



ДО:
ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО ЖУРИ
ОПРЕДЕЛЕНО СЪС ЗАПОВЕД
№1429/28.05.2024 година.
НА ПРОФ. Д. ДИМИТРОВ, ДМ
РЕКТОР НА МУ-Плевен
гр. Плевен

СТАНОВИЩЕ

От проф. д-р Маргарита Любенова Генова, дм
Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания - София

Относно:
ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД НА ТЕМА
„КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА ГЕНЕТИЧНИ, ИМУНОЛОГИЧНИ И КОМОРБИДНИ ФАКТОРИ ЗА
ОПРЕДЕЛЯНЕ ТРОМБОГЕННИЯ РИСК ПРИ ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ
НЕОПЛАЗИИ”

за придобиване на образователната и научната степен „ДОКТОР” по направление 7.
Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина и научна специалност
„Хематология и преливане на кръв”

Научни ръководители:

Проф. д-р Лиана Герчева-Кючукова, дм

Проф. д-р Катя Ковачева-Коцева, дм

Д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова

докторант към

Катедра “Нефрология, хематология и гастроентерология”, Факултет „Медицина“, Медицински
университет-Плевен

УВАЖАЕМИ Г-Н ПРЕДСЕДАТЕЛ НА НАУЧНО ЖУРИ,

Предоставям на Вашето внимание рецензия относно дисертационния труд за
получаване на образователната и научна степен „доктор” от докторант д-р Доротея
Костадинова Тодориева-Тодорова съгласно изискванията на Правилника за развитието на
академичния състав в Медицински университет Плевен във връзка със заповед
№1429/28.05.2024 година на Ректора на МУ-Плевен.

I. Кратки биографични данни за докторанта:

Д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова завършва висше образование магистър
по медицина във Медицински университет Плевен през 2011 год. Придобива медицинска
специалност по Клинична хематология (2018 год.). Професионалното развитие на
докторантката започва в Клиника по хематология към УМБАЛ „Георги Странски”, Плевен през
2012 год., където продължава и до днес.

Д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова устойчиво работи за професионалното
си развитие – преминава през сериозната школа на ЕНА Masterclass (2015), ЕНА Bite-Size
Mastreclass Hemophilia (2016); сертифицирани обучения за участие в клинични проучвания

(IATA certificate, GCP сертификат); придобива магистърска степен по Здравен мениджмънт (2023). Преминава успешно европейски изпит по хематология (2018). През 2022 год. д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова е зачислена за разработване на дисертационен труд.

По темата на настоящата докторантура д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова е публикувала 3 статии в български научни издания – 1 на български и 2 на английски език, и е представила резултати на 4 научни форума. Докторантката има многобройни участия в научни и образователни форуми. Докторантката работи активно по няколко научни проекта, финансирани от МУ – Плевен (проект N 13/2013, проект N 2/2015, проект N 9/ 2017 и N 9/ 2019), резултатите от които са залегнали в настоящия дисертационен труд.

II. Обща оценка на дисертационния труд:

Представеният дисертационен труд е посветен на **актуален научно-медицински проблем**, какъвто представлява рискът от тромбоза. Тромботичният риск при миелопролиферативните неоплазии е сериозен проблем, като артериалните и венозни тромбози представляват една от основните причини за болестност и смъртност в тази нозологична категория заедно с трансформацията към миелофиброза или остра левкемия. Известни са различни клинични и патофизиологични фактори, които допринасят за развитието на тромботични усложнения. Известни са някои клинични рискови фактори. В значителна степен съвременната терапевтична парадигма при ХМПН се фокусира върху превенцията на тромбозата. В тази връзка, опитите за по-добро характеризирание на подлежащите клетъчни и молекулярни механизми на склонността към тромбози са съществени за постигане на подобрена персонализирана предикция и стратификация на риска и избор на оптимални терапевтични стратегии.

Дисертационният труд, представен от докторант Д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова **съответства на основните изисквания** на Правилника за прилагане на закона за развитието на академичния състав в Република България:

Представената научна продукция в настоящия конкурс изпълнява минималните национални изисквания по чл.26 от ЗРАСРБ (ДВ, бр.30 от 2018 г., в сила от 04.05.2018 год.) и чл. 1а от ППЗРАСРБ (ДВ, бр.56 от 2018 г., в сила от 06.07.2018 год.) за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ в Област на висше образование 7. „Здравеопазване и спорт“ Професионално направление 7.1. Медицина (Таблица).

Група от показатели	Показател	Брой точки за „доктор“	Брой точки на д-р Доротея Тодориева
А	1. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“	50	50
	ОБЩО ЗА ГРУПА „Г“	30	34.5
Г	1. Научна публикация и доклади в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация	60/n	7.5
	2. Научна публикация и доклади в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация.	60/n	12
	3. Научна публикация и доклади в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация	60/n	15

1. Дисертационният труд е представен във вид и обем от общо 159 страници, като съдържа: съдържание (4 страница); използвани съкращения (3 страници); изложение, структурирано в следните раздели - I. Въведение и литературен обзор (36 страници); II. цел и задачи (1 страница); III. изследователски материали и методи (4 страници); IV. резултати и обсъждане (76 страници); основни изводи от проведените изследвания, заключения и приноси (2 страници); приложения (9 страници – формуляри, анкетни карти, решения на етична комисия); списък с публикации по темата (2 страници); използвана литература. Библиографията включва 223 печатни източника на английски език, 26% от които са от последните години (2019-2024 год.). Резултатите от проведените изследвания са онагледени с 26 фигури и 47 таблици.

Приложен е автореферат в обем от 67 страници, който отразява основните моменти на дисертацията и съдържа (1) списък на публикациите във връзка с дисертационния труд.

2. Дисертационният труд показва, че докторант Д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова притежава теоретични знания по своята специалност и способности за провеждане на изследвания, резултатите от които представляват принос в медицинската наука и практика.

2.1. Дисертационният труд съдържа **Литературен обзор**, който ясно показва добрата информираност на докторантката в обем от 36 страници, структуриран в няколко основни направления:

Общ преглед на хроничните миелопролиферативни неоплазии (ХМПН) по отношение на дадените дефиниции, историята на познанието, диагностиката, класификациите и епидемиологията. Представени са познанията относно етиология и патогенеза на ХМПН, в т.ч. преглед на ролята на ключови генетични нарушения, както и относно клиничната изява на основните нозологични категории.

Подробно са разгледани тромботичните усложнения при ХМПН, като е обсъдена честотата и рисковата стратификация по отделните нозологични единици.

Специално внимание е посветено на патогенезата на тромботичните усложнения и ролята на активацията и броя на хемопоеитичните клетъчни елементи - левкоцити, еритроцити, тромбоцити, генетичните нарушения, антигенна експресия, екстрацелуларните везикули, свръхактивирания ендотел, коагулационната система и процесите на тромбовъзпаление. Разгледано е и значението на фактори като коморбидитет за общия рисков профил, както и терапевтичните стратегии при пациенти с висок рисков тромбогенен профил.

Анализът на представените в обзора данни позволяват на д-р Доротея Тодориева да формулира хипотезата, че съществува поле за допълнителни проучвания, които да прецизират ролята на определени генетични, имунофенотипни и коморбидни фактори и тромбогенезата при пациенти с ХМПН, което да позволи по-добър клиничен контрол на риска.

Докторантката ясно формулира **целта на проучването** - да се проучи ролята на някои генетични [Factor V Leiden (FVL); Prothrombin (Factor II) (PT) G20210A мутацията; PIA1/A2 полиморфизъм на Glycoprotein IIIa (GPIIIa); JAK2 V617F носителство], имунологични (CD11b/CD18 експресия) и коморбидни фактори (придружаващи заболявания) в тромбогенезата при пациенти с ХМПН. За постигането ѝ са формулирани ясни задачи.

2.2. Представените от докторант Д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова **Материали и методи** са подбрани в съответствие с поставената цел и основни задачи. Дисертационният труд се основава на изследването на общо 138 възрастни пациенти с диагностицирани ХМПН, както и 2 контролни групи - 108 здрави доброволци като контрола за генетична тромбофилия, както и 46 здрави доброволци като контрола за експресия на CD11b/CD18 върху неутрофили. Характеристиките на пациентската кохорта и контролните групи здрави лица са обсъдени в раздела "Резултати".

В допълнение към класическите анкетни, клинични и лабораторни методи, дисертационният труд включва подбран за изпълнение на поставените задачи набор от специфични методи на изследване: а) молекулярно-генетични, основани на полимеразно-верижна реакция - Polymerase Chain Reaction (PCR), за генотипиране на FVL, G20210A мутация, PLA1/A2 мутация и JAK2 V617F; (2) флуоцитометрични за изследване на повърхностната експресия на CD11b/CD18 върху неутрофили в периферна кръв. Използван е богат пакет от статистически методи за анализ на дискретни и непрекъснати величини.

2.3. Дисертационният труд представя **Научни резултати**, описани коректно, онагледени с графики и таблици, както следва:

- Представени са основните характеристики на пациентите, включени в проучването, както и подходите за групирането им по различни характеристики за целите на последващия анализ. Данните предоставят реален разрез на пациентите с хронични миелопролиферативни неоплазии в един обособен клиничен център по отношение на основните демографски параметри, както и на честотата на тромботични инциденти.

- Проучена е честотата на генетична тромбофилия в групата ХМПН и е установено, че е статистически значимо по-висока спрямо честотата в съответната контролна група здрави лица (КГ1) за сметка на носителство на PLA1/A2, което се установява по-често при изследваните пациенти спрямо КГ1 и се свързва с 8-кратно по-висок тромбогенен риск. По отношение на носителството на FVL и G20210A, изследванията не показват по-висока честота в групата на пациентите, но G20210A се потвърждава като рисков тромбогенен фактор.

- Сравнена е честотата на носителство на тромбофилични дефекти в групата на ХМПН и контролна група здрави лица (КГ1). Установено е, че носителството на FVL не покачва риска от преживяване на тромботично събитие при пациенти с ХМПН, докато носителството на PLA1/A2 го покачва 8-кратно при пациенти с ХМПН спрямо КГ1, а G20210A се доказва като рисков тромбогенен фактор, но рискът не е по-висок спрямо доброволците от КГ1.

- Проучена е асоциацията между носителството на генетична тромбофилия и тромбогенния риск при пациенти с различни видове ХМПН, като е установено, че общият риск от тромботично събитие при носителство на генетична тромбофилия си покачва 13 пъти спрямо контролите. Установено е, че: (1) при пациенти с диагноза полицитемия вера (ПВ) носителството покачва риска от съдово събитие 18-кратно, като това важи в значителна степен за носителството на PLA1/A2, както и на JAK2V617F; (2) при пациенти с есенциална тромбоцитемия (ЕТ) – 14-кратно за носители на PLA1/A2; (3) при миелофиброза (МФ) – 9-кратно за носителите на G20210A и PLA1/A2 и 3-кратно за носители на JAK2V617F; (4) при хронична миелоидна левкемия (ХМЛ) – 18-кратно, сходно на пациентите с ПВ, особено значимо за носители на G20210A и PLA1/A2.

- Изследвана е честотата и значението на JAK2 V617F мутацията при пациенти с ХМПН и е установено, че 36.1% от пациентите, за които е проведено изследване, са хетерозиготни (23.7%) или хомозиготни носители (12.4%) При съобщаване на резултатите, относителният дял на носителството е представен като % от цялата кохорта, което не предоставя коректна представа за честотата на аберацията, тъй като за 29.71% от пациентите няма данни. Наличието на JAK2 V617F покачва 4-кратно тромбогенния риск, като допълнително покачва риска при доказаната генетична тромбофилия, особено при PLA1/A2. Най-висок е тромбогенният риск при пациенти с комбинирано носителство на генетични отклонения в подгрупа ПВ.

- Проучено е значението на хематологичните показатели по отношение на тромбогенния риск. Левкоцитозата е идентифицирана като рисков тромбогенен фактор при

пациенти с ХМЛ и ПВ, а тромбоцитозата - само при ХМЛ, докато нивото на хемоглобина не се асоциира с повишен тромбогенен риск в изследваната кохорта.

- Освен количествено, неутрофилната популация е оценена по отношение на експресията на CD11b/CD18, като се установяват значимо по-високи нива при всички ХМПН спрямо контролната група здрави лица, хай-високи при ХМЛ, а най-ниски – при ПВ. Пациентите ПВ и ЕТ с преживяно тромботично събитие се характеризират с по-високи нива CD11b/CD18(+) неутрофили, като покачането с 1% на CD11b/CD18(+) неутрофили в цялата кохорта ХМПН води до нарастване на риска от ТС. Допълнителният анализ показва, че тромбоцитният брой и наличието на генетични аберации не се асоциира с CD11b/CD18 експресия

- Тромбогенният риск е оценен и спрямо наличието на коморбидни фактори, наличието на 2 и повече от които покачва значимо тромбогенния риск в изследваната група пациенти, с най-значим ефект на артериалната хипертония, ИБС и сърдечната хедостатъчност с някои ососбености. АХ и ИБС са доказано значими при пациентите с миелофиброза, докато тютюнопушенето - при ХМЛ. Тромбогенният риск при пациенти с ПВ се покачва само, ако са налице \geq два рискови/коморбидни фактора.

2.4. Д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова прави анализ на данните от собствените си изследвания и тези на други изследователски групи, намерени в литературните източници, в общ раздел „Резултати и обсъждане“. Обобщеният анализ на предложените от други автори концепции за патогенезата на тромботичните събития при ХМПН и собствените данни дават основания да се дефинират рискови фактори както за Ph'(+) ХМЛ, така и за Ph'(-) ХМПН общо и поотделно. Формулирани са **Изводи**, по отношение на:

- Честотата на генетичните дефекти, както свързани с тромбофилия, така и с онкогенезата, при пациенти с ХМПХ спрямо здрави лица, както и в отделните подтипове ХМПН.
- Асоциацията на генетичните дефекти с риска от тромботични събития, като е изведена ролята на наличието на множествени генетични аберации.
- Диференцираното значение на хематологичните показатели (левкоцити, тромбоцити) в отделните нозологични категории.
- Ролята на неутрофилната активация, оценена чрез мембранната експресия на CD11b/CD18.
- Значението на коморбидните/рискови фактори, които потенциално биха могли да представляват таргети за превенция чрез правилното им управление.

При формулиране на изводите би могло да избегне преповтаряне на резултати, а да се наблегне върху произтичащите от тях биологични и клинични аспекти на наблюденията. Това би дало допълнителна стойност на задълбочените и обстойни изследвания.

2.5. Приемам формулираните Д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова **Приноси**, и обособяването им в две основни групи:

Приноси с теоретичен и оригинален характер: докторантката е провела първото комплексно изследване, обобщаващо съществени рискови фактори за тромбогенеза при пациенти с Ph'(+) ХМЛ и Ph'(-) ХМПН, с което са добавени нови научни данни за честотата и значението за тромбогенния риск на генетични фактори за тромбофилия при пациенти с ХМЛ и МФ, които не са проучвани в този контекст, и по-специално на PLA1/A2. Потвърдена е ролята на CD11b/CD18 експресия върху неутрофили, като маркер за левкоцитна активност, при класическите ХМПН (и в отделните диагностични подгрупи) за развитието на тромбоза. Събрана е подробна

информация и е отчетена значимостта на различни коморбидни/ рискови фактори, които допринасят за тромбогенезата при всички пациенти.

Научно-приложни приноси:

Проучването на генетичните нарушения, неутрофилната активация, хематологичните показатели и рискови/коморбидни фактори доказва съществени връзки с възникването на тромботични събития, което дава възможност за разработване на аргументиран алгоритъм за комплексна оценка и прецизиране и индивидуализиране на управлението на тромбогенния риск при пациенти с ХМПН.

III. Препоръки и забележки.

- Използваните методи са много схематично представени без да предоставят възможност настоящият дисертационен труд да бъде използван като практическо ръководство за работата на последващи докторанти и изследователи, като им предостави ясно разбиране на същността на извършените изследвания и бъдещото им възпроизвеждане.
- На графики №№7-9,11,13,16 резултатите са представени като брой пациенти, което не винаги позволява добра сравнителна визуализация между пациентската и контролна кохорта поради различния общ брой случаи във всяка една от групите.
- Не е спазен единен стандарт при изписване на литературните източници, което не съответства на иначе прецизното изготвяне на текста на дисертационния труд.
- Тези констатации не променят труда по същество, който разработва актуален научно-медицински проблем и има съществени приноси в познанието с потенциал за бъдещи проучвания и приложения. Надявам се настоящите забележки и препоръки да бъдат полезни за по-нататъшните проучвания на докторантката, която демонстрира сериозна заявка за бъдеща научно-изследователска кариера.

IV. Заключение.

В заключение, представеният дисертационен труд на д-р Доротея Костадинова Тодориева-Тодорова - докторант към Катедра "Нефрология, хематология и гастроентерология", Факултет „Медицина“, Медицински университет-Плевен, на тема „КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА ИМУНОЛОГИЧНИ, ГЕНЕТИЧНИ И КОМОРБИДНИ ФАКТОРИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ ТРОМБОГЕННИЯ РИСК ПРИ ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗИИ“ представлява собствена разработка на докторанта по актуален научно-медицински проблем, структуриран и оформен съгласно изискванията. Дисертационният труд с приложените към него научни публикации демонстрира познанията и възможностите за научно-изследователски проучвания на докторанта и отговаря на критериите на Закона за развитието на академичния състав в Република България и правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ-Плевен.

На базата на гореизложеното давам положителна оценка на дисертационния труд и предлагам на почитаемото Научното жури да присъди образователната и научна степен "ДОКТОР" по направление 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина и научна специалност „Хематология и преливане на кръв“ на **ДОКТОРАНТ Д-Р ДОРОТЕЯ КОСТАДИНОВА ТОДОРИЕВА-ТОДОРОВА.**

Изготвил рецензия:
20.06.2024 год.

На основание чл. 59 от ЗЗЛД
проф. д-р Маргарита Любенова Генова, дм
СБАЛХЗ - София

TO:
THE CHAIR OF THE SCIENTIFIC JURY
APPOINTED BY ORDER
№1429/28.05.2024
ISSUED BY PROF. D. DIMITROV, DM
RECTOR OF MEDICAL UNIVERSITY - Pleven
Pleven

OPINION

By Prof. Dr. Margarita Lubenova Guenova, PhD
Specialized Hospital for Active Treatment of Hematological Diseases - Sofia

About:

DISSERTATION

"CLINICAL SIGNIFICANCE OF GENETIC, IMMUNOLOGICAL AND COMORBIDITY
FACTORS IN DETERMINING THROMBOGENIC RISK IN PATIENTS WITH
MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS"

for awarding the educational and scientific degree "PhD" in
7. Health care and sports, 7.1. Medicine,
Scientific specialty "Hematology and blood transfusion"

Scientific supervisors:

Prof. Dr. Liana Gercheva-Kyuchukova, PhD

Prof. Dr. Katya Kovacheva-Kotseva, PhD

Dr. Dorothea Kostadinova Todorieva-Todorova

PhD student at

Department of "Nephrology, Hematology and Gastroenterology", Faculty of Medicine,
Medical University - Pleven

DEAR MR CHAIR OF THE SCIENTIFIC JURY,

Herewith, following order No. 1429/28.05. 2024 issued by the Rector of Medical University - Pleven and in alignment with the requirements of the Regulations for the development of the academic staff at the Pleven Medical University I bring to your attention a review regarding the dissertation work for awarding the educational and scientific degree "doctor" to Dr. Dorothea Kostadinova Todorieva-Todorova – a PhD student at the Faculty of Medicine.

I. Brief biographical data for the PhD candidate:

Dr. Dorothea Kostadinova Todorieva-Todorova graduated with a master's degree in Medicine from the Medical University of Pleven in 2011. She was board certified in Clinical Hematology (2018). The professional development of the doctoral student began in the Hematology Clinic at the University Hospital "Georgi Stranski" - Pleven in 2012, where she continues to this day.

Dr. Dorothea Kostadinova Todorieva-Todorova has consistently worked for her professional development - she got serious education in the EHA Masterclass (2015), EHA Bite-Size Masterclass in Hemophilia (2016); certified trainings for participation in clinical studies (IATA certificate, GCP certificate). She obtained a Master's degree in Health Management (2023). Dr Todorieva successfully took the European Hematology Exam (2018). In 2022, Dr. Dorothea Kostadinova Todorieva-Todorova started her doctoral studies.

Dr. Dorothea Kostadinova Todorieva-Todorova published the results of the present doctoral study in 3 articles in Bulgarian scientific journals - 1 in Bulgarian and 2 in English, and presented results at 4 scientific forums. She took part in numerous scientific and educational events. She actively worked on several scientific projects funded by the MU – Pleven (project N 13/2013, project N 2/2015, project N 9/ 2017 and N 9/ 2019), the results of which are presented in the current thesis.

II. Overall evaluation of the PhD thesis:

The present thesis is dedicated to an important scientific and medical problem, such as the risk of thrombosis. Thrombotic risk in myeloproliferative neoplasms is a serious problem, with arterial and venous thrombosis representing one of the main causes of morbidity and mortality in this nosological category, along with transformation to myelofibrosis or acute leukemia. Various clinical and pathophysiological factors are known to contribute to the development of thrombotic complications. Some clinical risk factors are also known. To a large extent, the current therapeutic paradigm in CMPN focuses on the prevention of thrombosis. In this regard, attempts to better characterize the underlying cellular and molecular mechanisms of thrombosis susceptibility are essential to achieve improved personalized prediction and risk stratification as well as selection of optimal therapeutic strategies.

The dissertation presented by PhD student Dr. Dorothea Kostadinova Todorieva-Todorova complies to the main requirements of the Regulations for the Implementation of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (The Law):

The presented scientific work fulfills the minimum national requirements according to Art. 26 of The Law (ДВ No. 30 of 2018, 04.05.2018) and Art. 1a of the official Application Rules (ДВ, No. 56 of 2018, 06.07.2018) for the awarding of an educational and scientific degree "doctor" in 7. "Health and Sports" Professional field 7.1. Medicine (Table).

Group of indicators	Indicator	Score required for PhD	Score Dr D.Todorieva
A	1. PhD Thesis	50	50
	TOTAL FOR GROUP "Г"	30	34.5
Г	1. Scientific publication and reports in scientific journals, referenced and indexed in world-renowned databases of scientific information	60/n	7.5
	2. Scientific publication and reports in scientific journals, referenced and indexed in world-renowned databases of scientific information.	60/n	12
A	3. Scientific publication and reports in scientific journals, referenced and indexed in world-renowned databases of scientific information	60/n	15

1. The dissertation is presented in a volume of a total of 159 pages, containing: content (4 pages); abbreviations used (3 pages); exposition, structured in the following sections - I. Introduction and literature review (36 pages); II. Aim and tasks (1 page); III. Materials and methods (4 pages); IV. Results and discussion (76 pages); Main conclusions and contributions (2 pages); Appendices (9 pages – forms, survey cards, ethics commission decisions); a List of publications on the topic (2

pages); References, including 223 papers, mostly in English, 26% of which are from the 5 recent years (2019-2024). The results of the conducted research are illustrated with 26 figures and 47 tables.

Attached is a 67-page abstract that reflects the main points of the dissertation and contains (1) a list of publications related to the dissertation work.

2. The PhD thesis demonstrates the level of theoretical knowledge that PhD student Dr. Dorothea Kostadinova Todorieva-Todorova has in her specialty field and her ability to conduct research, the results of which represent a contribution to medical science and practice.

2.1. The PhD thesis contains a **literature review** in a volume of 36 pages that clearly demonstrates the good knowledge of the doctoral student, and is structured in several main areas:

An overview of chronic myeloproliferative neoplasms (CMPNs) in terms of definitions, history of concepts, diagnosis, classifications and epidemiology. The knowledge about the etiology and pathogenesis of CMPN is presented, including a review of the role of key genetic disorders as well as the clinical presentation of the main nosological categories.

A detailed review of thrombotic complications in CMPN, incl. data on the frequency and risk stratification of each nosological entity.

Special attention devoted to the pathogenesis of thrombotic complications and the role of the activation and the number of blood cells - leukocytes, erythrocytes, platelets; the genetic disorders, antigen expression, extracellular vesicles, hyperactivated endothelium, the coagulation system and thromboinflammatory processes. The importance of factors such as comorbidity for the overall risk profile, as well as therapeutic strategies in patients with a high-risk thrombogenic profile, are also reviewed.

The analysis of the reviewed data allowed Dr. Dorothea Todorieva to formulate the hypothesis that there is a field for additional studies that would clarify the role of certain genetic, immunophenotypic and comorbid factors for thrombogenesis in patients with CMPN, which would allow better clinical risk control.

The doctoral student clearly formulated the **Aim of the study** - to investigate the role of some genetic factors [Factor V Leiden (FVL); Prothrombin (Factor II) (PT) G20210A mutation; PIA1/A2 polymorphism of Glycoprotein IIIa (GPIIIa); JAK2 V617F carrier], immunological (CD11b/CD18 expression) and comorbid factors in thrombogenesis in patients with CMPN. Clear tasks have been formulated to achieve the goal.

2.2. **Materials and methods** have been selected in accordance with the formulated goal and main tasks. The dissertation included a total of 138 adult patients with diagnosed CMPN, as well as 2 control groups - 108 healthy volunteers as a control for genetic thrombophilia, and 46 healthy volunteers as a control for the expression of CD11b/CD18 on neutrophils. Characteristics of the patient cohort and healthy control groups are presented in the Results section.

In addition to classic questionnaires, clinical and laboratory methods, the PhD study included a set of specific research methods selected to fulfill the formulated tasks: a) molecular genetic methods, based on Polymerase Chain Reaction (PCR), for genotyping FVL, G20210A mutation, PLA1/A2 mutation and JAK2 V617F; (2) flow cytometry to study the surface expression of CD11b/CD18 on peripheral blood neutrophils. A significant package of statistical methods was used for the analysis of discrete and continuous quantities.

2.3. **Research results** have been described correctly, illustrated with graphs and tables:

- The main characteristics of the patients included in the study have been presented, as well as the approaches for grouping them according to specific characteristics for the purposes of the subsequent analysis. The data provide a real-world cross-section of patients with chronic myeloproliferative neoplasms in a single clinical center in terms of basic demographic parameters as well as the incidence of thrombotic events.

- The frequency of genetic thrombophilia in the HMPN group was studied and it was found to be significantly higher compared to the frequency in the corresponding control group of healthy individuals (CG1) in particular due to PLA1/A2, which was found more often in patients compared to the CG1 and was associated with an 8-fold higher thrombogenic risk. Regarding FVL and G20210A, the results did not demonstrate a higher frequency in the patient group, however, G20210A was confirmed as a thrombogenic risk factor.

- The frequency of thrombophilic defects in the CMPN patients' group and in a control group of healthy individuals (CG1) was compared. FVL was found not to increase the risk of experiencing a thrombotic event in CMPN patients, while PLA1/A2 increased it 8-fold in CMPN patients compared to the CG1, and G20210A was shown to be a thrombogenic risk factor, but the risk did not was higher compared to CG1 healthy volunteers.

- The association between genetic thrombophilia and thrombogenic risk in patients with various types of CMPN was studied, and it was found that the overall risk of a thrombotic event in carriers of genetic thrombophilia increased 13 times compared to controls. Data showed that: (1) in polycythemia vera (PV) patients, genetic thrombophilia increased the risk of a vascular event 18-fold, and this was significantly true for patients with PLA1/A2 as well as with JAK2V617F; (2) in patients with essential thrombocythemia (ET) – 14-fold for PLA1/A2; (3) in myelofibrosis (MF) – 9-fold for G20210A and PLA1/A2 and 3-fold for JAK2V617F; (4) in chronic myeloid leukemia (CML) – 18-fold, similar to PV patients, especially significant for patients with G20210A and PLA1/A2.

- The frequency and significance of the JAK2 V617F mutation in CMPN patients was investigated and 36.1% of the patients tested were found to be heterozygous (23.7%) or homozygous for the mutation (12.4%). However, in the “Results” section the relative proportion of patients bearing the mutation was presented as a % of the entire cohort, which does not provide a correct idea of the frequency of the aberration, since there are no data for 29.71% of the patients. The presence of JAK2 V617F increased the thrombogenic risk 4-fold, further increasing the risk in proven genetic thrombophilia, especially PLA1/A2. The thrombogenic risk was the highest in patients with more than one genetic abnormality in the PV subgroup.

- The significance of hematological parameters in relation to thrombogenic risk was studied. Leukocytosis was identified as a thrombogenic risk factor in patients with CML and PV, and thrombocytosis only in CML, while hemoglobin level was not associated with increased thrombogenic risk in the studied cohort.

- In addition to the cell counts, the neutrophil population was evaluated in terms of CD11b/CD18 expression, demonstrating significantly higher levels in all CMPN patients compared to the control group of healthy individuals, the highest in CML and lowest in PV. PV and ET patients experiencing a thrombotic event were characterized by higher levels of CD11b/CD18(+) neutrophils. An 1% increase in CD11b/CD18(+) neutrophils in the entire CMPN cohort lead to an increased risk of thrombotic events. Additional analysis showed that platelet counts and the presence of genetic aberrations were not associated with CD11b/CD18 expression.

- Thrombogenic risk was also evaluated in relation to the presence of comorbid factors. Data showed that the presence of 2 or more significantly increased the thrombogenic risk in the studied group of patients, with the most significant effect of arterial hypertension, ischemic heart disease and heart failure. Arterial hypertension and ischemic heart disease have been shown to have significant impact in patients with myelofibrosis, while smoking - in CML. Thrombogenic risk in PV patients was only increased if \geq two risk/comorbid factors are present.

2.4. Dr. Dorothea Kostadinova Todorieva-Todorova analyzed the data from her own research and those of other research groups found in the literature together in a common section "Results and

Discussion". The overall analysis of the concepts proposed by other authors for the pathogenesis of thrombotic events in CMPN and her own data provided the basis to define risk factors for both Ph'(+) CML and Ph'(-) CMPN in general and separately for each nosological entity. Conclusions are formulated regarding:

- The frequency of genetic aberrations, both thrombophilia-related and oncogenesis-related, in all CMPN patients compared to healthy individuals, as well as within the individual CMPN subtypes.
- The association of genetic aberrations with the risk of thrombotic events, inferring the role of the presence of multiple genetic aberrations.
- The differentiated significance of the hematological indicators (leukocytes, platelets) in each nosological entity.
- The role of neutrophil activation assessed by membrane expression of CD11b/CD18.
- The importance of comorbid/risk factors that could potentially be targets for prevention through proper management.

It would have been better to avoid repetition of results when formulating the conclusions, but rather to emphasize the resulting biological and clinical aspects of the observations. This would have added value to the already thorough and extensive research.

2.5. In regard to the **Contributions section**, I accept the statements made by Dr. Dorothea Kostadinova Todorieva-Todorova, and their classification into two main groups:

Theoretical and original contributions: Dr Todorieva conducted the first complex study summarizing essential risk factors for thrombogenesis in patients with Ph'(+) CML and Ph'(-) CKD, which added new scientific data on the frequency and significance for thrombogenic risk of genetic factors for thrombophilia in patients with CML and MF, which have not been studied in this context so far, and in particular of PLA1/A2. The role of CD11b/CD18 expression on neutrophils, as a marker of leukocyte activity, for the development of thrombosis was confirmed in classical CMPN (as well as in individual nosological entities). Detailed information was collected and the significance of various comorbid/risk factors contributing to thrombogenesis was reported in all patients.

Contributions related to practical implementation: The study of genetic aberrations, neutrophil activation, blood cell counts and risk/comorbid factors demonstrated a significant correlation with the occurrence of thrombotic events, which allows for the development of well supported algorithm for comprehensive assessment, refinement and individualization of the management of thrombogenic risk in patients with CMPN.

III. Recommendations and remarks.

- The methods used were presented very schematically. Thus, the thesis may not be suitable as a practical guide for subsequent doctoral students and researchers, providing them with a clear understanding of the nature of the research carried out and allowing them to reproduce some of the research approaches.

- On graphs #7-9,11,13,16, the results were presented as the number of patients, which does not always allow a good comparative visualization between the patient and control cohorts due to the different total number of cases in each of the groups.

- A single standard was not observed when writing the reference sources, which does not correspond to the otherwise precise preparation of the text of the thesis.

- These findings do not alter the work's substance, which elaborates on a relevant scientific and medical problem and makes substantial contributions to knowledge with a potential for future research and implementation. I hope that the present remarks and recommendations will be useful for

the future investigations of the PhD student, who demonstrates a serious potential for a future clinical research career.

IV. Conclusions.

In conclusion, the presented thesis of Dr. Dorothea Kostadinova Todorieva-Todorova – a PhD student at the Department of "Nephrology, Hematology and Gastroenterology", Faculty of Medicine, Medical University - Pleven, "CLINICAL SIGNIFICANCE OF GENETIC, IMMUNOLOGICAL AND COMORBID FACTORS FOR DETERMINING THE THROMBOGENIC RISK IN PATIENTS WITH MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS" is a personal achievement of the PhD student devoted to an important scientific and medical problem, structured and shaped according to the requirements. The dissertation, together with the scientific publications attached, demonstrates the level knowledge and the capacity for research studies of the doctoral student and meets the criteria of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the academic regulations in Medical University - Pleven.

Based on the above, I give a positive assessment of the dissertation work and propose to the honorable Scientific Jury to award DR. DOROTEIA KOSTADINOVA TODORIEVA-TODOROVA the educational and scientific degree "DOCTOR" in 7. Health care and sports, 7.1. Medicine - scientific specialty "Hematology and blood transfusion".

20.06.2024.

На основание чл. 59 от ЗЗЛД

Prof. Dr Margarita Guenova, PhD

Sofia