

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Марин Маринов

относно дисертационния труд на ас. Благвест Георгиев Бечев

„Развитие и приложение на методите за клетъчна хемилуминесценция за изследване функционалното състояние на фагоцитиращи клетки в биологични течности“

Разработен по Докторска програма: Биофизика.

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика.

Професионално направление: 4.1 Физически науки.

Докторант на самостоятелна подготовка към Катедрата по “Медицинска физика и биофизика“, Медицински факултет на Медицински университет – София.

Представена е една интердисциплинарна дисертация в гранична област на биофизика, имунология, пулмология, инженерна физика и информатика. При реализацията и е преминал целият път от направата на апаратура за *in vivo* и *in vitro* изследвания, разработката на съответните методики до приложението ѝ в клиниката за диагностични цели.

Биографични данни и активности на докторанта

Благвест Георгиев Бечев е роден на 16. 04. 1956 год. Завършва математическа гимназия в град Плевен и през 1981 г. магистърска степен на Физическия факултет на Софийския университет “Св. Климент Охридски”, специалност радиофизика и електроника. Една година е работил в Института по полупроводникова техника в Ботевград. Известна ми е неговата учебна и изследователска работа като асистент и гл. асистент по физика в Медицинския университет гр. Плевен, където и аз работех през 1988 – 1993 г. По-късно разработва и преподава курс по информатика на студенти по специалността “Здравни грижи”. От 2004 година е асистент и гл. асистент в Катедрата по медицинска физика и биофизика на МФ, МУ- София, където води упражнения по медицинска физика на студенти по медицина, дентална медицина и фармация и лекции на медицински сестри и лаборанти в Медицинския колеж във Враца. Още от Плевен и като ръководител на Катедрата в София до 2007 г. аз имам лични впечатления за неговата висока квалификация, задълбоченост, отговорност и всеотдайност към задълженията си на преподавател и към работата по дисертационната си тема. Има СДО специалност “Медицинска и санитарна физика”.

Участвал е в проекти със социална значимост, на няколко от които е бил водещ изследовател. По негова идея е реализирана база данни на рискови пациенти в гр. Плевен, внедрена в Бърза помощ. Така екипът отиващ към пациента, в реално време е информиран за него и взема по-адекватни решения. По проект финансиран от Отворено общество е изработил софтуер за организиране и управление на дейността на общопрактикуващ лекар и специалист – един от първите в България. Създал е и система за едновременно тестово изпитване на над 150 студенти за 3 часа, която се ползва дълги години от катедрите по химия и биохимия и биология. Всичко това доказва и високото ниво на разработения от него софтуер на апарата за интегрални и спектрални хемилуминесцентни изследвания.

Актуалност и значимост на темата

Хемилуминесцентните методи изместват стандартните фотометрични, флуорометрични и радиоактивни методи, предоставяйки многократно по-голяма чувствителност (до 1000 пъти), по-широк линеен обхват (още 2 декади) и ниска цена за тест. Те се използват все по-широко в съвременните медико-биологични и клинични изследвания.

Обектът на изследването в дисертацията - неутрофилната популация, е в центъра на вниманието на изследователите през последните години. Установени са нови връзки между неутрофилите и адаптивният имунен отговор при развитието на карциномите. Неутрофилната популация играе ключова роля при всички етапи на възпалението – от инициацията до разрешаването му, включително регенерацията на увредени тъкани. В последните години се проявява засилен интерес и към плевралните заболявания. Разработената методика за изследване на пациенти с плеврални изливи решава актуални задачи по диагностиката и диференцирането на плевралните изливи.

Литературният обзор включва проучването на 111 източника - 101 на латиница и 10 на кирилица. Представени са промените на парадигмите относно ролята на ПМН за имунитета, техните активности, значимостта им при антитуморна защита и възпаление. Разгледани са биофизичните основи при формирането на плевралните изливи, характеристиките на плевралните заболявания, етапите при развитието на парапневмоничните изливи. Подчертани са ключовите моменти при диагностиката на пациентите с плеврални изливи. От обзора по естествен път произтичат и съответните задачи в отделните направления на дисертацията.

Цел и задачи

Целта е дефинирана ясно и точно и отговаря на темата. Решени са следните **задачи** – създаване на апаратни, хардуерни и софтуерни средства, необходими за интегрални и спектрални хемилуминесцентни изследвания; развитие и усъвършенстване на *in vitro* методики за изследване на функционалното състояние на левкоцити в цялостна кръв чрез сенсibiliзирана хемилуминесценция и приложението им; спектрални ХЛ изследвания на функционалното състояние на изолирани ПМН и левкоцити в цялостна кръв; разработване на система за *in vivo* / *in vitro* мониторинг на хемилуминесценция в кръвен поток и апробирането и; създаване на методика за изследване функционалното състояние на левкоцитите в плеврални изливи и приложението ѝ за диагностика. Формулираните цел и задачи са решени много добре в дисертацията.

Материали и методи

Докторантът правилно е подбрал и точно описал методите, които обслужват поставените задачи. Дадена е изолацията на ПМН и RBC и критериите на Light за определяне типа на излива. Описани са хемилуминесцентните измервания и тяхната обработка, както и оценката на функционалното състояние на ПМН. Методиките, разработени от докторанта, в детайли са описани при резултати и дискусия.

Резултати и дискусия

Решението на задачите е комплекс от теоретични, експериментални, инженерни и хардуерно-софтуерни разработки. Те са представени и онагледени отлично, подкрепени със съответните статистически анализи.

Първоначално дисертантът, с колеги от Катедрата по физика и биофизика на МУ - Плевен, са разработили уникален по чувствителност и възможности апарат за интегрални и спектрални хемилуминесцентни изследвания. Това включва проектирането и съответната апаратна, хардуерна и софтуерна реализация. Хемилуминометърът може симултантно да измерва интегрално и/или спектрално хемилуминесценция емитирана от до 6 проби в 6 спектрални диапазона и да обработва натрупаните данни. Изследваните изолирани левкоцити и целокръвна емитиращи системи имат подобни спектри. Предвид голямата грешка при анализа с cut-on филтрите, получените резултати изискват допълнително потвърждение.

Разработена е система за *in vivo* / *in vitro* мониторинг на хемилуминесценция в кръвен поток, което позволява да се въздейства на кръвта и/или на опитното животно с избран фактор: електрично или магнитно поле, йонизираща радиация, инфра или ултразвук, активни вещества и други. Интерпретацията на резултатите е много сложна и изисква допълнителни експерименти. Аprobация на описания методологичен подход е снетата кинетика на луминоловата хемилуминесценция *in vivo* в кръвния поток на заек по време на фагоцитоза на Zymosan.

За целите на целокръвната ХЛ е намерена общата корекция на хемилуминесцентният отговор в зависимост от броя неутрофили и RBC. Това позволява сравняването на проби с различен брой неутрофили и RBC, което се дължи на физиологичните и патологични вариации и на избраните разреждания на кръвта. Намерена е положителна линейна връзка между пика на хемилуминесцентния отговор във времеви диапазон около него и броят неутрофили. Установена е линейна зависимост в логаритмичен мащаб между нормирания ХЛ отговор и концентрацията на RBC за временен интервал около пика. Резултатите представляват разширение на използваните концентрации неутрофили и RBC и времевите диапазони на използването.

За първи път е създадена методика за изследване на функционалното състояние на ПМН в плеврални изливи. Тя включва състава на измерваните хемилуминесцентни проби, определяне функционалното състояние на ПМН и др. С нея са изследвани активността на ПМН в плеврални изливи с различна етиология. За целите на диагностиката може да се използва различната средна стойност на параметъра *velocity V* (от Capacity Effectiveness Velocity координатите на функционалното състояние на левкоцитите) при двете групи пациенти с карцином и с инфекциозни заболявания. Предложената методика, позволява диференциране на трансудативни от ексудативни плеврални изливи с различна етиология. Тя има по-голяма специфичност и сравнима чувствителност спрямо критериите на Light et al.

Приноси

Получени са приноси с оригинален, потвърдителен и научно-приложен характер. Най-съществените са:

- оригиналната методика за изследване на функционалното състояние на ПМН в плеврални изливи, за първи път приложена за диагностични цели при пациенти с плеврален излив с различна етиология;

- усъвършенстваната методика за изследване на функционалното състояние на левкоцитите в цяла кръв чрез активирана хемилуминесценция, като е разширен диапазона за нормиране спрямо броя ПМН и RBC, позволяващо изследването на пациенти с neutropenia, при трансудати, при проби със силно намален брой ПМН и при силно вариращ брой RBC;

- намерено е предсказаното „алтернативно активирано“ функционално състояние в ПМН популации;

- за първи път са установени промени в активността на левкоцитите при въздействие при въздействие с използваното от докторанта амплитудно модулирано променливо магнитно поле;

- системата за in vivo мониторинг на хемилуминесценция в кръвен поток, позволяваща разкриване на детайли за връзката между функционалното състояние на неутрофилната популация и момента в развитието на имунния отговор.

Публикационна дейност и личен принос на докторанта

Б. Бечев надвишава изискваните критерии в Правилника за развитие на академичния състав в Медицински Университет – София. Има 6 публикации на две от които е първи автор, 4 от тях с импакт фактор (общ IF=7,767 и индивидуален IF=2,389). Резултатите от дисертацията са представени на 6 международни и 19 национални научни форуми. Значимостта на постигнатите резултати се вижда от откритите от Бечев 21 цитирания, много от които в списания с импакт фактор. Той има 3 рационализации, свързани с разработването на хемилуминометра за интегрални и спектрални изследвания и два научни проекта за приложението на хемилуминесцентни методи за изследване функционалното състояние на неутрофилите при пациенти с различна патология..

Заклучение

Всички задачи по дисертацията са успешно изпълнени. Автотрефератът отразява коректно и пълно работата. Резултатите и анализа им са ясно описани, изводите са добре формулирани. Реално и пълно са определени приносите с оригинален, потвърдителен и научно-приложен характер. Научната разработка в преобладаваща част е дело на дисертанта, за останалата се изисква екипна работа. Той има качества и възможности за проектиране, експериментиране и анализ на резултатите при самостоятелни научни изследвания. Оценявам работата на докторанта като отлична. Дисертационният труд отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и на критериите на МУ - София за придобиване на ОНС „ДОКТОР“.

Убедено гласувам с „ДА“ за присъждане на ОНС „ДОКТОР“ по докторска програма „Биофизика“ в професионално направление 4.1. Физически науки от област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика.на Благовест Георгиев Бечев. Препоръчвам това и на членовете на Уважаемото научно жури.

30.09.2018 г.

доц. д-р Марин Маринов