV and MF patients (7 and 3 times, respectively) and combined carriership of genetic abnormalities like thrombophilia and JAK2 V617F is 6 times more frequent in PV patients as compared to other MPN entities. Double carriers of genetic thrombophilia and JAK2 V617F mutation have significantly 2 times higher risk to experience TEs when compared to only genetic thrombophilia carriers; **(5)** Leukocytosis is confirmed to be a significant thrombotic risk factor in patients with CML and PV and thrombocytosis - only in CML; **(6)** Neutrophilic CD11b/CD18 expression is significantly increased in all MPN patients but also in separate disease entities as compared to healthy volunteers and is also

significantly higher in patients with TEs, compared to those without, especially in PV and ET. In the MPN group with carriers (of genetic thrombophilia and JAK2 V617F mutation) no significant difference is confirmed in the neutrophils, that express CD11b/CD18, when comparing patients with and without TEs; (7) The presence of  $\geq 2$  comorbidity/risk factors significantly increase thrombotic risk in MPN patients. Arterial hypertension, ischemic heart disease and heart failure are significantly more frequent in patients with TEs than in those, without anamnesis for thrombosis; (8) The proposed algorithm to evaluate the risk factors for TEs in MPNs may be used as an element in the complex approach to precise and individualize thrombotic risk in this patient population.

### CONTRIBUTIONS

The scientific contributions of **DOROTEYA TODORIEVA-TODOROVA, MD** are formulated in the following main directions:

#### **I. Contributions with scientific and original character:**

1. This study is the first complex investigation of some risk factors for thrombogenesis in patients with CML and Philadelphia-negative MPNs – *I accept without any remarks.*
2. Scientific data is added to the frequency and risk change when some genetic factors for thrombophilia are present in CML and MF patients, they have not been studied in this context yet, especially for the PLA1/A2 carriership – *I accept without any remarks.*
3. Neutrophilic expression of CD11b/CD18 has been studied as a marker for leukocytic activity in classical MPNs (and in separate diagnostic subgroups) and its significance is determined for TEs as well as in the context of blood counts – *I accept without any remarks.*
4. Comprehensive information is collected, and the significance of different comorbidity/risk factors is reported for the thrombogenesis in all patients – *I accept without any remarks.*
5. An attempt is made to present the complex view of complicated and multifactorial etiopathogenesis of TEs and define the role of each factor when assessing the risk for thrombotic complications in all MPN patients – *I accept without any remarks.*

#### **II. Contributions of practical character:**

1. Thrombotic risk in different MPN entities is precisely reported on the basis of genetic thrombophilia mutations – *I accept without any remarks.*
2. An association between change in MPN patient neutrophils, expressing CD11b/CD18, and thrombotic risk increase is confirmed – *I accept without any remarks.*
3. When validated in large patient populations these levels would serve as “cut-off” or predictive of thrombotic event in different MPN subgroups – ***I accept with a remark – A hypothesis has been postulated – at the present moment such “cut-off” levels cannot be used in the clinical practice yet.***
4. Precise comorbidity/risk factors are established, associated with thrombogenesis in patients – *I accept without any remarks.*
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 – *I accept without any remarks.*

#### **PUBLICATIONS AND SCIENTIFIC REPORTS, ASSOCIATED WITH THE DISSERTATION WORK**

Three full-text original articles have been presented in association with this dissertation work in which D. Todorieva-Todorova, MD is a leading author; and 4 scientific reports, presented in national and international forums, in one of them she is the first author and, in the others, third and subsequent.

#### **ORIGINAL ARTICLES:**

1. Todorieva-Todorova DK, Kovacheva KS, Tzvetkov NT, Trifonov SV, Stavreva GTs, Rashev TR, Todorov AA, Ivanov PD. A study on the role of thrombophilic genetic disorders as a risk factor for thrombotic complications in patients with myeloproliferative disorders. *Journal of Biomedical and Clinical Research (jbcR)*, Vol.12 Number 1, 2019, p 19-26. [referred in **Web of Science (2014-)** (CABI) - 60 p./8 = 7.5 p.]
2. Todorieva-Todorova DK, Kovacheva KS, Tzvetkov NT, Blazheva SO, Lukanov TH. Granulocytic expression of CD11B/CD18 and thrombotic risk in patients with myeloproliferative neoplasms. *Journal of Biomedical and Clinical Research (JBCR)* Vol. 14, No. 1, 2021, p. 47-53. [referred in **Web of Science (2014-)** (CABI); 60 p./5 = 12 p.]
3. Todorieva-Todorova D, Gercheva L, Kovacheva K, Mineva-Dimitrova E. Role of neutrophil CD11B/CD18 expression in thrombogenesis of patients with myeloproliferative neoplasms, p. 47-53 "HEMATOLOGY" issue 1-2/2023, Vol. LX, ISSN 2367-7864 [referred in **Scopus (2015-); 60 p./4 = 15 p.**]

The articles have been published in scientific journals, referred and indexed in international database for scientific information. The current points of all parameters (G7) are: 7.5 p. + 12 p. + 15 p. = **34.5 p.**, that exceeds the minimum criteria for acquiring the educational and science degree "Medical doctor" – 30 p. according to the Minimal national requirements for scientific and teaching activity of candidates to acquire the science degree and hold an academic position of "Chief assistant", "Associated professor" and "Professor".

#### **SCIENTIFIC REPORTS**

1. Dineva D, Paskaleva I, Todorieva-Todorova D. (2019). Evaluation of platelet reactivity on dual antiplatelet therapy in patient with essential thrombocythemia and acute coronary syndrome. *Clinica Chimica Acta*. 493. S405. 10.1016/j.cca. 2019.03.863.
2. Velkova A, Tzvetkov N, Kovacheva K, Todorieva D, Ivanov P, Todorov A, Penkova R, Golemanov G, Panayotova S, Popova VA. Study on the role of genetic thrombophilic disorders as a risk factor for thrombotic complications in patients with myeloproliferative disorders. Oral presentation at XII Anniversary International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors, Pleven, Bulgaria. 8-11 Oct, 2013
3. Todorieva D, Kovacheva K, Tsvetkov N, Todorov A, Ivanov P, Penkova R, Golemanov G, Panayotova ST, Popova V, Velkova A. Genetic defects for thrombophilia as risk factors for thrombotic complications in patients with myeloproliferative diseases. Oral presentation, Second National Symposium "Young Hematologist", Sliven, Bulgaria. November 9-10, 2013
4. Tsvetkov N, Kovacheva K, Todorieva D, Todorov A, Panayotova ST, Popova V, Ivanov P, Komsa-Penkova R, Velkova A. Study on the role of genetic defects for thrombophilia as risk factors for thrombotic complications in patients with myeloproliferative diseases. . Poster, X National Congress of Hematology, Pravets, Bulgaria, 22-25.10.2015.

#### **CONCLUSION**

Based on the above written I consider that the presented dissertation work and the scientific and practical contributions of DOROTEYA KOSTADINOVA TODORIEVA-TODOROVA, MD are personal work of the dissertation student and demonstrate exhaustive theoretical knowledge on the topic, ability to creatively interpret data, routine results and highly specialized investigations, such as genetic, immunological and comorbidity factors, that are important for the appearance and manifestation of thrombotic complications in MPNs. DOROTEYA KOSTADINOVA TODORIEVA-TODOROVA, MD shows an ability to develop scientific hypothesis and constructively discuss the results.

The presented dissertation work of DOROTEYA KOSTADINOVA TODORIEVA-TODOROVA, MD is complete and contains scientific and practical results, which represent an original contribution and fulfill the requirements of Law on Academic Staff Development in Bulgaria, its regulations and the regulations for the Academic Staff Development in Medical university – Pleven.

Based on all the above written, I have the reason to give a positive assessment of the dissertation work and suggest to the respected Scientific jury to award the educational and science degree “MEDICAL DOCTOR” to DOROTEYA KOSTADINOVA TODORIEVA-TODOROVA, MD.

Sofia

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

**На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

Prof. Gueorgui Balatzenko, MD, PhD