



До
Председателя на Научното жури,
назначено със заповед на Ректора на
Медицински университет - Плевен
N 1775 от 25.06.2024 г.

СТ А Н О В И Щ Е

относно дисертационния труд за присъждане на научната степен „доктор” на Светла Петрова Асенова на тема „Приложение на аналитични методи за оценяването на връзката между костна плътност, нива на биогенни елементи и на оксидативен стрес при остеопороза”, в област на висшето образование
4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление
4.2. Химически науки, научна специалност Аналитична химия

Автор на становището: проф. дхн Добромир Димитров Енчев

Светла Асенова завършва висше образование ОКС Магистър по специалност „Химични технологии“ в ХТМУ, Факултет по химични технологии, гр. София през 2000г. През 2003г. получава Професионална квалификация „Учител по специалност Химични технологии“ от Технически университет, гр. София. Паралелно с това, през същата година, получава и магистърска степен по специалност „Финанси“ от Великотърновски университет „Св. Св. Кирил и Методий“, Стопански факултет, гр. В. Търново. През 2006г. получава „Пета професионално-квалификационна степен“ от СУ „Кл.

Охридски“, Департамент за информация и усъвършенстване на учители. През 2013г. получава магистърска степен по специалност „Химия“ от СУ “Кл. Охридски“, Факултет по химия и фармация. През същата 2013г. става също така и Специалист по „Теоретични основи на медицинската химия“ от МУ Плевен.

От 1999г. до 2002г. работи като лаборант в Професионална гимназия „Луи Пастор“, гр. Плевен.

От 2002г. до 2007г. работи в същата гимназия като учител по аналитична химия и биохимия.

От 2007г. до момента работи като асистент в сектор Химия на ФФ, МУ Плевен.

В представеният ми дисертационен труд са обобщени резултатите, публикувани в рамките на 6 научни съобщения в списания, като Обща медицина - Scopus, **SJR 0.111, Q4**, Bulgarian Chemical Communications - Scopus, **SJR 0.179, Q4**, J of IMAV - Web of Science, **Q4** и 6 доклада на научни конференции.

Дисертационният труд е написан на 209 стр. Цитирани са 174 литературни източника. Дисертацията е илюстрирана с 7 приложения, 38 фигури и 44 таблици.

Избраната тема е актуална, което се илюстрира още в началото на дисертацията, а именно:

Съществуват множество фактори, които влияят върху калциево-фосфорната обмяна, особено в съчетание с негативни фактори от начина на живот, от начина на хранене и от придружаващи заболявания. Все още ролята на микроелементите мед, цинк, желязо, магнезий не е напълно изяснена. Но все повече данни говорят, че дефицитът им играе съществена роля за нарушаване на калциево-фосфорната обмяна, довежда организма до оксидативен стрес, който допълнително нарушава костната хомеостаза.

От направения обзор се вижда, че резултатите за връзката между остеопорозата и серумните нива на микроелементите не са еднозначни. Липсват изследвания на връзката между нивото на оксидативен стрес в организма, концентрацията на споменатите биогенни елементи и костната плътност.

Достоверни резултати за нивата на биогенните елементи и на редокс състоянието на организма се получават чрез прилагането на обсъдените аналитични методи за анализ. Адекватната интерпретация на получените данни изисква прилагане на хеометричните методи поради многофакторния характер на заболяването.

Това мотивира автора да разработи проучване с участието на пациенти от българската популация, за да допринесат за увеличаването на броя на изследваните пациенти и за изясняване на влиянието на радикал-улавящата активност и на биогенните концентрации върху BMD, с цел по-добра превенция и контрол на заболяването.

Целта на настоящия дисертационен труд е: Изследване на връзките между костна плътност, нива на биогенните елементи калций, магнезий, желязо, мед и цинк и оксидативен стрес при жени в менопауза чрез аналитични и хеометрични подходи.

Задачите на настоящия дисертационен труд са:

1. Аналитично определяне на серумните концентрации на калций, магнезий, желязо, мед и цинк, както и нивото на оксидативен стрес при пациенти с остеопороза;
2. Да се открият взаимни връзки между изследваните биогенни елементи, оксидативен стрес и костна минерална плътност чрез корелационен, регресионен и многовариационен статистически анализ;
3. Статистическо идентифициране на образци на подобие (фенотипове) сред изследваните групи от пациенти и да се дефинират дискриминиращи параметри, отговорни за формиране на групите на подобие;
4. Да се анализират резултатите от анкетно проучване за фамилна обремененост и вредни битови навици с негативен ефект върху костната плътност на жени пациенти в менопауза.

Въз основа на проведеното проучване се прави заключение, че пациентите с намалена костна плътност показват по-високи стойности на RSA, повишени концентрации на мед и цинк и повишени стойности на съотношението Cu/Zn в сравнение с контролната група.

Повишаването на серумните нива на мед и цинк при пациенти с намалена костна плътност може да се дължи на разграждането на ензимите, участващи в костния метаболизъм, на които са компоненти медта и цинка. Това разграждане се задейства от повишено ниво ROS в клетките в контекста на остеопороза. Повишената концентрация на медни йони в серума инициира вторични радикални процеси, които допълнително повишават неговата АОА. Пациентите с нормален костен метаболизъм поддържат по-ниски серумни концентрации на Cu и Zn, тъй като тяхната вътреклетъчна функция остава

непокътната. Намаленото генериране на допълнителни радикали обяснява пониския серумен АОА, наблюдаван в контролната група.

Тези констатации потвърждават съвместното въздействие на свободните радикали и редокс-активните метали, като медта, както върху АОА, така и върху ВМД.

Приложеният от автора многовариационен статистически анализ подчертава връзката между ВМД, съдържанието на биогенни елементи и АОА.

ИЗВОДИ

1. При определяне на концентрацията на Cu, Zn и Mg в кръвния серум получихме по-високи средни стойности при пациенти с нарушен костен метаболизъм, по-изразени при пациенти с остеопения.
2. Отношението Cu/Zn се оказва важен маркер за степента на заболяването.
3. Повишаването на стойностите на общата антиоксидантна активност в кръвния серум при пациенти с остеопороза е по-високо, отколкото при контроли и пациенти с остеопения.
4. Корелационният анализ дефинира стохастични връзки между костна плътност, магнезий, АОА, T-score, ВМІ, възраст.
5. Създаден е регресионен модел за зависимост между костната плътност и индекс на телесна маса и АОА, който може да се използва за лесно диагностично предсказване на намалението на костна плътност от лесно достъпни дескриптори.
6. Обобщените резултати от хемометричния анализ дефинират следните основни фактори, определящи структурата на експерименталните данни:

- фактор, отговорен за формиране на „образец на диагностично въздействие“, включващ дескрипторите T-score, Δ BMD;
- фактор, свързан със състояние на намалена костна плътност и формиращ „образец на ефекта на минералното съдържание” и отчитащ ролята на дескрипторите Ca, Mg, Cu;
- фактор, свързан с общия здравен статус и разкриващ връзки между дескрипторите BMD, BMI, AOA, Age, Fe, Zn, формиращи „образец на физическо състояние на пациента“.

ПРИНОСИ

1. Предложен е оригинален маркер за степента на заболяване от остеопороза и остеопения, използващ отношението на концентрациите Cu/Zn вместо традиционните клинични анализи на серумните концентрации на двата компонента.
2. Създаден е адекватен регресионен модел за връзката между костната плътност на пациента и независимите параметри AOA и индекс на телесната маса, който позволява лесно и експресно пресказване на стойността на костната плътност и предварително познати стойности на регресорите.

На базата на резултати от един от хемометричните анализи чрез кластерен и факторен анализ (пациенти без контролна група) са идентифицирани три условни фенотипа пациенти с намалена костна плътност (osteopenia или osteoporosis като основна диагноза): фенотип 1: пациенти с най-негативен ефект от остеопороза и най-значителни метаболитни нарушения; фенотип 2: пациенти, засегнати от остеопороза в начален стадий; фенотип 3: пациенти с типична osteopenia

Заключение

Светла Петрова Асенова представя дисертационен труд за придобиване на научната степен „доктор“, който се основава на последователно построена научна програма. Осъществени са задълбочени изследвания, като при това са търсени практични решения с възможности за приложение. Постигнатите резултати могат да се характеризират като принос към обогатяването на съществуващи знания. Резултатите постигнати от ас. Асенова са намерили признание сред научната общност чрез публикуването им в специализирани научни списания с след преминаване на процес на рефериране.

Поради това, убедено препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват за присъждането на Светла Петрова Асенова на научната степен "доктор".

01.08.2024

Проф. дхн Д. Енчев:..... **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

To
The Chairman of the Scientific Jury,
appointed by order of the Rector of
Medical University - Pleven
N 1775 of 25.06.2024

S T A T E M E N T

regarding the dissertation work for awarding the scientific degree "doctor" to Svetla Petrova Asenova on the topic "Application of analytical methods for the assessment of the relationship between bone density, levels of biogenic elements and oxidative stress in osteoporosis", in the field of higher education 4. Natural sciences, mathematics, and informatics, professional direction 4.2. Chemical Sciences, scientific specialty Analytical Chemistry

Author: Prof. Dr. Dobromir Dimitrov Enchev

Svetla Asenova completed a higher education Master's degree in "Chemical Technologies" at HTMU, Faculty of Chemical Technologies, Sofia in 2000. In 2003 received the Professional qualification "Teacher in Chemical Technologies" from the Technical University, Sofia. In parallel with this, in the same year, he received a Master's degree in finance from Veliko Tarnovo University "St. Cyril and Methodius", Faculty of Economics, V. Tarnovo. In 2006 received the "Fifth professional-qualification degree" from SU "Cl. Ohridski", Department for Information and Teacher Improvement. In 2013 received a Master's degree in "Chemistry" from SU "Kl. Ohridski", Faculty of Chemistry and Pharmacy. In the same year 2013 he also became a Specialist in "Theoretical Foundations of Medicinal Chemistry" from the Pleven University of Medical Sciences.

From 1999 until 2002 she works as a laboratory assistant at the "Louis Pastor" Vocational High School, Pleven.

From 2002 until 2007 she works in the same high school as a teacher of analytical chemistry and biochemistry.

Since 2007 until now, she has worked as an assistant in the Chemistry department of the Faculty of Science, at Pleven University.

In the presented dissertation, the results are published in 6 scientific communications in journals such as General Medicine - Scopus, SJR 0.111, Q4, Bulgarian Chemical Communications - Scopus, SJR 0.179, Q4, J of IMAB - Web of Science, Q4 and 6 papers at scientific conferences.

The dissertation is written on 209 pages. 174 literary sources are cited. The dissertation is illustrated with 7 appendices, 38 figures, and 44 tables.

The chosen topic is relevant, which is illustrated at the beginning of the dissertation, namely:

Many factors affect calcium-phosphorus metabolism, especially in combination with negative factors from lifestyle, diet, and accompanying diseases. The role of trace elements copper, zinc, iron, and magnesium is not yet fully understood. However, more and more data show that their deficiency plays an essential role in disrupting the calcium-phosphorus exchange, leading the body to oxidative stress, which further disrupts bone homeostasis.

From the overview, it can be seen that the results on the relationship between osteoporosis and serum levels of trace elements are not unambiguous. There is a lack of research on the relationship between the level of oxidative stress in the body, the concentration of the mentioned biogenic elements, and bone density.

Reliable results for the levels of biogenic elements and the redox state of the organism are obtained by applying the discussed analytical analysis methods. Adequate interpretation of the obtained data requires the application of chemometric methods due to the multifactorial nature of the disease.

This motivated the author to develop a study with the participation of patients from the Bulgarian population to contribute to the increase in the number of studied

patients and to clarify the influence of radical scavenging activity and biogenic concentrations on BMD, with the aim of better prevention and control of the disease.

The aim of this dissertation is: To investigate the relationships between bone density, levels of biogenic elements such as calcium, magnesium, iron, copper, and zinc, and oxidative stress in menopausal women through analytical and chemometric approaches.

The tasks of this dissertation are:

1. Analytical determination of serum concentrations of calcium, magnesium, iron, copper, and zinc, as well as the level of oxidative stress in patients with osteoporosis;
2. To discover mutual relations between the studied biogenic elements, oxidative stress, and bone mineral density through correlation, regression, and multivariate statistical analysis;
3. Statistical identification of patterns of similarity (phenotypes) among the studied groups of patients and to define discriminating parameters responsible for the formation of the groups of similarity;
4. To analyze the results of a survey on family burden and harmful lifestyle habits with a negative effect on the bone density of female menopausal patients.

Based on the study conducted, it was concluded that patients with reduced bone density showed higher RSA values, increased concentrations of copper and zinc, and increased values of the Cu/Zn ratio compared to the control group.

The increase in serum levels of copper and zinc in patients with reduced bone density may be due to the degradation of enzymes involved in bone metabolism, of which copper and zinc are components. This degradation is triggered by an increased level of ROS in cells in the context of osteoporosis. The increased concentration of copper ions in the serum initiates secondary radical processes that further improve its AOA. Patients with normal bone metabolism maintain lower serum concentrations of Cu and Zn because their intracellular function remains intact. The reduced generation of additional radicals explains the lower serum AOA observed in the control group.

These findings confirm the joint effects of free radicals and redox-active metals, such as copper, on both AOA and BMD.

The multivariate statistical analysis applied by the author highlights the relationship between BMD, the content of biogenic elements, and AOA.

CONCLUSIONS

1. When determining the Cu, Zn, and Mg concentrations in the blood serum, we obtained higher mean values in patients with impaired bone metabolism, more pronounced in patients with osteopenia.

2. The Cu/Zn ratio appears to be an important marker of disease extent.

3. The increase in total antioxidant activity values in blood serum in patients with osteoporosis was higher than in controls and patients with osteopenia.

4. Correlation analysis defines stochastic relationships between bone density, magnesium, AOA, T-score, BMI, and age.

5. A regression model was created for the relationship between bone density and body mass index and AOA, which can be used to easily diagnostically predict the decrease in bone density from readily available descriptors.

6. The summarized results of the chemometric analysis define the following main factors determining the structure of the experimental data:

- a factor responsible for forming a "diagnostic impact pattern" including the descriptors T-score, Δ BMD;

- a factor associated with a state of reduced bone density and forming a "model of the effect of mineral content" and taking into account the role of the descriptors Ca, Mg, Cu;

- a factor related to the general health status and revealing relationships between the descriptors BMD, BMI, AOA, Age, Fe, and Zn, forming a "pattern of the patient's physical condition".

CONTRIBUTIONS

1. An original marker of the disease extent of osteoporosis and osteopenia is proposed, using the ratio of Cu/Zn concentrations instead of the traditional clinical analysis of serum concentrations of the two components.
2. An adequate regression model was created for the relationship between the patient's bone density and the independent parameters AOA and body mass index, which allows easy and express prediction of the bone density value and previously known values of the regressors.

Based on the results of one of the chemometric analyses by cluster and factor analysis (patients without a control group), three conditional phenotypes of patients with reduced bone density (osteopenia or osteoporosis as the main diagnosis) were identified: phenotype 1: patients with the most negative effect of osteoporosis and most significant metabolic disorders;

phenotype 2: patients affected by early-stage osteoporosis;

phenotype 3: patients with typical osteopenia

Conclusion

Svetla Petrova Asenova presents a dissertation for obtaining the scientific degree "doctor", which is based on a consistently built scientific program. In-depth research was carried out, while practical solutions with application possibilities were sought. The achieved results can be characterized as a contribution to the enrichment of existing knowledge. The results achieved by Assistant Professor Asenova have found recognition among the scientific community through their publication in specialized scientific journals after passing a refereeing process.

Therefore, I strongly recommend to the respected members of the Scientific Jury to vote for awarding Svetla Petrova Asenova the scientific degree "Doctor".